

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**EFEITOS DO CONSUMO DE LEGUMINOSAS NO METABOLISMO
DO COLESTEROL E DOS ESTERÓIS NEUTROS E ÁCIDOS DE
SUÍNOS INTACTOS E COM ANASTOMOSE ÍLEO-RECTAL**

José Manuel Mota Ruivo Martins

Dissertação apresentada à Universidade de Évora
para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Agrárias

Orientadora: Professora Doutora Ofélia Pereira Bento

Co-Orientador: Professor Doutor José Antunes Afonso de Almeida

Évora

2004

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**EFEITOS DO CONSUMO DE LEGUMINOSAS NO METABOLISMO
DO COLESTEROL E DOS ESTERÓIS NEUTROS E ÁCIDOS DE
SUÍNOS INTACTOS E COM ANASTOMOSE ÍLEO-RECTAL**

José Manuel Mota Ruivo Martins

Dissertação apresentada à Universidade de Évora
para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Agrárias



Orientadora: Professora Doutora Ofélia Pereira Bento
Co-Orientador: Professor Doutor José Antunes Afonso de Almeida

149 358

**Évora
2004**

Índice

	Páginas
Índice de Figuras	i
Índice de Quadros	iii
Abreviaturas gerais utilizadas	v
Abreviaturas utilizadas para os aminoácidos, segundo as recomendações da “International Union of Pure and Applied Chemistry” e da “International Union of Biochemistry and Molecular Biology” (IUPAC - IUBMB, 1984)	ix
Nomenclatura enzimática sugerida pelo “Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology” (IUBMB, 1992)	xi
Agradecimentos	xiii
Resumo	xv
Abstract	xvii
I. INTRODUÇÃO	1
II. ESTUDO BIBLIOGRÁFICO	3
1. O SISTEMA COLESTEROL	3
1.1. Repartição tissular e celular do colesterol	3
1.2. O colesterol móvel e os espaços de renovação	5
1.3. Organização do sistema colesterol	6
2. O COLESTEROL PLASMÁTICO	8
2.1. Repartição do colesterol	10
2.2. Principais lipoproteínas plasmáticas: origem e destino	10
2.2.1. Os quilomicrons	11
2.2.2. As VLDL	13
2.2.3. As LDL	14
2.2.4. As HDL	15
2.2.5. Fluxos de colesterol entre as lipoproteínas e as membranas citoplásmicas	18
2.2.6. Captação intracelular de lipoproteínas inteiras	21
2.3. Controlos fisiológicos da colesterolémia	24

3. BIODÍNTESI DO COLESTEROL	25
3.1. Etapas da biossíntese do colesterol	25
3.1.1. Do acetil coenzima A ao mevalonato	26
3.1.2. Do mevalonato ao esqualeno	27
3.1.3. Formação do núcleo esterol: do esqualeno ao colesterol	27
3.2. Débito da secreção interna de colesterol	28
3.3. Locais de síntese do colesterol	28
3.4. Controlos fisiológicos da síntese	29
3.4.1. Principais factores que influenciam a actividade da HMG CoA reductase e a velocidade de biossíntese do colesterol	30
3.4.1.1. Modificações ao longo do desenvolvimento	30
3.4.1.2. Variações circadianas	31
3.4.1.3. Acções hormonais	31
3.4.1.4. Adição de colesterol ao alimento	32
3.4.2. Modulação da eficiência catalítica da HMG CoA reductase	33
4. O PAPEL DO FÍGADO	33
4.1. O sistema colesterol do fígado	33
4.2. A biossíntese dos ácidos biliares	34
4.2.1. As vias hepáticas de biossíntese dos ácidos biliares	38
4.2.1.1. A via clássica ou neutra	38
4.2.1.2. A via alternativa ou ácida	39
4.2.2. A via extra-hepática de biossíntese dos ácidos biliares	40
4.2.3. Regulação da biossíntese dos ácidos biliares e da actividade das principais enzimas nela intervenientes	40
4.2.3.1. Efeito dos ácidos biliares e da colestiramina	40
4.2.3.2. Efeito do colesterol e dos oxisteróis	41
4.2.3.3. Efeitos das hormonas	44
4.3. O colesterol e os fosfolípidos biliares	44
4.4. Esterificação do colesterol hepático	45
4.5. Renovação do colesterol esterificado hepático	47
5. O PAPEL DO INTESTINO	47
5.1. O conteúdo intestinal	48
5.1.1. O colesterol alimentar e o colesterol endógeno	48
5.1.2. O colesterol fecal	48
5.1.3. Físico-química do colesterol no conteúdo intestinal	49

	Páginas
5.2. Processos celulares da absorção intestinal	50
5.2.1. Principais mecanismos da absorção intestinal	50
5.2.2. Das trocas intracelulares à origem do colesterol linfático	51
5.3. Aspectos quantitativos da absorção	53
6. AS LEGUMINOSAS E SEUS COMPONENTES: EFEITOS NO METABOLISMO DO COLESTEROL	55
6.1. O consumo de grãos de leguminosas e seus efeitos	56
6.1.1. Efeitos relacionados com a dose consumida	56
6.1.2. Efeito da duração do estudo	57
6.1.3. Efeitos da espécie leguminosa em estudo	57
6.1.4. Efeito do consumo de leguminosas nos diferentes “pools” de colesterol	58
6.2. O consumo de componentes das leguminosas e seus efeitos	59
6.2.1. A fibra alimentar	59
6.2.2. A componente lipídica	63
6.2.3. A componente proteica	65
6.2.4. As saponinas	69
6.2.5. Os fitosteróis e os fitostanóis	70
6.2.6. As isoflavonas	72
III. ESTUDO EXPERIMENTAL	75
1. OBJECTIVOS DO ESTUDO	75
2. MATERIAIS E MÉTODOS	76
2.1. Animais, instalações e equipamentos	76
2.2. Regimes experimentais	76
2.2.1. Regimes à base de caseína e de soja extrudida	77
2.2.2. Regimes à base de caseína e de ervilha	78
2.2.3. Regimes à base de caseína e de tremçoço	79
2.3. Químicos e isótopos	80
2.4. Procedimentos experimentais	80
2.5. Análises laboratoriais	82
2.5.1. Análise dos regimes e refugos alimentares, fezes e conteúdos ileais	82
2.5.2. Análises plasmáticas	84
2.5.3. Análises hepáticas	85
2.5.3.1. Lípidos hepáticos	85

2.5.3.2. Fracções celulares hepáticas	85
2.5.3.3. Determinações enzimáticas	85
2.5.3.4. Imunodeteccção dos receptores de LDL	86
2.5.4. Análises biliares	87
2.5.4.1. Lípidos biliares	87
2.5.4.2. Ácidos biliares	87
2.6. Cálculos e análise estatística	87
IV. RESULTADOS	89
1. EFEITOS DO CONSUMO DO REGIME SOJA NOS DIFERENTES PARÂMETROS ANALISADOS EM SUÍNOS INTACTOS E COM ANASTOMOSE ÍLEO-RECTAL	89
1.1. Parâmetros zootécnicos e peso dos órgãos	89
1.2. Parâmetros plasmáticos	89
1.3. Parâmetros hepáticos	92
1.4. Parâmetros biliares	92
1.5. Excreção de esteróis neutros e ácidos	96
2. EFEITOS DO CONSUMO DO REGIME ERVILHA NOS DIFERENTES PARÂMETROS ANALISADOS EM SUÍNOS INTACTOS E COM ANASTOMOSE ÍLEO-RECTAL	98
2.1. Parâmetros zootécnicos e peso dos órgãos	98
2.2. Parâmetros plasmáticos	98
2.3. Parâmetros hepáticos	101
2.4. Parâmetros biliares	101
2.5. Excreção de esteróis neutros e ácidos	105
3. EFEITOS DO CONSUMO DO REGIME TREMOÇO NOS DIFERENTES PARÂMETROS ANALISADOS EM SUÍNOS INTACTOS E COM ANASTOMOSE ÍLEO-RECTAL	107
3.1. Parâmetros zootécnicos e peso dos órgãos	107
3.2. Parâmetros plasmáticos	107
3.3. Parâmetros hepáticos	110
3.4. Parâmetros biliares	110
3.5. Excreção de esteróis neutros e ácidos	114

V. DISCUSSÃO	117
1. EFEITOS DO CONSUMO DO REGIME SOJA NO METABOLISMO DO COLESTEROL E DOS ESTERÓIS NEUTROS E ÁCIDOS DE SUÍNOS INTACTOS E COM ANASTOMOSE ÍLEO-RECTAL (ENSAIO SOJA)	117
2. EFEITOS DO CONSUMO DO REGIME ERVILHA NO METABOLISMO DO COLESTEROL E DOS ESTERÓIS NEUTROS E ÁCIDOS DE SUÍNOS INTACTOS E COM ANASTOMOSE ÍLEO-RECTAL (ENSAIO ERVILHA)	122
3. EFEITOS DO CONSUMO DO REGIME TREMOÇO NO METABOLISMO DO COLESTEROL E DOS ESTERÓIS NEUTROS E ÁCIDOS DE SUÍNOS INTACTOS E COM ANASTOMOSE ÍLEO-RECTAL (ENSAIO TREMOÇO)	127
4. DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS	131
VI. BIBLIOGRAFIA	137
VII. ANEXOS	173

Índice de Figuras

Figura 1. Topologia do sistema colesterol em mamíferos	7
Figura 2. Estrutura e composição das lipoproteínas plasmáticas: exemplo de uma LDL	8
Figura 3. Principais origens, destinos e transformações intraplasmáticas das lipoproteínas	12
Figura 4. Intervenção das ABCA1 no efluxo de colesterol livre celular	21
Figura 5. Mecanismos de captação de lipoproteínas inteiras	22
Figura 6. Principais etapas da síntese celular do colesterol	26
Figura 7. Esquema simplificado da biossíntese dos ácidos biliares em mamíferos	36
Figura 8. Exemplos de regulação pelos receptores nucleares de genes envolvidos no metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos	42

Índice de Quadros

Quadro I. Concentrações médias ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) de colesterol livre e esterificado em diferentes tecidos e órgãos de fêmeas adultas Large White	4
Quadro II. Características e composição em apoproteínas das principais classes lipoproteicas plasmáticas humanas	9
Quadro III. Composição das principais classes lipoproteicas no Homem, suíno e rato	10
Quadro IV. Ingredientes e composição química dos regimes experimentais (Ensaio Soja)	77
Quadro V. Ingredientes e composição química dos regimes experimentais (Ensaio Ervilha)	78
Quadro VI. Ingredientes e composição química dos regimes experimentais (Ensaio Tremoço)	79
Quadro VII. Efeitos do regime Soja em alguns parâmetros zootécnicos e no peso dos órgãos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal	90
Quadro VIII. Efeito do regime Soja em alguns parâmetros plasmáticos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal	91
Quadro IX. Efeitos do regime Soja nos parâmetros hepáticos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal	93
Quadro X. Efeitos do regime Soja nos lípidos, ácidos biliares e índices litogénicos da bÍlis vesicular de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal	94
Quadro XI. Efeitos do regime Soja na composição em ácidos biliares da bÍlis vesicular de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal	95
Quadro XII. Efeitos do regime Soja na excreção dos esteróis neutros e ácidos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal	97
Quadro XIII. Efeitos do regime Ervilha em alguns parâmetros zootécnicos e no peso dos órgãos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal	99
Quadro XIV. Efeito do regime Ervilha em alguns parâmetros plasmáticos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal	100
Quadro XV. Efeitos do regime Ervilha nos parâmetros hepáticos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal	102
Quadro XVI. Efeitos do regime Ervilha nos lípidos, ácidos biliares e índices litogénicos da bÍlis vesicular de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal	103

Quadro XVII. Efeitos do regime Ervilha na composição em ácidos biliares da bÍlis vesicular de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal	104
Quadro XVIII. Efeitos do regime Ervilha na excreção dos esteróis neutros e ácidos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal	106
Quadro XIX. Efeitos do regime Tremoço em alguns parâmetros zootécnicos e no peso dos órgãos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal	108
Quadro XX. Efeito do regime Tremoço em alguns parâmetros plasmáticos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal	109
Quadro XXI. Efeitos do regime Tremoço nos parâmetros hepáticos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal	111
Quadro XXII. Efeitos do regime Tremoço nos lípidos, ácidos biliares e índices litogénicos da bÍlis vesicular de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal	112
Quadro XXIII. Efeitos do regime Tremoço na composição em ácidos biliares da bÍlis vesicular de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal	113
Quadro XXIV. Efeitos do regime Tremoço na excreção dos esteróis neutros e ácidos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal	115

Abreviaturas gerais utilizadas

- ABCA1 (ex-ABC1) – “ATP-binding cassette transporter A1”
- ABCB4 – “ATP-binding cassette transporter B4” (também denominada MDR3/Mdr2)
- ABCB11 – “ATP-binding cassette transporter B11” (também denominada BSEP ou Pgps)
- ABCC2 – “ATP-binding cassette transporter C2” (também denominada MRP2/Mrp2)
- ABCG5 – “ATP-binding cassette transporter G5” (também denominada esterolina 1)
- ABCG8 – “ATP-binding cassette transporter G8” (também denominada esterolina 2)
- ACAT – Acil CoA:colesterol acil transferase
- ADF – Fibra insolúvel em detergente ácido
- ADP – Difosfato de adenosina (“adenosine diphosphate”)
- AGV – Ácidos gordos voláteis ou de cadeia curta (“short chain fatty acids”)
- AMP – Monofosfato de adenosina (“adenosine monophosphate”)
- apo – Apolipoproteína ou apoproteína
- ASBT – Transportador apical de ácidos biliares dependente de Na⁺ (“apical sodium-dependent bile acid transporter”) (também denominado IBAT)
- ATP – Trifosfato de adenosina (“adenosine triphosphate”)
- BARE – “Bile acid response element”
- BSEP – Bomba de secreção dos sais biliares (“bile salt export pump”) (também denominada ABCB11)
- C – Caseína
- CETP – Proteína de transferência de ésteres de colesterol (“cholesterol ester transfer protein”)
- CoA – Coenzima A
- CYP7A1 (ex-CYP7A) – Colesterol 7 α -hidroxilase
- CYP7B1 (ex-CYP7B) – 27-Hidroxicolesterol-7 α -hidroxilase ou oxisterol 7 α -hidroxilase
- CYP8B1 (ex-CYP8B) – Esterol 12 α -hidroxilase
- CYP27A1 (ex-CYP27A) – Esterol 27-hidroxilase
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DRM – “Detergent resistant microdomains”
- E – Ervilha
- EDTA – Ácido etilendinitrilotetraacético (“ethylenediamine tetraacetic acid”)
- EM – Energia metabolisável
- EO – 3 β -Hidroxi- Δ^5 -C₂₇-esteróide oxidoreductase
- EPM – Erro padrão da média
- FXR – “Farnesoid X receptor”

GLC – Cromatografia de gás-líquido (“gas-liquid chromatography”)
GMD – Ganho médio diário
HB₁ e HB₂ – “HDL-binding protein 1 and 2”
HDL – Lipoproteínas de alta densidade (“high density lipoprotein”)
HMG CoA – 3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
IBABP – “Ileal bile acid-binding protein”
IBAT – Transportador intestinal de ácidos biliares (“intestinal bile acid transporter”) (também denominado ASBT)
IDL – Lipoproteínas de densidade intermédia (“intermediate density lipoprotein”) (também denominadas remanescentes de VLDL)
IRA – Anastomose íleo-rectal (“ileo-rectal anastomose”)
LBS – “Lipoprotein binding site”
LCAT – Lecitina:colesterol acil transferase
LDL – Lipoproteínas de baixa densidade (“low density lipoprotein”)
LpL – Lipoproteína lipase
LRH-1 – “Liver receptor homolog-1”
LXR – “Liver X receptor”
LXRE – “LXR response element”
Mdr2 – “Multidrug resistance 2” (também denominada ABCB4)
MDR3 – “Multidrug resistance 3” (também denominada ABCB4)
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
MRP2 – “Multidrug resistance protein 2” (também denominada ABCC2)
MS – Matéria seca
MTP – Proteína microsomal de transferência de triacilgliceróis (“microsomal triglyceride transfer protein”)
NADP⁺ – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NDF – Fibra insolúvel em detergente neutro
NPC-1 – “Niemann-Pick C1 protein”
NTCP – “Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide” (também denominado “sodium-dependent bile acid cotransporter”)
OATP – “Organic anion transporting polypeptides”
OR – Δ^4 -3-Oxosteróide-5 β -reductase
Pgp3 – “P-glycoprotein 3”
PLTP – Proteína de transferência de fosfolípidos (“phospholipid transfer protein”)
PNA – Polissacáridos não amiláceos
PPAR α – “Peroxisome proliferator-activated receptor α ”

PV – Peso vivo

PXR – “Pregnane X receptor” (também denominado SXR em humanos)

RE – Retículo endoplasmico

REL – Retículo endoplasmico liso

Relação P:S – Relação ácidos gordos poli-insaturados:saturados

RER – Retículo endoplasmico rugoso

RXR – “Retinoid X receptor”

S1P – “Site-1 protease”

S2P – “Site-2 protease”

SCAP – “SREBP cleavage-activating protein”

SCP – Proteínas transportadoras de esteróis (“sterol carrier proteins”)

SHP – “Short heterodimer partner”

SE – Soja extrudida

Spgp – “Sister of P-glycoprotein” (também denominada ABCB11)

SR-BI – “Scavenger receptor, class B, type I”

SRE – “Sterol regulatory element”

SREBP – “Sterol regulatory element-binding proteins”

SXR – “Sterol xenobiotic receptor” (também denominado PXR em roedores)

$t_{1/2}$ – Meia-vida

T – Tremoço

TTBS – Tampão salino Tween Tris (“Tween Tris buffered saline”)

VLDL – Lipoproteínas de muito baixa densidade (“very low density lipoprotein”)

Abreviaturas utilizadas para os aminoácidos, segundo as recomendações da “International Union of Pure and Applied Chemistry” e da “International Union of Biochemistry and Molecular Biology” (IUPAC - IUBMB, 1984)

Arg – Arginina

Cys-Cys – Cistina

Gly – Glicina

His – Histidina

Ile – Isoleucina

Leu – Leucina

Lys – Lisina

Met – Metionina

Phe – Fenilalanina

Ser – Serina

Thr – Treonina

Val - Valina

**Nomenclatura enzimática sugerida pelo
“Nomenclature Committee of the International Union of
Biochemistry and Molecular Biology” (IUBMB, 1992)**

Acil coenzima A:colesterol acil transferase (EC 2.3.1.26)
Acetil coenzima A C-acetiltransferase (EC 2.3.1.9)
Colesterol esterase / colesteril éster hidrolase / esterol esterase (EC 3.1.1.13)
Colesterol 7 α -hidroxilase (EC 1.14.13.17)
Difosfomevalonato descarboxilase (EC 4.1.1.33)
Dimetilalil-*trans*-transferase (EC 2.5.1.1)
Esqualeno mono-oxigenase (EC 1.14.99.7)
Esterol 12 α -hidroxilase (EC 1.14.12)
Esterol 27-hidroxilase (EC 1.14.13.15)
Difosfato-farnesil farnesiltransferase (EC 2.5.1.21)
Fosfatidilcolina:esterol O-acil transferase / lecitina:colesterol acil transferase (EC 2.3.1.43)
Fosfomevalonato cinase (EC 2.7.4.2)
Geranil-*trans*-transferase (EC 2.5.1.10)
27-Hidroxicolesterol-7 α -hidroxilase (EC 1.14.13)
3 β -Hidroxi- Δ^5 -C₂₇-esteróide oxidoreductase (EC 1.1.1.145)
3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductase (EC 1.1.1.34)
3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A sintase (EC 4.1.3.5)
Lanosterol sintase (EC 5.4.99.7)
Lipase hepática ou pancreática (EC 3.1.1.3)
Lipoproteína lipase (EC 3.1.1.34)
Mevalonato cinase (EC 2.7.1.36)
 Δ^4 -3-Oxosteróide-5 β -reductase (EC 1.3.1.23)

Agradecimentos

Estes trabalhos experimentais foram realizados no âmbito do projecto PRAXIS XXI intitulado “A fibra e a proteína alimentar na fisiologia digestiva e no metabolismo dos animais monogástricos”. Assim sendo, neles intervieram diversas instituições de investigação e várias individualidades a quem devo os meus agradecimentos...

À minha orientadora, Professora Doutora Ofélia Pereira Bento e ao meu co-orientador, Professor Doutor José Antunes Afonso de Almeida, da Universidade de Évora (UE), o meu reconhecimento pelo seu apoio, estímulo e pela leitura crítica desta dissertação.

Ao Professor Doutor Ramiro Mascarenhas e à Dra. Catarina Lavrador, da UE, pela realização das cirurgias nos animais experimentais utilizados nos três ensaios que constituem esta tese.

Aos Professores Doutores Ana Crespo, da Faculdade de Ciências de Lisboa, Bengala Freire, do Instituto Superior de Agronomia, Cancela de Abreu e Ivone Clara, da UE, bem como às suas instituições, pelo apoio laboratorial prestado a este trabalho experimental.

Ao Professor Doutor Claude Lutton, director do Laboratoire de Physiologie de la Nutrition (LPN), Université Paris-Sud, França, sem o apoio do qual uma boa parte das análises laboratoriais desta tese não teriam sido realizadas.

A todos os amigos que ganhei no LPN e em especial aos Doutores Carole Loison, Colette Sérougne, Jacqueline Férézou e Maamar Soudi, pela orientação e apoio laboratoriais, bem como pelo interesse que sempre demonstraram pelo meu trabalho.

Aos colegas Maria João Lança e Paulo Salgado, bem como à Cristina Figueira, Bruno Sousa, Luís Gaudêncio, Ana Valério e Eliseu Rebocho, pela colaboração prestada ao nível laboratorial e no maneo dos animais experimentais.

Gostaria também de agradecer à SANIPEC – Produtos para Pecuária Lda., na pessoa do seu Presidente, Sr. Vítor Cabeleira e da amiga e colega Teresa Carmona, o apoio prestado na mistura dos regimes experimentais.

Pelo apoio financeiro, os meus agradecimentos à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), ao Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas (ICAM) e à Fundação Calouste Gulbenkian.

Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial aos dois “Micheis” ! Aos Doutores Michel Parquet e Michel Riottot, do LPN, os meus sinceros agradecimentos pela amizade que me concederam, pelo apoio laboratorial prestado e pelos ensinamentos partilhados à volta de muitas chávenas de café e de chá, que contribuíram para o fim de algumas das minhas “dúvidas existenciais”...

Gostaria também de agradecer aos meus pais e a todos os amigos e familiares que me apoiaram incondicionalmente, apesar de sentirem a minha ausência em certas ocasiões.

Por fim, o meu obrigado à minha mulher, sem o apoio da qual teria certamente desesperado com certos suínos e suas “excentricidades”, e sem a ajuda da qual provavelmente ainda estaria a tentar arranjar uma solução para estar em vários lugares ao mesmo tempo !!!

Resumo

Estudos anteriormente realizados demonstraram o efeito hipocolesterolémico dos regimes alimentares à base de leguminosas (principalmente à base de soja) em modelos animais e humanos. No entanto, o(s) mecanismo(s) através do(s) qual(is) as leguminosas exercem este efeito, não estão completamente esclarecidos. A contribuição do intestino grosso para este efeito hipocolesterolémico também não está bem documentado.

Este trabalho foi realizado para investigar o efeito do consumo durante 3 semanas de regimes à base de caseína (C) e de leguminosas (grãos de soja extrudida (SE), de ervilha (E) e de tremço de folhas estreitas (T)) enriquecidos em colesterol ($2,8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), no metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos de suínos em crescimento intactos (I) e sujeitos a uma anastomose ileo-rectal (IRA). Ao início dos ensaios, os animais apresentavam-se hipercolesterolémicos devido ao consumo durante 2 semanas do regime C enriquecido em colesterol.

No Ensaio Soja, quatro grupos de seis animais foram distribuídos pelos tratamentos experimentais (C-I, C-IRA, SE-I e SE-IRA). No plasma, o colesterol total e o colesterol das LDL e das HDL não foi afectado pelos regimes nem pelo processo cirúrgico. No fígado, o regime SE deprimiu significativamente os níveis de colesterol livre, esterificado e total. Os tratamentos não afectaram a actividade das 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA) reductase, colesterol 7α -hidroxilase (CYP7A1) e esterol 27-hidroxilase (CYP27A1) hepáticas. A bília vesicular dos suínos consumindo o regime SE apresentou uma concentração menor em colesterol total, ao passo que a de ácidos biliares totais aumentou. O regime SE e a IRA diminuíram acentuadamente os metabolitos microbianos dos ácidos biliares vesiculares (nomeadamente o ácido hiodesoxicólico) e aumentaram os ácidos biliares primários (principalmente o ácido hiocólico). A concentração vesicular em ácidos biliares hidrófobos foi diminuída só pelo regime SE. A excreção fecal diária de esteróis neutros aumentou nos suínos consumindo o regime SE, mas a excreção diária de ácidos biliares e a excreção total diária de esteróis neutros e ácidos não. A transformação microbiana dos esteróis neutros e ácidos foi marcadamente reduzida pela IRA, especialmente nos suínos consumindo o regime SE. Assim, a soja extrudida e o processo cirúrgico modularam o perfil esterol fecal, mas o segmento ceco-cólon não pareceu desempenhar um papel crucial na colesterolémia dos suínos.

O Ensaio Ervilha envolveu quatro grupos de seis animais (C-I, C-IRA, E-I and E-IRA). O colesterol plasmático foi diminuído pelo consumo do regime E, através de uma descida significativa no colesterol das LDL. O regime E também diminuiu a concentração hepática em colesterol esterificado e aumentou a actividade da HMG CoA reductase e a síntese de receptores de LDL. As concentrações biliares em colesterol total e ácidos biliares foram maiores nos suínos consumindo o regime E que nos consumindo o regime C. Além disso, a excreção diária de ácidos biliares e a excreção total diária de esteróis neutros e ácidos foram superiores nos animais consumindo o regime E. A ausência funcional do segmento ceco-cólon inibiu a transformação microbiana do colesterol e do β -sitosterol, diminuiu a excreção diária de ácidos biliares e

aumentou a relação entre a excreção de ácidos biliares primários e secundários. No entanto, neste estudo a sua influência sobre a colesterolémia foi negligenciável. Estes resultados sugerem um efeito hipocolesterolémico da ervilha provavelmente modulado por um aumento da excreção diária de ácidos biliares (e de esteróis neutros e ácidos totais) e por um “pool” de colesterol e ácidos biliares vesiculares aumentado.

Finalmente, no Ensaio Tremoço, onde quatro grupos de seis animais foram utilizados (C-I, C-IRA, T-I and T-IRA), a hipercolesterolémia induzida pelo regime alimentar à base de caseína foi inibida pelo consumo do regime T, através de uma descida substancial no colesterol plasmático das LDL. O regime T também reduziu os níveis hepáticos de colesterol esterificado e total, ao mesmo tempo que aumentou a actividade da HMG CoA reductase e a síntese dos receptores de LDL. A excreção diária de esteróis neutros e a excreção total diária de esteróis neutros e ácidos foram superiores nos suínos consumindo o regime T. No entanto, a excreção diária de ácidos biliares foi menor nos animais sujeitos à IRA que nos I, tal como o foi a actividade da CYP27A1 hepática. O processo cirúrgico também impediu a transformação microbiana dos esteróis, mas mais uma vez não teve repercussões nos níveis de colesterol plasmático observados. Estes resultados sugerem que o efeito hipocolesterolémico do regime T foi obtido através de uma menor absorção intestinal de colesterol, provavelmente modulada pelos elevados conteúdos em fitosteróis e PNA deste regime, quando comparado com o regime C.

O conjunto destes resultados sugere que o principal mecanismo modulador do efeito hipocolesterolémico das leguminosas (ou, senão o principal, pelo menos o essencial ao aparecimento do referido efeito) manifesta-se ao nível da redução na absorção intestinal dos esteróis neutros e ácidos, a qual afecta a excreção total diária destes compostos. De facto, quando tal excreção não foi significativamente aumentada pelo regime à base da leguminosa (Ensaio Soja) o efeito hipocolesterolémico não se detectou, mas quando o foi (Ensaio Ervilha e Tremoço), observou-se uma redução no colesterol plasmático, mais especificamente no colesterol das LDL. Por fim, os animais sujeitos à IRA apresentaram uma menor transformação microbiana dos esteróis neutros e ácidos em todos os tratamentos. Este processo cirúrgico também induziu um crescimento compensatório do intestino delgado dos suínos dos Ensaio Ervilha e Tremoço, contribuindo para uma redução na sua excreção diária de ácidos biliares. Apesar destas modificações, o segmento ceco-cólon não apresentou efeitos significativos ao nível da modulação da colesterolémia nas presentes condições experimentais.

Palavras-chave: soja extrudida, grãos de ervilha, grãos de tremoço de folhas estreitas, metabolismo do colesterol, síntese hepática de esteróis, excreção de esteróis, anastomose íleo-rectal, suínos.

Abstract

Previous studies have demonstrated the cholesterol-lowering effect of dietary legumes (mainly soybean) in animals and humans, but the mechanisms by which they exert this effect are not completely understood. The contribution of the hindgut to this hypocholesterolemic effect is also not well documented.

This work was undertaken to investigate the effect of cholesterol-enriched ($2.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) casein (C) and legume diets (extruded soybean (ES), raw pea seed (RP), and blue lupin seeds (BL) diets) consumed for 3 wk, on the cholesterol and neutral and acidic steroid metabolism of intact (I) and ileo-rectal anastomosed (IRA) growing pigs. These pigs were made hypercholesterolemic by the previous consumption of the cholesterol-enriched C diet for 2 weeks.

In the Soybean Trial, four groups of six growing pigs were assigned to the treatments (C-I, C-IRA, ES-I, and ES-IRA). Plasma total cholesterol, LDL- and HDL-cholesterol were not modified by diet or surgery. In the liver, the ES diet significantly depressed free, esterified and total cholesterol. Treatments did not affect hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase, cholesterol 7α -hydroxylase (CYP7A1) or sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) activities. In the gallbladder bile of ES-fed pigs, total cholesterol was depressed while total bile acid concentration was increased. ES diet and IRA markedly decreased the biliary bile acid microbial metabolites (namely hyodeoxycholic acid) and increased the primary bile acids (mainly hyocholic acid). The concentration of bile hydrophobic acids was decreased only by the ES diet. Daily faecal neutral sterol output was increased in ES-fed pigs, but the daily bile acid output and total neutral and acidic steroid output were not. Microbial transformation of neutral and acidic steroids was markedly reduced by IRA, especially in the ES-fed pigs. Thus, extruded soybean and surgery modulated the faecal steroid profile but the cecum-colon did not seem to play a crucial role in determining the cholesterolemia in pigs.

The Pea Trial also involved four groups of six animals (C-I, C-IRA, RP-I, and RP-IRA). Plasma cholesterol was lowered by the RP diet through a significant decrease in LDL-cholesterol. The RP diet also decreased the hepatic concentration of esterified cholesterol and increased the HMG CoA reductase activity and the LDL receptor synthesis. The total cholesterol and bile acid biliary concentrations were increased in RP- as compared with C-fed pigs. In addition, daily faecal bile acid output and the daily total neutral and acidic steroid output were higher in RP-fed pigs. The cecum-colon bypass inhibited the cholesterol and β -sitosterol microbial transformation, lowered the daily bile acid output and increased the primary to secondary bile acid output ratio but, in this study, its influence on cholesterolemia was negligible. These results suggest a hypocholesterolemic effect of the raw pea probably through an increased faecal bile acid output and an increased biliary cholesterol and bile acid pool.

Finally, in the Lupin Trial another four groups of six animals were used (C-I, C-IRA, BL-I, and BL-IRA pigs). Diet-induced hypercholesterolemia was inhibited by BL diet, through a substantial decrease in plasma LDL-cholesterol. The BL diet also reduced liver esterified and total cholesterol,

and increased hepatic HMG CoA reductase activity and LDL receptor synthesis. The daily neutral sterol output and the daily total neutral and acidic sterol output were higher in BL-fed pigs. Unexpectedly, the daily bile acid output was lower in IRA than in INT pigs, as it was the CYP27A1 activity. Surgery also prevented sterol microbial transformation but it did not influence plasma cholesterol levels. These results suggest that the mechanism for the hypocholesterolemic effect of BL diet was due to impaired intestinal cholesterol absorption, probably modulated by the higher contents in phytosterols and NSP of the BL diet when compared with the CAS diet.

When taken together, these results suggest that the leading mechanism (or, at least an essential one) by which legumes modulated the cholesterol metabolism was the total neutral and acidic sterol intestinal absorption, which led to a variation in the daily output of these compounds. When the total neutral and acidic sterol output was not significantly increased by the legume diet (Soybean Trial) the hypocholesterolemic effect was absent, but when it was increased (Pea and Lupin Trials) a reduction in the plasma cholesterol was noticed, specifically in the LDL cholesterol fraction. Lastly, the IRA pigs presented a reduced microbial transformation of the neutral and acidic sterols in all the treatments. The surgical procedure also induced a hypertrophy of the small intestine in pigs from the Pea and Lupin Trials, contributing to a reduction in their daily bile acid output. Nevertheless, and although producing these changes, the cecum-colon section did not affect significantly the plasma cholesterol level of the pigs in the experimental conditions observed in these Trials.

Keywords: extruded soybean, raw pea seeds, blue lupin seeds, cholesterol metabolism, hepatic sterol synthesis, sterol output, ileo-rectal anastomosis, pig.

I. INTRODUÇÃO

As doenças ligadas ao estilo de vida como os *diabetes mellitus*, as hiperlipémias e as doenças cardiovasculares, cada vez mais comuns nos países industrializados, são responsáveis por grande parte da morbidade e mortalidade prematura nas sociedades ocidentais. No Homem, a incidência de doenças cardiovasculares tem sido desde há várias décadas correlacionada primordialmente com quatro (entre muitos outros) factores de risco: a obesidade, níveis de colesterol plasmático elevados, hipertensão e consumo de tabaco (Keys, 1970).

Dados obtidos a partir de estudos epidemiológicos e experimentais em humanos e modelos animais indicam que o risco de doenças cardiovasculares pode ser reduzido por vários meios. Um dos que mais interesse tem despertado é a manipulação dietética (Kerckhoffs *et al.*, 2002). Assim, o consumo de leguminosas ou seus componentes tem originado reduções no nível plasmático de colesterol, particularmente em casos de hiperlipémia do tipo II ou hipercolesterolemia, o tipo mais comum de hiperlipémia. No entanto, os mecanismos de modulação do metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos pelas leguminosas não estão ainda completamente esclarecidos (Anderson e Major, 2002).

A grande maioria dos estudos realizados com vista a identificar o efeito das leguminosas no metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos tem envolvido a utilização de componentes ou dos grãos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), a leguminosa mais produzida a nível mundial. No entanto, a substituição da soja por espécies como a ervilha (*Pisum sativum* L.) e o tremçoço (*Lupinus* spp.), ricas em proteína e hidratos de carbono (Alonso *et al.*, 2001; Guillon e Champ, 2002), é cada vez mais comum nos regimes alimentares humano e animal, bem como na indústria de transformação alimentar (Pettersson, 1998; Guillon e Champ, 2002). Apesar de muitos componentes da soja e doutras leguminosas serem considerados agentes hipocolesterolémicos *per se*, estudos recentes indicam que o consumo dos grãos inteiros origina reduções na colesterolemia superiores às obtidas pela soma das dos seus vários componentes (Macarulla *et al.*, 2001; Anderson e Major, 2002; Jenkins *et al.*, 2002). Neste contexto, uma das finalidades deste trabalho foi analisar o efeito do consumo de grãos inteiros de três espécies leguminosas (soja, ervilha e tremçoço de folhas estreitas) no metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos de um modelo animal.

Existem muitos estudos que sugerem uma relação entre os processos digestivos intestinais e o controlo do colesterol plasmático, estando o papel do intestino delgado no metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos bem documentado (Dietschy e Wilson, 1970; Chevallier e Lutton, 1973; Turley e Dietschy, 2003). No entanto, o papel do intestino grosso permanece por esclarecer. Por exemplo, a transformação microbiana dos ácidos biliares primários em secundários no ceco-cólon pode desempenhar um papel regulador importante (Kellogg, 1971), uma vez que a absorção de ácidos biliares secundários hidrófobos modula a síntese de colesterol e dos ácidos biliares no fígado (Pandak *et al.*, 1994). Assim, com vista a obter mais informações sobre o efeito do segmento ceco-cólon no metabolismo do colesterol e na excreção de esteróis, recorreu-se à utilização de modelos animais intactos e com anastomose íleo-rectal.

O efeito hipocolesterolémico das leguminosas tem sido estudado no Homem e em modelos animais, essencialmente ratos e hamsters. Estes modelos animais (sobretudo o rato) são considerados mais controversos que o suíno quando se extrapolam os resultados obtidos para o Homem (Shutler, 1988). Tal é devido ao facto das raças suínas apresentarem uma maior semelhança com os humanos ao nível da composição e distribuição relativa das lipoproteínas plasmáticas (Fidge, 1973; Johansson e Karlsson, 1976; Chapman, 1980; Gillet *et al.*, 1989; Vitic e Stevanovic, 1993). Estas raças podem também desenvolver lesões ateroscleróticas em resposta a manipulações dietéticas e do metabolismo do colesterol (Gillet *et al.*, 1989; Vitic e Stevanovic, 1993) e desenvolver espontaneamente processos ateroscleróticos, com base em mutações genéticas e apresentando lesões de natureza similar às observadas em humanos (Hasler-Rapacz *et al.*, 1998). Assim, é razoável considerar que a informação sobre os factores que afectam a concentração lipídica sanguínea nestes animais pode ser extrapolada para o Homem (Martincic *et al.*, 1984; Berlin *et al.*, 1985; Smith, 1998). Com base nestes dados, o modelo escolhido para estes estudos foi o suíno.

Integrado no âmbito do Projecto "A fibra e a proteína alimentar na fisiologia digestiva e no metabolismo dos animais monogástricos" (PRAXIS XXI 3/3.2/CA 2093/95, Fundação para a Ciência e Tecnologia, Lisboa, Portugal), este estudo visou avaliar os efeitos do consumo de três espécies de leguminosas no metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos de suínos em crescimento hipercolesterolémicos, intactos e com anastomose íleo-rectal. Qualquer redução dos níveis plasmáticos de colesterol obtida por manipulação dietética poderá ter um efeito benéfico na prevenção e tratamento das doenças cardiovasculares. No entanto, com vista a melhor compreender os mecanismos intervenientes, é necessário discutir primeiro o metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos.

II. ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

A fracção lipídica do material biológico inclui a família dos esteróis, caracterizada por possuir o sistema tetracíclico peri-hidro-ciclopentano-fenantreno (Solomons, 1987). Apesar da diversidade de componentes desta família no mundo vegetal e animal, os mamíferos elegeram o colesterol (5α -colestano- 3β -ol) como o seu esterol (Mathé e Lutton, 1984). Esta molécula, isolada em 1815, viu a sua estrutura química identificada em 1932 e os últimos detalhes da sua estereoquímica esclarecidos em 1955 (Solomons, 1987; McKee e McKee, 1999).

O colesterol é essencial à vida e encontra-se no organismo animal como elemento estruturante das membranas celulares, em trânsito pelo sangue ou como substrato para a síntese de ácidos biliares no fígado, de hormonas esteróides nos tecidos esteroideogénicos (córtex das supra-renais, testículos, ovários, corpo amarelo, placenta) e de colecalciferol na pele. Por outro lado, a sua deposição em artérias está associada à aterosclerose, uma das causas mais comuns das doenças cardiovasculares (Krieger, 1999). Considerados até então como simples moléculas lipídicas com uma função constitutiva, o colesterol e alguns dos seus metabolitos passaram nas duas últimas décadas a ser descritos como moléculas de sinalização multifacetadas (Zhang e Mangelsdorf, 2002). O quadro restrito deste estudo bibliográfico não permitirá abordar muitos dos aspectos em que estes compostos intervêm, como as suas funções na membrana celular, a transformação em hormonas esteróides e as patologias ligadas ao colesterol (hipercolesterolémias familiares, aterosclerose...) e aos ácidos biliares (litíase...). Aspectos de pesquisas clínicas como o efeito de drogas sobre a colesterolemia também não serão aqui sistematicamente abordados.

1. O SISTEMA COLESTEROL

1.1. Repartição tissular e celular do colesterol

O colesterol é o esterol mais abundante nos tecidos dos vertebrados. Nos suínos, ele representa pelo menos 98% dos esteróis totais dos tecidos e órgãos, com excepção dos pelos e da medula óssea, onde atinge valores inferiores (Aigueperse, 1979). Na maioria dos mamíferos adultos, o seu conteúdo médio varia entre 1 e 2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de tecido fresco.

Em tecidos específicos como o muscular e o cardíaco, essa concentração é geralmente inferior a $1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. No tracto digestivo e eritrócitos, ela encontra-se entre 1 e $2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, mas no fígado, rins, supra-renais, baço e sistema nervoso, a concentração em colesterol atinge valores mais elevados (Kellogg *et al.*, 1977). Nos suínos, a maior parte encontra-se sob a forma não esterificada (colesterol livre), apesar de no plasma e em órgãos como o fígado, as supra-renais e os ovários, a proporção de colesterol esterificado ser importante (Quadro I). Por fim, os tecidos destes animais contêm concentrações fracas em esteróis precursores do colesterol e em fitosteróis de origem alimentar ($< 0,2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$). Os seus pelos são uma excepção, com uma forte proporção do precursor desmosterol (Aigueperse, 1979).

Quadro I. Concentrações médias ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) de colesterol livre e esterificado em diferentes tecidos e órgãos de fêmeas adultas Large White (Adaptado de Aigueperse, 1979)

Tecido ou órgão	Colesterol livre	Colesterol esterificado	(% de esterificação)
Pelos	1,71	0,150	6,80
Pele	0,76	0,050	6,50
Tecido adiposo	1,02	0,050	5,10
Músculos lombares	0,48	0,006	1,20
Músculo longo dorsal	0,57	0,008	1,20
Ossos longos	0,11	0,012	9,80
Medula óssea	0,97	0,040	4,30
Cérebro	24,20	0,020	0,07
Espinal medula	55,00	0,030	0,06
Pulmões	3,27	0,040	1,30
Coração	0,98	0,030	2,80
Aorta	1,08	0,030	2,50
Eritrócitos	1,36	0,000	0,00
Tracto digestivo			
Estômago	1,75	0,040	2,20
Duodeno	2,43	0,210	7,90
Jejuno	2,34	0,115	4,60
Íleo	2,30	0,060	2,70
Ceco	1,60	0,060	3,60
Cólon	1,56	0,080	4,90
Recto	1,52	0,060	3,80
Fígado	2,14	0,220	9,50
Rins	3,12	0,040	1,20
Supra-renais	4,67	0,640	15,90
Ovários	1,94	0,560	21,90

A quantidade de colesterol, fosfolípidos e ácidos gordos presente nas membranas celulares dos mamíferos é controlada por um mecanismo extremamente sensível e ainda não totalmente identificado (Brown e Goldstein, 1999). A repartição celular do colesterol não é homogénea e varia segundo o tipo celular. A membrana citoplásmica contém 65 a 80% do colesterol celular total, apresentando as membranas ricas em esfingomiélinas com

as quais o colesterol tem uma grande afinidade, os valores mais elevados. A sua distribuição dá-se assimetricamente pelos folhetos interior e exterior da membrana citoplásmica e dentro de cada um deles, estando concentrada em regiões espacialmente definidas do tipo DRM (“detergent resistant microdomains”) ricas em esfingomiélna e glicolípídios. Estas regiões, denominadas *caveolae*, são ricas numa proteína com aptidão para se ligar ao colesterol, a caveolina (Murata *et al.*, 1995) e ocupam mais de 50% da área total da membrana (Brown e London, 1998; Blanchette-Mackie, 2000; Fielding e Fielding, 2001). As membranas intracelulares em comunicação vesicular com a citoplásmica como as dos endossomas, lisossomas e do aparelho de Golgi, apresentam níveis intermédios de colesterol, ao passo que por exemplo o retículo endoplásmico (RE) e a membrana mitocondrial citosólica apresentam valores baixos (Liscum e Munn, 1999).

O transporte intracelular do colesterol entre os locais de biossíntese e de reserva e a membrana citoplásmica é rápido. Extremamente complexo e não totalmente esclarecido, este transporte parece ser modulado por proteínas e estruturas subcelulares ainda pouco conhecidas (Liscum e Munn, 1999; Blanchette-Mackie, 2000) e cuja actividade implica o gasto de ATP (de Grella e Simoni, 1982). O colesterol livre biosintetizado ao nível do RE (ver 3.1.) é rapidamente transferido para a membrana citoplásmica (Liscum e Munn, 1999), ao passo que o exógeno, derivado do colesterol das lipoproteínas, é hidrolisado nos lisossomas antes de ser transportado para a membrana e outros organitos intracelulares como o aparelho de Golgi e o RE (Liscum e Munn, 1999; Blanchette-Mackie, 2000). Quando a capacidade de incorporação de colesterol livre na membrana citoplásmica é superada, este é reenviado para o RE, onde inibe a sua biossíntese e é esterificado pela acil coenzima A:colesterol acil transferase (ACAT) para ser armazenado (Liscum e Munn, 1999). Por fim, a redistribuição do colesterol livre da membrana para outras áreas da célula e/ou a sua saída da célula, dá-se através das regiões *caveolae* (Fielding e Fielding, 1995).

1.2. O colesterol móvel e os espaços de renovação

Do colesterol livre presente nos tecidos e órgãos, uma fracção é substituída por colesterol de origem plasmática. Essa fracção varia segundo os tecidos e órgãos, de 5-25% (sistema nervoso) a 100% (eritrócitos, fígado, supra-renais) (Chevallier, 1967). O conjunto formado pelo colesterol livre substituível e plasmático é apelidado de colesterol móvel (Chevallier, 1967; Peng *et al.*, 1973). A velocidade de renovação deste colesterol móvel também varia consoante o tecido ou órgão em causa. No suíno, Marsh *et al.* (1972) e Aigueperse (1979) definiram vários grupos de tecidos e órgãos, tendo em conta

a rapidez com que se dá a troca do seu colesterol livre por colesterol livre plasmático: o primeiro, onde tal troca é muito rápida, inclui os pulmões e o fígado; o segundo grupo, muito próximo deste, reúne as supra-renais e a medula óssea; o terceiro, onde as trocas são nitidamente mais lentas, inclui a pele, o tecido adiposo, o intestino delgado, o coração, a aorta, os rins e os ovários; o quarto e último grupo, com trocas muito lentas, inclui o cérebro e a medula espinal.

1.3. Organização do sistema colesterol

O colesterol presente no organismo de um mamífero pode-se representar num sistema aberto, compreendendo um compartimento central (o colesterol plasmático) no qual vão confluir o colesterol de origem alimentar após absorção intestinal e o colesterol biosintetizado pelos tecidos e órgãos (secreção interna) (Figura 1). Todo o factor que intervenha na dinâmica do sistema originará uma variação no conteúdo em colesterol do seu compartimento central e portanto no complexo equilíbrio que existe entre a biossíntese, transporte e utilização do esterol (Aigueperse, 1979).

Num organismo em homeostasia, a renovação do colesterol está assegurada por dois processos de entrada, a absorção intestinal do colesterol alimentar e a secreção interna de colesterol via síntese *de novo*, e vários débitos de saída. Cada uma destas saídas realiza-se num órgão específico, segundo um mecanismo próprio e constitui um sub-sistema catenário ligado ao compartimento central (Lutton, 1990). Assim, o fígado é o órgão responsável pela transformação do colesterol em ácidos biliares, assegurando por intermédio da bÍlis o débito de colesterol e ácidos biliares para o lúmen intestinal (Lutton e Brot-Laroche, 1979). Os tecidos esteroideogénicos transformam o colesterol em hormonas esteróides que serão, elas mesmas ou os seus metabolitos, eliminadas pelos rins. Por fim, a descamação e secreção sebácea da pele constituem uma outra via de eliminação de colesterol do organismo, difícil de quantificar (Mathé e Lutton, 1984). Quando se verifica uma ruptura ao nível da homeostasia do sistema colesterol e se observam situações de acumulação ou retenção anormal deste esterol, estas detectam-se essencialmente ao nível do plasma, fígado e medula óssea (Marsh *et al.*, 1972).

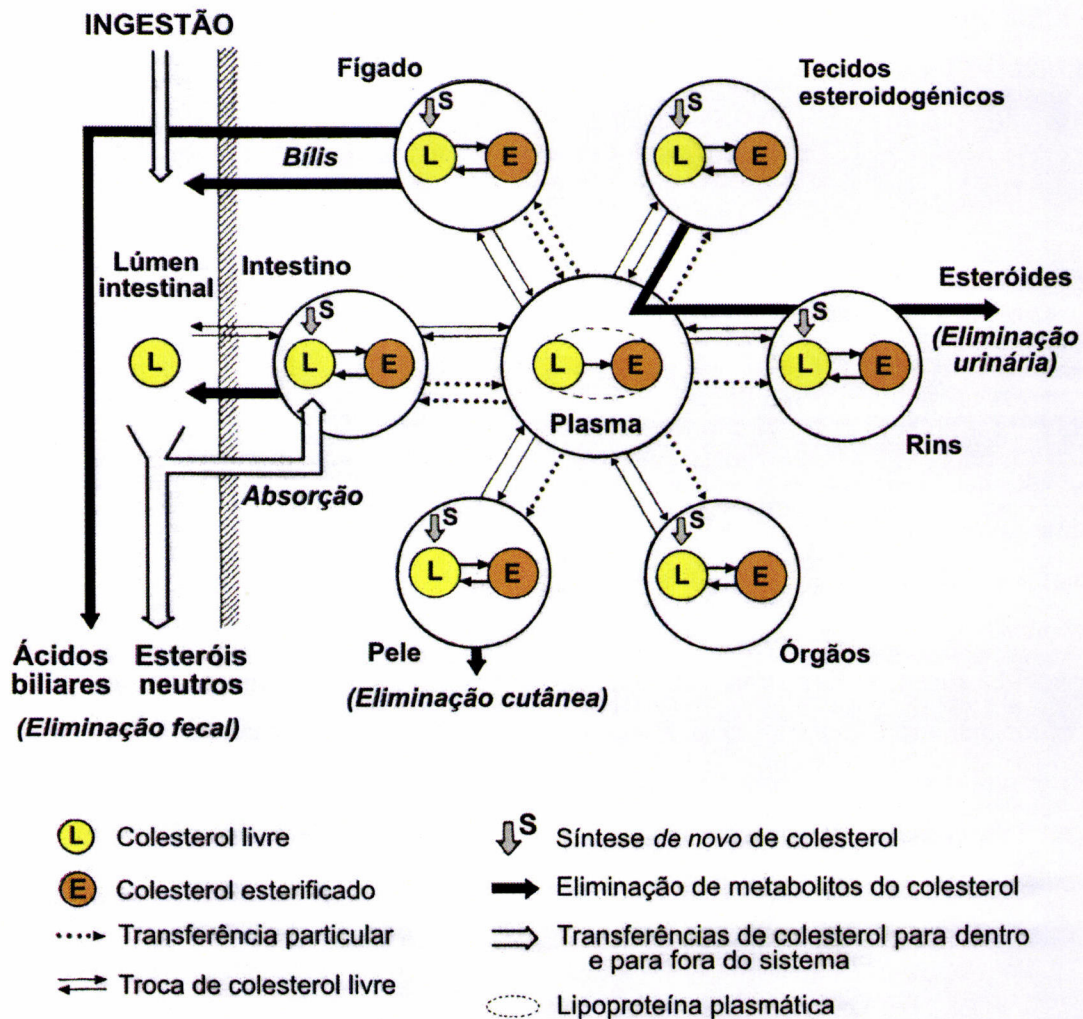


Figura 1. Topologia do sistema colesterol em mamíferos (Adaptado de Lutton, 1990).

Ao nível celular, as vias de entrada e saída de colesterol são várias. A entrada pode ser feita através dum influxo dito selectivo do colesterol das lipoproteínas plasmáticas para a membrana citoplásmica (Via 1) e pela captação das lipoproteínas inteiras (Via 2). A síntese *de novo* constitui um outro modo de aparição intracelular deste esterol (Via 3). Por seu lado, a saída de colesterol das células pode resultar do seu efluxo membranar para apoproteínas ou lipoproteínas plasmáticas (Via 4), da secreção de lipoproteínas inteiras (Via 5) e da sua transformação em produtos metabólicos (ácidos biliares nos hepatócitos ou hormonas esteróides nas células dos tecidos e órgãos esteroideogênicos) (Via 6). O colesterol também é utilizado para a síntese de novas membranas no momento da divisão celular (Via 7). A importância relativa destas diferentes vias é, obviamente, função do tipo de célula estudado e do seu estado metabólico (Zubay, 1998). Como já referido (ver 1.2.), as velocidades de troca de colesterol entre o plasma e os vários tecidos (Vias 1/2-4/5) variam de acordo com o tecido em estudo (Marsh *et al.*, 1972; Aigueperse, 1979), ao passo que a biossíntese de colesterol (Via 3) e a sua utilização

para a formação de novas membranas (Via 7), são mais activas nas células em divisão rápida (como as da mucosa intestinal) e nas células em fraco ou nulo contacto com as lipoproteínas plasmáticas (Mathé e Lutton, 1984).

2. O COLESTEROL PLASMÁTICO

Na linfa e plasma dos mamíferos, o colesterol e outros lípidos são transportados entre os locais de absorção (tracto gastrintestinal) e biossíntese (principalmente fígado e intestino) e os locais de utilização e armazenamento essencialmente sob a forma de lipoproteínas (Miller e Lewis, 1981; Chapman e Forgez, 1985). Estas são agregados macromoleculares formados por um núcleo apolar hidrófobo de triacilgliceróis e colesterol esterificado, rodeado por uma camada polar hidrófila de fosfolípidos (na sua maioria fosfatidilcolina, uma lecitina), colesterol livre e substâncias proteicas (entre as quais as apolipoproteínas ou apoproteínas), além de vários tipos de moléculas antioxidantes lipossolúveis (Zubay, 1998) (Figura 2).

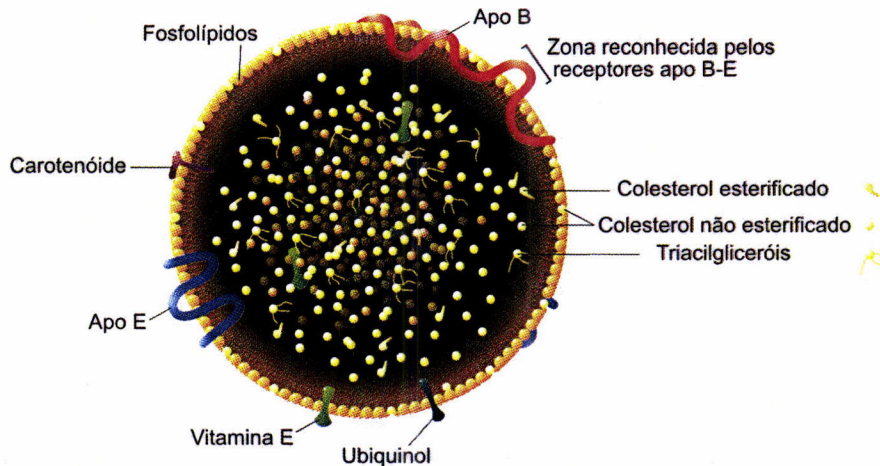


Figura 2. Estrutura e composição das lipoproteínas plasmáticas: exemplo de uma LDL (Adaptado de Bruckert, 1997).

Pelo menos 12 apoproteínas (apo) foram já identificadas nas lipoproteínas humanas, as quais apresentam uma extensa homologia com as apoproteínas de outros mamíferos (Chapman, 1980). Tal sugere a existência de um gene ancestral comum para as apoproteínas dos membros desta classe (Barker e Dayhoff, 1977). As apoproteínas são sintetizadas nos ribossomas do RE e podem ser secretadas na sua forma simples ou como constituintes de superfície das lipoproteínas (Zubay, 1998). Estes compostos

exercem papéis específicos, como a activação da fosfatidilcolina:esterol O-acil transferase ou lecitina:colesterol acil transferase (LCAT) (apo A_I) (Fielding *et al.*, 1972), a regulação da actividade da lipoproteína lipase (LpL) (a apo C_{II} activa-a e a C_{III} inibe-a) e são reconhecidas por receptores celulares (apo A, B e E) (Mahley e Innerarity, 1983).

Existem várias classificações propostas para as lipoproteínas, mas a com base nas densidades hidratadas (*d*) generalizou-se no Homem e foi tacitamente aplicada aos modelos animais, assumindo que nestes as lipoproteínas apresentariam densidades semelhantes e que se distribuiriam de forma idêntica às dos humanos (Chapman, 1986). Esta classificação das lipoproteínas animais manteve-se até aos dias de hoje, apesar de algumas discrepâncias, como a separação incompleta das LDL e HDL perto do limite definido pelo valor de $d = 1,063 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Mills e Taylaur, 1971). No Homem, as lipoproteínas são geralmente classificadas em quilomicrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermédia (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Zubay, 1998) (Quadro II). Tal como na maioria dos modelos animais, as suas três classes preponderantes são as VLDL, as LDL, as HDL e suas subclasses (Chapman, 1980; Terpstra *et al.*, 1982a; Vitic e Stevanovic, 1993). Regra geral, à medida que aumenta a densidade e diminui o diâmetro das lipoproteínas, vai decrescendo o seu conteúdo em triacilgliceróis e aumentando a sua concentração em proteína, colesterol e fosfolípidos (Chapman, 1980). Outras classes de lipoproteínas menos expressivas, como a lipoproteína (a), com características físico-químicas semelhantes às das LDL mas incluindo uma apoproteína denominada apo(a) ligada à apo B-100 e cujo papel ainda é pouco conhecido, ou lipoproteínas típicas de situações patológicas como a lipoproteína X, uma lipoproteína anormal comum em casos de colestase e com uma grande proporção de fosfolípidos e colesterol esterificado (Bruckert, 1997), não serão matéria de estudo sistemático nesta revisão.

Quadro II. Características e composição em apoproteínas das principais classes lipoproteicas plasmáticas humanas (Adaptado de Zubay, 1998)

	Quilomicrons	VLDL	IDL	LDL	HDL
Densidade ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	< 0,950	0,950 - 1,006	1,006 - 1,019	1,019 - 1,063	1,063 - 1,210
Diâmetro (nm)	75 a 1200	30 a 80	25 a 35	18 a 25	5 a 12
Mobilidade electroforética	Origem	Pré- β	Entre β e pré- β	β	α
Composição em apoproteínas	A _I , A _{II} e A _{IV} B-48 C _I , C _{II} e C _{III} E	B-100 C _I , C _{II} e C _{III} E	B-100 C _I , C _{II} e C _{III} E	B-100 E	A _I e A _{II} C _I , C _{II} e C _{III} D E

Havel *et al.* (1955) e Janado *et al.* (1966) levaram a cabo os primeiros estudos de identificação e caracterização das diferentes classes lipoproteicas no suíno. Este animal, levando em conta o perfil de distribuição e a composição das suas lipoproteínas, é tido como um dos modelos animais que maiores semelhanças apresenta com o Homem (Fidge, 1973; Johansson e Karlsson, 1976; Chapman, 1980; Vitic e Stevanovic, 1993).

2.1. Repartição do colesterol

Em condições fisiológicas e alimentares consideradas normais, a maioria das espécies animais apresenta uma colesterolémia total entre 1 e 5 mmol·L⁻¹ (Chapman, 1980; Terpstra *et al.*, 1982a). Segundo a bibliografia (ver Anexo Ia)⁽¹⁾, em suínos em crescimento esta varia entre 2,11 e 2,59 mmol·L⁻¹.

A repartição do colesterol livre e esterificado pelas lipoproteínas varia com a espécie animal em estudo (Quadro III). Dentro da mesma espécie, as proporções relativas de colesterol livre e esterificado variam também em função da classe de lipoproteínas considerada, sendo geralmente as LDL e as HDL as que contêm maiores proporções deste último. No Homem, suíno e rato, cerca de 2/3 do colesterol plasmático está esterificado por ácidos gordos de cadeia longa, como por exemplo os ácidos linoleico, oleico e palmítico (Chapman, 1980; Ha e Barter, 1982; Berlin *et al.*, 1985).

Quadro III. Composição das principais classes lipoproteicas no Homem, suíno e rato (Adaptado de Mills e Taylaur, 1971 e *Fidge, 1973)

	VLDL			LDL			HDL		
	Homem	Suíno*	Rato	Homem	Suíno*	Rato	Homem	Suíno*	Rato
Componentes (% MS):									
Proteína	7,7	5,4	5,4	20,9	17,7	24,9	51,9	45,8	32,8
Triacilgliceróis	49,9	63,5	75,0	11,2	10,2	18,5	8,0	2,0	1,7
Fosfolípidos	18,6	20,6	11,2	22,1	23,9	21,2	22,7	22,4	28,1
Colesterol									
- Livre	6,7	3,8	4,0	9,0	8,9	8,6	2,9	3,9	3,6
- Esterificado	14,9	6,7	4,3	38,0	39,4	26,8	15,0	26,0	33,6

2.2. Principais lipoproteínas plasmáticas: origem e destino

As lipoproteínas plasmáticas são sintetizadas no fígado (Infante *et al.*, 1969) e intestino (Wu e Windmueller, 1979; Chapman, 1982) ou formadas no plasma por transformação de lipoproteínas preexistentes (Eisenberg, 1980). No entanto, a forma

⁽¹⁾ Sempre que necessário, as unidades foram transformadas em unidades do Sistema Internacional.

como os seus componentes se unem para lhes dar origem é ainda matéria de estudo. A teoria mais aceite aponta para uma agregação dos vários constituintes ao longo da migração do RE para o aparelho de Golgi, onde se formariam vesículas secretoras que se fundem com a membrana celular e libertam as lipoproteínas nascentes no plasma e na linfa (Zubay, 1998). Assim, o aparecimento das gotículas lipídicas ricas em triacilgliceróis precursoras das lipoproteínas dá-se no retículo endoplásmico liso (REL) (Green e Glickman, 1981), migrando através de microtúbulos até ao retículo endoplásmico rugoso (RER) (Pavelka e Gangl, 1983). Aqui, dá-se a esterificação do colesterol pela ACAT (Hashimoto e Fogelman, 1980; Shutler, 1988) e a síntese dos fosfolípidos e das apoproteínas, que em conjunto com algum colesterol livre se incorporam nas lipoproteínas em formação. A proteína microsomal de transferência de triacilgliceróis (MTP – “microsomal triglyceride transfer protein”) presente nos hepatócitos e nos enterócitos é responsável pelo transporte dos triacilgliceróis e ésteres de colesterol do RE para as lipoproteínas nascentes (Gordon *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 2002). Estas sofrem então uma migração intratubular até ao aparelho de Golgi, onde a fracção glucídica lhes é anexada por reacções de glicosilação. As lipoproteínas migram então até à membrana celular basolateral em vesículas golgianas e são libertadas por pinocitose reversa (Mathé e Lutton, 1984). Esta descrição clássica da migração intracelular das lipoproteínas com passagem pelo aparelho de Golgi como etapa indispensável à sua secreção não é única, tendo sido sugerida uma via secretória alternativa RE – membrana citoplásmica (Morre, 1981). Depois de libertadas, as lipoproteínas sofrem transformações devidas a trocas e transferências dos seus constituintes, bem como à acção das enzimas LpL e LCAT (Figura 3). O colesterol desempenha um papel importante nestes acontecimentos e crê-se ser também essencial à estabilidade da própria lipoproteína (Chapman, 1986).

2.2.1. Os quilomicrons

Durante o período pós-prandial, os quilomicrons ditos nascentes são sintetizados no RE dos enterócitos, onde os seus componentes lipídicos se associam à fracção proteica (essencialmente apo A e B-48) sintetizada nos ribossomas (Ho *et al.*, 1989). A sua função principal no Homem (Rachmilewitz *et al.*, 1980), suíno (Aigueperse *et al.*, 1983) e outros mamíferos (Chevallier e Vyas, 1963; Rudel *et al.*, 1972) é transportar os triacilgliceróis sintetizados a partir dos ácidos gordos e monoacilgliceróis alimentares, bem como o colesterol esterificado a partir do colesterol livre de origem alimentar (Zilversmit, 1967). A quantidade de colesterol transportado por estas lipoproteínas depende assim do estado nutricional do animal, aumentando no período pós-prandial e com o consumo de regimes alimentares ricos em colesterol (Mathé e Lutton, 1984).

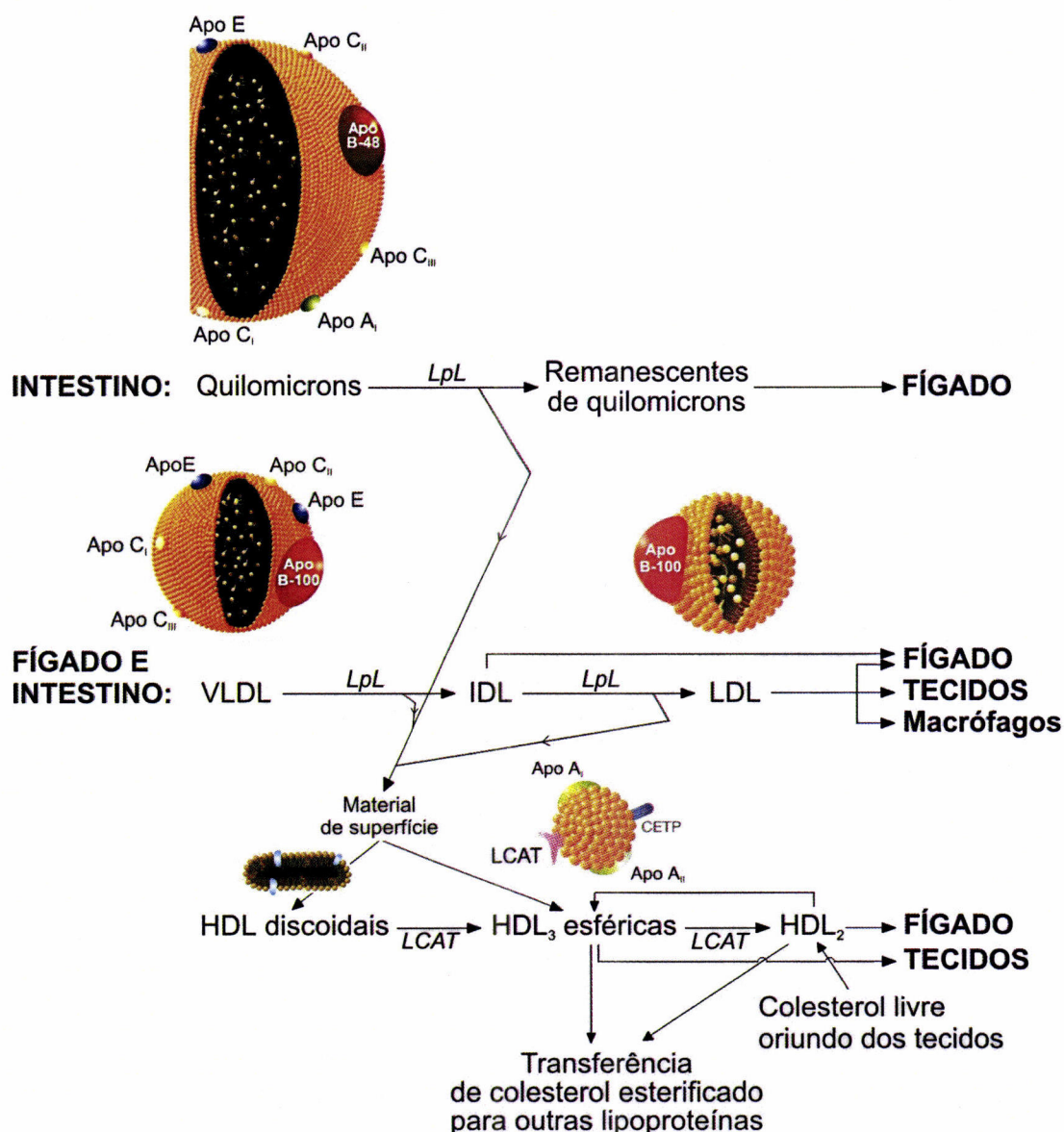


Figura 3. Principais origens, destinos e transformações intraplasmáticas das lipoproteínas (Adaptado de Bruckert, 1997).

Os quilomicros nascentes são libertados nos canais linfáticos e conduzidos até à veia subclávia. A sua composição varia da linfa para o sangue devido à integração de proporções variáveis de colesterol livre e esterificado (Chevallier e Mathé, 1964) e de certos péptidos oriundos das HDL, em particular a apo C_{II}, activadora da LpL, e a apo E (Havel *et al.*, 1973). Os seus componentes maioritários, os triacilgliceróis, são hidrolisados pela LpL presente na sua superfície e na dos endotélios capilares dos tecidos periféricos (essencialmente tecido adiposo, cardíaco e muscular esquelético) e hepáticos (Borensztajn, 1979). Tal processo leva à redução do diâmetro dos quilomicros, ao seu enriquecimento em colesterol e provoca a transferência de constituintes de superfície (fosfolípidos, colesterol livre e apo A e C) para as HDL já

formadas (Redgrave e Small, 1979) ou para as HDL ditas discoidais (Eisenberg, 1983). A partícula resultante, o remanescente ("remnant") de quilomicon, tem como apoproteínas maioritárias a apo B-48 e a apo E (Gardner e Mayes, 1978).

A permanência dos remanescentes de quilomicrons no plasma é curta. Eles são catabolizados primordialmente no fígado, após serem captados e internalizados por receptores específicos de apo B/E ou de LDL e de apo E ou LRP ("LDL receptor-related protein") (Andersen *et al.*, 1977; Windler *et al.*, 1980a; Mahley *et al.*, 1981). A ação destes últimos é preponderante (Mahley *et al.*, 1981) e o aporte em colesterol livre e esterificado de origem alimentar resultante deste catabolismo origina a inibição da sua síntese *de novo* hepática (Nervi *et al.*, 1975). Os remanescentes de quilomicrons podem também ser captados por receptores presentes noutros órgãos como o coração, mas a sua contribuição para o catabolismo destas lipoproteínas é menor (Myant, 1982). Tal deve-se à maior facilidade com que estas partículas atravessam o endotélio lacunar (*fenestrae*) dos capilares sinusóides hepáticos e se acumulam nos espaços de Disse, por comparação ao que se passa nos tecidos extra-hepáticos (Pittman *et al.*, 1979).

2.2.2. As VLDL

Estas lipoproteínas não uniformemente grandes (Havel, 1984) são sintetizadas pelo fígado e acessoriamente pelo intestino (Fidge e Poulis, 1978; Chapman, 1982). As VLDL humanas e suínas não apresentam distinções estruturais particulares (Fidge, 1973; Fidge e Poulis, 1974; Jackson *et al.*, 1977) nem diferenças significativas na sua apoproteína maioritária, a apo B, bem como nas menos importantes apo C_I, C_{III} e E (Knipping *et al.*, 1975; Chapman, 1986). Tal como no Homem, a apo B suína é polimórfica e apresenta formas circulantes diferentes, consoante a sua origem é intestinal (apo B-48) ou hepática (principalmente apo B-100) (Chapman e Forgez, 1985; Ho *et al.*, 1989). A função primordial das VLDL é o transporte dos triacilgliceróis resultantes do metabolismo endógeno (síntese *de novo* a partir do acetil CoA ou captação de ácidos gordos livres transportados pela albumina na circulação sanguínea) para os tecidos extra-hepáticos (Mayes e Topping, 1974). Estas lipoproteínas também transportam ésteres de colesterol alimentar e desempenham um papel preferencial no transporte do colesterol sintetizado *de novo* (Férézou *et al.*, 1982; Aigueperse *et al.*, 1983). No suíno, a proporção de colesterol por elas transportado é pequena (Terpstra *et al.*, 1982a; Aigueperse *et al.*, 1983), bem como a sua importância relativa no perfil lipoproteico (Janado *et al.*, 1966; Mills e Taylaur, 1971), a qual representa cerca de 10% do verificado no Homem (Cooper *et al.*, 1992). Quando em presença de consumo alimentar de colesterol e da sua acumulação hepática, as VLDL enriquecem-se neste esterol à custa do seu conteúdo em

triacilgliceróis, mas não se verifica um aumento no número de partículas sintetizadas (Kang e Davis, 2000). As VLDL diminuem assim de diâmetro e passam a apresentar uma mobilidade electroforética β . Esta classe de lipoproteínas, as β -VLDL, apresenta propriedades idênticas em humanos e suínos (Mahley, 1978).

O catabolismo das VLDL assemelha-se ao dos quilomicrons: as lipoproteínas perdem a maioria dos triacilgliceróis sob a acção da LpL e certos constituintes superficiais (fosfolípidos, colesterol livre e apo C e E) são transferidos para as HDL (Glangeaud *et al.*, 1977). As partículas resultantes, ricas em colesterol esterificado e denominadas remanescentes de VLDL ou IDL, sofrem nova acção da LpL e também da lipase hepática ou pancreática (Garner e Smith, 1972; Aigueperse, 1979) presente no endotélio dos capilares hepáticos e dos tecidos esteroideogénicos. Tal leva a um novo empobrecimento em triacilgliceróis, fosfolípidos e apo E, convertendo as IDL em LDL. As IDL que não são convertidas, de maiores dimensões e mais ricas em apo E que as LDL, são sequestradas nos espaços de Disse hepáticos e rapidamente catabolizadas pelos receptores de LDL e LRP (Havel, 1984; Dietschy *et al.*, 1993). Recentemente foi sugerido que a LpL existente nos remanescentes de quilomicrons e de VLDL promoveria a ligação destas lipoproteínas, bem como da LDL, aos seus receptores (Goldberg, 1996).

2.2.3. As LDL

Do ponto de vista da sua composição proteica, as LDL têm sido consideradas como um produto do catabolismo intravascular das VLDL (Aigueperse, 1979). A contribuição dos quilomicrons para a sua formação é mais discutível, uma vez que os seus remanescentes são rapidamente captados pelo fígado, apresentando uma meia-vida ($t_{1/2}$) no plasma de 4 a 5 minutos (Van't Hooff *et al.*, 1982), contra os 40 a 70 minutos das VLDL (Fidge e Poulis, 1974). No entanto, a síntese hepática *de novo* das LDL parece desempenhar um papel importante no Homem (Janus *et al.*, 1980) e em suínos (Nakaya *et al.*, 1977; Huff e Telford, 1985; Cooper *et al.*, 1992). As LDL suínas ($1,019 < d < 1,074$ g·mL⁻¹) (Fidge e Smith, 1975) compostas por cerca de 50% de colesterol, representam nesta espécie e no Homem a principal via de transporte do esterol (Johansson e Karlsson, 1976; Terpstra *et al.*, 1982a; Chapman, 1986; Vitic e Stevanovic, 1993), atingindo esta cerca de 60% do colesterol total plasmático. Tal domínio aumenta com o aporte alimentar de colesterol (Mahley, 1978; Shutler, 1988).

As subclasses polimórficas LDL₁ e LDL₂ suínas (Janado *et al.*, 1966), similares às LDL₂ e LDL₃ humanas, diferem ligeiramente em diâmetro (Calvert e Scott, 1975), no peso molecular (Janado *et al.*, 1966) e na densidade (Janado *et al.*, 1966; Calvert e Scott, 1975). Em animais normocolesterolémicos a forma predominante é a mais pequena e

densa (LDL₂) (Calvert *et al.*, 1975), mas o consumo de colesterol alimentar leva ao aumento do seu transporte essencialmente pelas LDL₁ (Cooper *et al.*, 1992). Quando comparadas com as humanas, as LDL suínas contêm ligeiras diferenças na concentração e composição em hidratos de carbono (Azuma *et al.*, 1975), mas apresentam uma composição em aminoácidos idêntica (Calvert e Scott, 1975), a mesma mobilidade electroforética β (Jackson *et al.*, 1976) e uma composição quase exclusiva em apo B-100, química e imunologicamente análoga à humana (Calvert e Scott, 1975; Fidge e Smith, 1975; Chapman e Goldstein, 1976). Esta apoproteína deriva de um compartimento de LDL pré-formadas, bem como da síntese *de novo* hepática (Nakaya *et al.*, 1977; Huff e Telford, 1985). Assim, dois factores podem influenciar o número de LDL circulantes em suínos: a velocidade de catabolização dos remanescentes de VLDL ou IDL e a da síntese hepática de apo B-100.

A $t_{1/2}$ plasmática das LDL suínas é de cerca de 23 horas, sendo ligeiramente mais curta nas LDL₂ que nas LDL₁ (Calvert *et al.*, 1975). Estudos *in vitro* e *in vivo* verificaram que no suíno cerca de 50% do catabolismo total das LDL é hepático, essencialmente via receptores de LDL (Pittman *et al.*, 1979). Os tecidos esteroideogénicos possuem também estes receptores (Brown *et al.*, 1979) e catabolizam a lipoproteína para utilizar o seu colesterol na síntese de hormonas esteróides (Ohashi *et al.*, 1982). Quando as LDL e β -VLDL sofrem modificações, por exemplo por acetilação ou oxidação, o seu reconhecimento e captação passa a ser feito por receptores específicos presentes em grande quantidade nas membranas de macrófagos tissulares e monócitos plasmáticos. Tais receptores só são parcialmente regulados por efeitos de retro-inibição, tendo um papel depurativo ("scavenger") destas lipoproteínas (Brown e Goldstein, 1983; Mahley e Innerarity, 1983). Um dos membros desta família de receptores depurativos é a SR-BI ("scavenger receptor, class B, type I") (Acton *et al.*, 1994).

2.2.4. As HDL

As HDL são um grupo heterogéneo de lipoproteínas de pequeno diâmetro e ricas em proteína, no qual se distinguem, segundo a sua composição e densidade decrescentes, as subclasses polimórficas HDL₃, HDL₂ e HDL₁. Presentes no Homem em pequenas quantidades (Weisgraber e Mahley, 1980), as HDL₁ não foram isoladas no suíno, onde só se têm detectado HDL₃ e HDL₂ (Barter *et al.*, 1981; Chapman e Forgez, 1985), com predominio da primeira (Chapman, 1986). Sob o efeito de regimes ricos em colesterol, forma-se uma nova classe destas lipoproteínas, onde a maioria da apo A₁ é substituída por apo E. Estas lipoproteínas de grandes dimensões e ricas em colesterol esterificado, designadas por HDL_C, são captadas pelos receptores de LDL e LRP de tecidos hepáticos

e periféricos, apresentando mesmo uma afinidade superior à das LDL para tais receptores. As HDL_c foram já detectadas no plasma do Homem, suíno, rato e coelho hipercolesterolémicos, entre outros (Mahley, 1978; Mahley e Innerarity, 1983).

As HDL são secretadas pelo fígado e acessoriamente pelo intestino delgado, como partículas discoidais pobres em ésteres de colesterol e ricas em fosfolípidos. Estas lipoproteínas contêm grandes proporções de apo A_I e alguma apo E (partículas de origem hepática) ou apo A_{II} (partículas de origem intestinal) (Tall e Small, 1978). Estas apo A_I e apo E apresentam características catalisadoras e propriedades físicas, químicas e imunológicas idênticas no Homem e no suíno (Jackson *et al.*, 1973; Knipping *et al.*, 1975). As HDL discoidais sofrem um processo de maturação em HDL₃ esféricas e ulteriormente em HDL₂ e HDL₁, modulado pela incorporação de constituintes de superfície libertados pelo catabolismo das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (quilomicrons e VLDL) (Redgrave e Small, 1979; Eisenberg, 1983) e por acumulação de ésteres de colesterol, derivados i) da esterificação do colesterol livre da sua superfície, ii) da lipólise dos quilomicrons e das VLDL, e/ou iii) do efluxo a partir das membranas celulares dos tecidos periféricos (Eisenberg, 1983) e hepáticos (Borst *et al.*, 2000), via mecanismos ainda em estudo envolvendo receptores proteicos SR-BI (Acton *et al.*, 1996) e/ou proteínas transmembranares ABCA1 ("ATP-binding cassette transporter A1") (Borst *et al.*, 2000; Repa *et al.*, 2000) (ver 2.2.5.).

A esterificação do colesterol livre implicada na maturação das HDL é catalisada pela LCAT, uma enzima cujo cofactor é a apo A_I (Fielding *et al.*, 1972; Glomset e Norum, 1973; Jackson *et al.*, 1973), mas que também pode ser activada pelas apo A_{IV}, C_{II} (Knipping, 1986) e E (Kostner *et al.*, 1987). A LCAT mamífera é uma glicoproteína secretada pelo fígado que se liga reversivelmente às lipoproteínas plasmáticas (principalmente às HDL) (Stokke, 1974) e que catalisa a transferência de um ácido gordo da posição sn-2 de uma molécula de lecitina para o grupo 3 β -OH do colesterol livre, esterificando-o (Glomset e Norum, 1973). O tipo de ácidos gordos que esterificam o colesterol plasmático depende da natureza dos lípidos alimentares (Gidez *et al.*, 1965; Ramesha *et al.*, 1980). Apesar de também ser capaz de esterificar o colesterol livre das LDL (Kostner *et al.*, 1987), a LCAT esterifica preferencialmente o das HDL, dado que a baixa relação colesterol livre:fosfolípidos destas lipoproteínas apresenta um efeito modulador da sua actividade (Glomset e Norum, 1973; Knipping, 1986). Os ésteres de colesterol que se vão acumulando nas HDL, são posteriormente transferidos para outras classes de lipoproteínas pela proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP – "cholesterol ester transfer protein") (Zilversmit *et al.*, 1975; Chajek e Fielding, 1978; Pattnaik *et al.*, 1978). Tal processo, muito activo no coelho (Zilversmit *et al.*, 1975; Ha e Barter, 1982) e activo no Homem (Chajek e Fielding, 1978; Barter *et al.*, 1981), é limitado

no suíno (Aigueperse, 1979; Barter *et al.*, 1981; Ha e Barter, 1982), no rato e no cão (Ha e Barter, 1982). Na realidade, o suíno apresenta menos de 20% da actividade da CETP humana (Ha e Barter, 1982; Kostner *et al.*, 1987), o que justifica a menor homogeneidade nos ácidos gordos dos ésteres de colesterol das várias classes de lipoproteínas deste animal. Assim, o ácido gordo predominante nos ésteres de todas as classes lipoproteicas do Homem é o ácido linoleico (Chapman, 1980; Ha e Barter, 1982) ao passo que nas HDL e LDL suínas são o linoleico e o linoleico e oleico, respectivamente (Barter *et al.*, 1981; Berlin *et al.*, 1985). Quando activa, a CETP modula o intercâmbio de colesterol esterificado entre as HDL₃ e HDL₂, e entre estas e as VLDL e/ou LDL, por troca com moléculas de triacilgliceróis (Chajek e Fielding, 1978; Barter *et al.*, 1981) e de fosfolípidos (Kostner *et al.*, 1987). Uma proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP – “phospholipid transfer protein”), bastante activa no plasma dos suínos, estaria também envolvida nas trocas deste lípido entre as lipoproteínas (Pussinen *et al.*, 1995).

A esterificação do colesterol livre pela LCAT nas HDL diminui a sua relação colesterol livre:fosfolípidos, permitindo-lhes assim tornar-se potentes receptores deste esterol e promover o efluxo de colesterol livre celular, fonte essencial do colesterol que elas transportam (Stein *et al.*, 1975). Esta captação de colesterol livre pelas HDL parece estar na base da sua função anti-aterogénica, originada pelo transporte reverso do colesterol (“reverse cholesterol transport”) dos tecidos periféricos e vasculares para o fígado e tecidos esteroideogénicos (Gordon *et al.*, 1977). Apesar de serem detectadas elevadas taxas de captação de ésteres de colesterol das HDL nas supra-renais e ovários, o maior influxo verifica-se nos hepatócitos (Glass *et al.*, 1983). As HDL ricas em ésteres de colesterol contêm uma maior concentração em apo E, apresentando uma maior hipótese de serem catabolizadas pelo fígado e o seu colesterol excretado (Mahley *et al.*, 1981).

A $t_{1/2}$ das HDL no plasma suíno é de cerca de 8 h (Carew *et al.*, 1976). No entanto, o seu complexo catabolismo não está totalmente elucidado. No fígado, têm sido referidos processos de transferência de colesterol sem internalização das HDL e/ou degradação da sua apolipoproteína (Rothblat *et al.*, 1978; Attie *et al.*, 1982; Glass *et al.*, 1983), quer após a hidrólise da sua fosfatidilcolina pela LpL (Bamberger *et al.*, 1983), quer via receptores SR-BI (Acton *et al.*, 1996). Este último mecanismo está também presente nos tecidos esteroideogénicos (Glass *et al.*, 1983). Por seu lado, processos envolvendo a internalização das HDL por intermédio de receptores de LDL, LRP e de receptores de HDL ainda não identificados (Acton *et al.*, 1999) (ver 2.2.6.) são também citados. Para além do fígado, os rins são outro dos locais de catabolismo da apoproteína maioritária das HDL, a apo A₁. Dissociadas de partículas de HDL pobres em colesterol, estas apoproteínas sofrem uma filtração glomerular seguida de uma reabsorção e degradação nas células epiteliais dos túbulos proximais (Hammad *et al.*, 1999).

2.2.5. Fluxos de colesterol entre as lipoproteínas e as membranas citoplásmicas

Ao contrário do colesterol esterificado, o colesterol livre das lipoproteínas plasmáticas é uma molécula extremamente móvel e de renovação mais rápida que as suas componentes apoproteicas. Fluxos bidireccionais de colesterol livre são detectados entre as diferentes lipoproteínas plasmáticas (Goodman, 1964; Aigueperse, 1979), entre estas e as membranas citoplásmicas de eritrócitos (Bell *et al.* 1972; Aigueperse, 1979), adipócitos (Kovanen e Nikkila, 1976), macrófagos (Werb e Cohn, 1971) e hepatócitos, ou entre membranas de organitos celulares como mitocôndrias e microssomas (Bell, 1978). O mecanismo actualmente mais aceite para explicar tais fluxos propõe a libertação e difusão passiva do colesterol entre a estrutura doadora e a receptora através da fase aquosa do micro-ambiente membranar que as separa, mesmo tendo em conta a baixa solubilidade deste esterol (Phillips *et al.*, 1980; Bojesen, 1982). Suportando tal hipótese, verifica-se que os fluxos de colesterol entre células e lipoproteínas obedecem a cinéticas de 1ª ordem e que a energia de activação da transferência atinge valores elevados (Lange *et al.*, 1983), idênticos aos da solubilização do colesterol em água (Haberland e Reynolds, 1973).

Os fluxos por difusão passiva são um processo bidireccional que pode ou não dar origem a transferências líquidas de colesterol para as células ou para o plasma (Bailey e Butler, 1973; Aigueperse, 1979). Tal depende do estado metabólico e propriedades bioquímicas e físicas de doadores e receptores (Phillips *et al.*, 1987; Fielding e Fielding, 2001). Os fluxos bidireccionais são equivalentes quando a relação colesterol livre:fosfolípidos nas membranas da lipoproteína e das células é semelhante, mas uma transferência líquida de colesterol tem lugar sempre que uma delas apresentar tal relação reduzida (resultante de uma esterificação do colesterol livre pela LCAT, por exemplo), o que a torna um receptor ávido (Bruckdorfer e Graham, 1976; Rothblat e Phillips, 1982). Assim, as diferentes velocidades de troca observadas em função do tipo celular podem ser parcialmente devidas à composição química das suas membranas citoplásmicas: o hepatócito, onde o influxo de colesterol plasmático é rápido, possui uma membrana com uma relação colesterol livre:fosfolípidos mais baixa que a do eritrócito (Bruckdorfer e Graham, 1976). Os fluxos também são influenciados pela composição da membrana lipoproteica, a qual difere em função da classe da lipoproteína e da natureza da alimentação (em particular da sua riqueza em colesterol). Para as duas grandes classes de lipoproteínas dos mamíferos (LDL e HDL), a relação molar média colesterol livre:fosfolípidos é maior nas LDL, admitindo-se assim que a maioria das trocas de colesterol livre do plasma e em particular o efluxo membranar se deve às HDL (Rothblat *et al.*, 1978; Fournier *et al.*, 1996). Esta opinião prevalece mesmo no Homem (Fielding e

Fielding, 1982) e no suíno (Terpstra *et al.*, 1982a), onde as LDL transportam a maioria do colesterol plasmático. A mobilidade do colesterol livre depende também do diâmetro das lipoproteínas que o irão captar. As lipoproteínas de pequeno diâmetro como as HDL discoidais (ou pré-βHDL) podem aproximar-se mais da superfície celular doadora e, sendo pobres em colesterol, captam facilmente colesterol livre dos tecidos. No entanto, elas servem só de intermediários, cedendo o colesterol captado a outras lipoproteínas de maiores dimensões como as HDL, onde o colesterol livre é retido após esterificação pela LCAT (Atger *et al.*, 1997). Por fim, a hidrólise dos fosfolípidos de superfície das LDL e HDL pela acção da LpL (Bamberger *et al.*, 1983) e/ou da lipase hepática (Garner e Smith, 1972; Jansen e Hulsmann, 1980) pode também intervir na modulação do fluxo do colesterol livre das lipoproteínas para as membranas celulares adjacentes. Este mecanismo de difusão pelo meio aquoso predomina nas células em crescimento e nas células não enriquecidas em colesterol, sendo considerado importante para a manutenção da homeostase celular do colesterol (Mendez, 1997).

Um segundo mecanismo recentemente implicado nos fluxos de colesterol e detectado essencialmente em células ricas neste esteroide ou com um crescimento lento ou nulo, envolve a intervenção de apoproteínas (apo A_I, A_{II} e E) livres de ou pobres em lípidos (Mendez, 1997). O papel destes compostos proteicos, presentes na linfa e no plasma, foi confirmado quando se detectou que péptidos exibindo estruturas α-helicoidais anfipáticas como as das apoproteínas eram capazes de promover por contacto celular directo o efluxo lipídico tão eficientemente como as lipoproteínas nativas (Yancey *et al.*, 1995; Mendez, 1997). O efluxo modulado pelas apoproteínas induz sinais intracelulares que promovem a migração do colesterol até à membrana plasmática (Mendez, 1997) e depende de receptores de especificidade alargada, como a SR-BI (Acton *et al.*, 1994 e 1996). Este receptor transmembranar, um membro da família das proteínas CD36 também presente no suíno (Martinez *et al.*, 2000; Panzenboeck *et al.*, 2002) é um receptor ubíquo, se bem que particularmente abundante nos tecidos hepáticos e esteroideogénicos (Acton *et al.*, 1994, 1996 e 1999). As suas funções envolvem i) a adesão/fixação de apoproteínas (na forma livre ou como constituintes das lipoproteínas) à membrana celular (Acton *et al.*, 1999; Rothblat *et al.*, 1999) sem a sua metabolização ou a internalização da lipoproteína (Rothblat *et al.*, 1978; Attie *et al.*, 1982; Glass *et al.*, 1983) e ii) a facilitação dos fluxos bidireccionais de colesterol livre entre as células dos tecidos periféricos e as estruturas receptoras (apoproteínas ou lipoproteínas), bem como a do influxo selectivo de colesterol esterificado das estruturas transportadoras para as células hepáticas e esteroideogénicas. Esta facilitação passaria pelo rearranjo da distribuição do colesterol e fosfolípidos membranares, o que promove o seu fluxo sequencial (a perda de fosfolípidos seguida da do esteroide) (Yancey *et al.*, 1995) ou simultâneo (Rothblat *et al.*,

1999), por um processo de microsolubilização membranar mediado pelas estruturas receptoras (Gillotte *et al.*, 1998), particularmente eficaz em macrófagos (Yancey *et al.*, 1995). Deste modo, a acção das SR-BI repercute-se de forma decisiva nos níveis plasmáticos de colesterol, na composição e diâmetro das lipoproteínas circulantes e no conteúdo em colesterol hepático e biliar, entre outros (Krieger, 1999; Rothblat *et al.*, 1999). Por outro lado, a acção destes receptores também explicaria as observações de influxo celular de colesterol esterificado superiores àquele obtido só com a internalização de lipoproteínas (Rothblat *et al.*, 1978; Fielding *et al.*, 1979), que anteriormente foram sugeridas como o resultado de uma entrada da lipoproteína inteira seguida da sua retro-endocitose após delipidação lipídica parcial ou de uma transferência de colesterol esterificado para a célula sem internalização da lipoproteína (Mathé e Lutton, 1984). Os mecanismos moleculares subjacentes à acção das SR-BI não estão ainda totalmente identificados (Lu *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003), o mesmo se passando com os factores que afectam a regulação da sua expressão, apesar de haverem indicações que as SREBP ("sterol regulatory element-binding proteins") (ver 3.4.1.4.) intervêm na activação nuclear do gene *SR-BI* (Krieger, 1999). Para além da captação de HDL, a SR-BI também fixa via apoproteína as LDL, as LDL modificadas (Acton *et al.*, 1994) e as VLDL (Calvo *et al.*, 1997), sugerindo assim uma actividade de captação multi-lipoproteica baseada em mais que um domínio de captação. Uma isoforma destes receptores, a SR-BII, apresenta a mesma afinidade de ligação para as HDL que a SR-BI, mas transfere o colesterol com uma eficácia 4 vezes inferior (Webb *et al.*, 1998). O influxo selectivo de colesterol esterificado das IDL, LDL e HDL para as células parece também ser modulado pelos denominados LBS ("lipoprotein binding site"), receptores detectados *in vitro* mas ainda não peremptoriamente diferenciados das SR-BI (Rhainds e Brissette, 1999). Por fim, a recente descoberta da intervenção das proteínas transmembranares ABCA1 no efluxo unidireccional activo de colesterol livre (provavelmente após o efluxo de fosfolípidos) das células dos tecidos periféricos para as apo A₁ pobres em lípidos e as HDL (Borst *et al.*, 2000; Wade e Owen, 2001) (Figura 4), veio demonstrar que os processos de fluxo deste esteroide e a sua troca entre lipoproteínas e membranas celulares não estão ainda totalmente elucidados. Espelhando a complexidade dos mecanismos moleculares subjacentes, estudos recentes em macrófagos humanos confirmaram que a acumulação celular de colesterol ou dos seus metabolitos oxidados (oxisteróis) activa um receptor nuclear específico, o LXR ("liver X receptor") que forma um heterodímero com o receptor nuclear RXR ("retinoid X receptor") e se liga a uma sequência de DNA específica (LXRE - "LXR response element") no promotor do gene *ABCA1*, estimulando a sua transcrição (Wade e Owen, 2001; Zhang e Mangelsdorf, 2002) (ver Figura 8). A intervenção das ABCA1 no efluxo de colesterol livre para as apo A₁, protegendo assim estes percursos

das HDL de um rápido catabolismo, implica-as também no processo de formação das HDL maduras (Wade e Owen, 2001) e na modulação do transporte reverso de colesterol, como observado em células endoteliais de capilares cerebrais de suínos (Panzenboeck *et al.*, 2002). A independência deste mecanismo activo de regulação do fluxo de colesterol foi confirmada, nomeadamente por experiências que comprovam que a ruptura do aparelho de Golgi o anula, sem afectar o efluxo passivo de colesterol (Mendez, 1997).

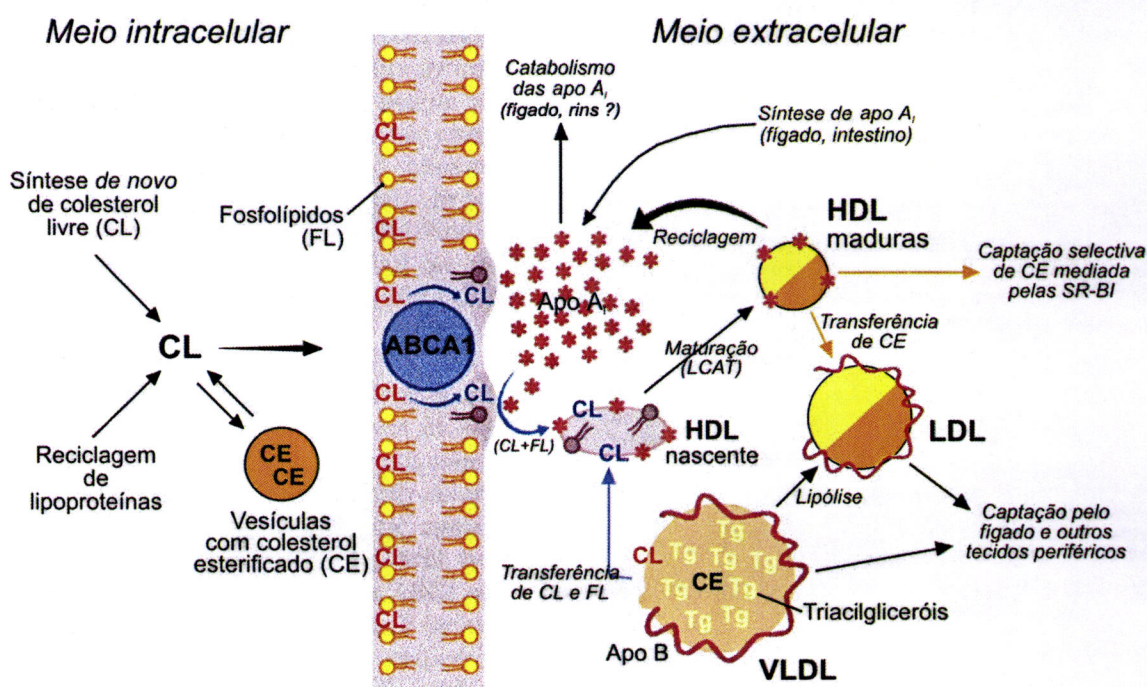


Figura 4. Intervenção das ABCA1 no efluxo de colesterol livre celular (Adaptado de Young e Fielding, 1999)

2.2.6. Captação intracelular de lipoproteínas inteiras

A penetração na célula de uma lipoproteína inteira induz um influxo de colesterol livre e esterificado, podendo efectuar-se por pinocitose ou por ligação a receptores de elevada ou baixa afinidade, seguida de endocitose (Mathé e Lutton, 1984) (Figura 5).

A pinocitose retira as lipoproteínas do plasma a uma taxa que depende da sua concentração nesse meio e o influxo de colesterol assim obtido é proporcional à sua concentração plasmática (Silverstein *et al.*, 1977). No entanto, a sua contribuição para a captação intracelular total de lipoproteínas *in vivo*, é modesta (Davies e Ross, 1980).

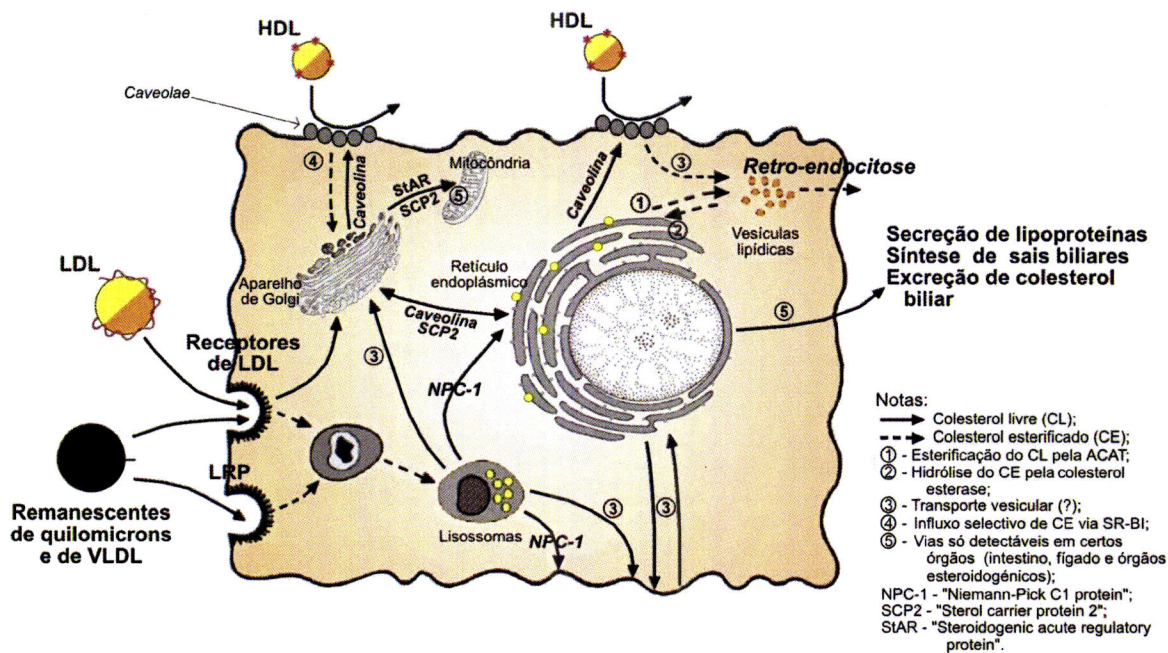


Figura 5. Mecanismos de captação de lipoproteínas inteiras (Adaptado de Acton *et al.*, 1999).

Um outro mecanismo de captação de lipoproteínas implica a sua ligação a receptores celulares transmembranares saturáveis e a sua internalização, facto confirmado *in vitro* (Floren e Nilsson, 1977; Bachorik *et al.*, 1982) e *in vivo* (Floren *et al.*, 1977; Mahley e Innerarity, 1983). Dos vários receptores de elevada afinidade descobertos até hoje, o mais estudado foi o ubíquo receptor de apo B/E ou de LDL (Goldstein e Brown, 1974). Esta glicoproteína medeia as principais etapas de captação e degradação de uma lipoproteína inteira por endocitose de forma semelhante em humanos e suínos (Bachorik *et al.*, 1976; Weinstein *et al.*, 1976). No caso particular das LDL, a sua captação depende do reconhecimento da apo B (Goldstein e Brown, 1977), mais propriamente do domínio N-terminal da sua cadeia peptídica, contendo arginina e cisteína positivamente carregadas (Mahley *et al.*, 1981). No entanto, todas as lipoproteínas contendo apo B ou apo E (as LDL, HDL, HDL_c ricas em apo E, mas também remanescentes de quilomicrons, de VLDL e VLDL ricas em triacilgliceróis) podem ligar-se a estes receptores dependentes do Ca²⁺, localizados em regiões específicas da membrana celular ricas na proteína clatrina ("clathrin coated regions"). Estas regiões formam então depressões ("clathrin coated pits") e originam endossomas que migram pelo citosol (Goldstein *et al.*, 1979; Mahley *et al.*, 1981). Os endossomas transportam o colesterol livre e a esfingomiéline lipoproteica directamente ao RE e o remanescente da lipoproteína até aos lisossomas (Fielding e Fielding, 2001), onde o conteúdo proteico da lipoproteína é rapidamente hidrolisado. A lipase ácida lisossomal hidrolisa o colesterol esterificado e o colesterol livre

resultante, ao ser transportado para a membrana celular e para o RE, induz três respostas moduladoras da homeostase celular do colesterol: i) o aumento da actividade da ACAT, facilitando a reesterificação do colesterol livre e a sua acumulação em vesículas de armazenamento; ii) a diminuição da actividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA) reductase, e iii) a diminuição da síntese de receptores de LDL, reduzindo a entrada ulterior de colesterol por esta via (Brown e Goldstein, 1976; Mahley e Innerarity, 1983). Por outro lado, quando cultivadas em soro desprovido de lipoproteínas, fibroblastos humanos (Goldstein e Brown, 1974), células musculares lisas da aorta (Weinstein *et al.*, 1976) e hepatócitos (Bachorik *et al.*, 1982) de suíno vêm a sua concentração em colesterol diminuir e a actividade da HMG CoA reductase aumentar, bem como o número de receptores de LDL. Estes factos apontam para a existência de um controlo da síntese destes receptores pela entrada de colesterol na célula. Este controlo dá-se via activação dos factores de transcrição SREBP, os quais induzem a transcrição nuclear dos genes dos receptores de LDL, entre outros (Brown e Goldstein 1999) (ver 3.4.1.4.). O número destes receptores de LDL difere consoante o tipo celular, sendo geralmente elevado no fígado, supra-renais e ovários de animais adultos ingerido regimes isentos de colesterol (Dietschy *et al.*, 1993). Em suínos em crescimento Large White x Landrace, Shutler (1988) detectou actividades elevadas de ligação das [¹²⁵I]LDL no fígado, menos importantes no estômago, duodeno, rins, baço, testículos e nódulos linfáticos, e fracas no miocárdio, aorta, músculo esquelético, tecido adiposo e pâncreas. A remoção de 70 a 80% do colesterol das LDL do plasma é assim imputada aos receptores de LDL hepáticos (Bachorik *et al.*, 1985; Dietschy *et al.*, 1993).

Um outro tipo de receptores saturáveis dependentes do Ca²⁺, os LRP, captam as lipoproteínas através do reconhecimento de uma região específica da cadeia peptídica da sua apo E, que contém resíduos positivamente carregados de arginina e lisina, internalizando e metabolizando-as pela acção de endossomas e lisossomas (Havel *et al.*, 1980; Mahley *et al.*, 1981). O fígado contém receptores LRP e de LDL, mas a rápida metabolização dos remanescentes de quilomicrons é efectuada por intermédio da primeira classe de receptores, como já foi demonstrado no rato (Windler *et al.*, 1980a), no Homem, no suíno e no cão (Mahley *et al.*, 1981). Contrariamente aos receptores de LDL, cujo elevado número no animal jovem diminui com a idade ou varia em função de factores fisiológicos e nutritivos (jejum e ingestão de colesterol ou de colestiramina), o número de receptores LRP e a sua actividade parecem permanecer relativamente constantes e independentes de tais variações (Mahley *et al.*, 1981; Kovanen *et al.*, 1981).

A ligação de partículas de HDL ou das suas apoproteínas a locais específicos das membranas celulares, nomeadamente de hepatócitos, seguida da sua internalização e metabolização (Bachorik *et al.*, 1985; de Crom *et al.*, 1992), tem sido verificada

experimentalmente. No entanto, ainda não se identificaram os mecanismos através dos quais se dá a captação das HDL, ricas em apo A₁, nem se confirmou a existência de receptores específicos de HDL ou de apo A (Acton *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 2000). Dois dos candidatos a receptores de HDL são as glicoproteínas transmembranares HB₁ e HB₂ ("HDL-binding proteins 1 and 2") (Matsumoto *et al.*, 1997). Esta última expressa-se em níveis elevados no intestino delgado, fígado, pulmões, cérebro e próstata (Acton *et al.*, 1999). Quando se transfere o seu DNA clonado para células em cultura, a expressão da HB₂ leva a um aumento da captação celular de HDL. A síntese de HB₂, inversamente correlacionada com o conteúdo celular em colesterol, sugere uma coordenação directa ou indirecta com o metabolismo do colesterol (Matsumoto *et al.*, 1997). A importância deste tipo de receptores parece no entanto ser secundária em relação à captação selectiva de colesterol pelas SR-BI (Acton *et al.*, 1999).

Actualmente reconhece-se uma outra classe de receptores de lipoproteínas, constituída por receptores de baixa afinidade. Estes estão presentes, por exemplo, nas membranas de macrófagos, dos linfócitos, dos fibroblastos e das células musculares lisas (Fielding e Fielding, 1982). Sendo muito semelhantes aos receptores de LDL, saturando com 4 vezes mais LDL que HDL_c e exigindo a presença de Ca²⁺ para a captação das lipoproteínas, estes receptores diferem dos de LDL pela sua especificidade de captação alargada a várias moléculas além das lipoproteínas. Por fim, e ao contrário do que acontece no caso da intervenção dos receptores de alta afinidade, o colesterol captado pelos receptores de baixa afinidade parece não ter os mesmos efeitos ao nível do seu metabolismo celular (biossíntese e esterificação) (Attie *et al.*, 1982). No entanto, a sua contribuição para equilibrar o efluxo de colesterol *in vivo* parece não ser desprezível, pelo menos ao nível dos fibroblastos e das células vasculares (Mathé e Lutton, 1984).

2.3. Controlos fisiológicos da colesterolémia

Segundo certos autores, a colesterolémia da espécie suína pode ser influenciada pela idade, sexo e peso corporal, mas segundo outros, não. Vários autores (Carroll *et al.*, 1973; Hitz *et al.*, 1987; Kwekkeboom *et al.*, 1990a; Lingaas *et al.*, 1992; Valencia e Chavez, 1997) referem que o aumento nos níveis de colesterol do nascimento ao desmame, seguido do seu decréscimo para os valores iniciais, estaria relacionado com o consumo de leite materno (rico em colesterol) e não com a idade dos animais *per se*. Por outro lado, Dubreuil e Lapierre (1997) notaram em animais desmamados um aumento do colesterol plasmático das 8 às 16 semanas de idade, estabilizando este posteriormente até ao fim do estudo (20 semanas), ao passo que Berlin *et al.* (1985) assinalaram uma correlação negativa entre a colesterolémia e a idade de suínos miniatura entre os 6

meses e os 10 anos, mas só nos machos. O efeito do sexo na colesterolémia tem sido inconclusivo. Fausch *et al.* (1968) e Tumbleson *et al.* (1976) observaram em machos valores de colesterolémia inferiores aos detectados em fêmeas adultas, mas Jurgens e Peo (1970) indicaram resultados inversos e Mersmann *et al.* (1979) não detectaram diferenças. Por seu lado, Rothschild e Chapman (1976) afirmaram que o peso corporal teria uma influência significativa nos níveis de colesterol sanguíneo, ao contrário da idade e do sexo. Estas discrepâncias de resultados foram relacionadas por alguns autores com a raça dos animais utilizados e não com os factores em análise. No entanto, em estudos com várias raças de suínos e seus cruzamentos, Pond *et al.* (1986) e Lingaas *et al.* (1992) não detectaram nenhum efeito da raça na colesterolémia. Por fim, autores como Mersmann *et al.* (1979) e Martincic *et al.* (1984) apontam para uma influência preponderante do regime alimentar nos níveis lipídicos sanguíneos destes animais, ficando os outros factores referidos por efeitos secundários mas não nulos.

3. BIOSÍNTESE DO COLESTEROL

Estudos envolvendo a utilização de marcadores isotópicos e o cálculo de balanços provaram que os mamíferos são capazes de sintetizar colesterol. A origem da sua síntese foi inicialmente ligada à água e ao acetato, excelentes precursores dos lípidos insaponificáveis da levedura (Bloch e Rittenberg, 1942). No entanto, só em 1954 é que Bloch sugeriu o que hoje é uma opinião unânime: cada carbono do colesterol provém do carbono metilo ou carboxilo do acetato, por uma série de condensações sucessivas (Vance e Van den Bosch, 2000).

3.1. Etapas da biossíntese do colesterol

O colesterol pode ser sintetizado *de novo* em células de vários órgãos e tecidos como o intestino, o fígado e os tecidos esteroideogénicos. A sua biossíntese, extremamente complexa, apresenta alguns passos catalisados por enzimas que se localizam no citosol celular e outros por enzimas que se encontram na membrana do RE (McKee e McKee, 1999) (Figura 6).

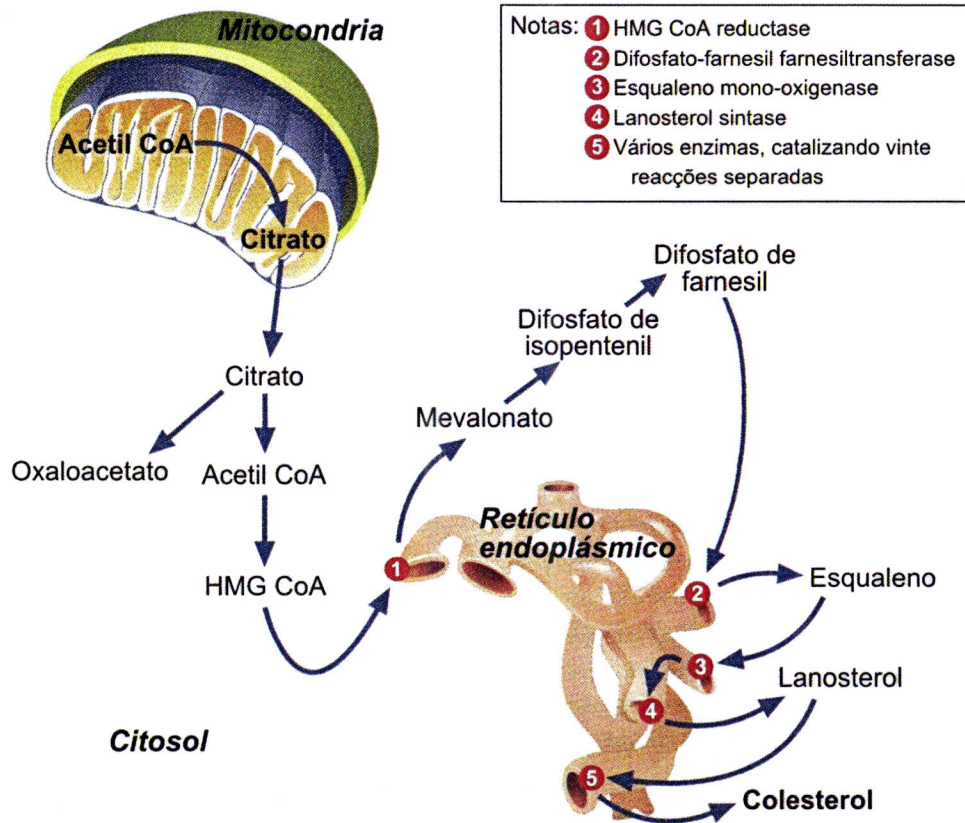


Figura 6. Principais etapas da síntese celular do colesterol (Adaptado de McKee e McKee, 1999).

3.1.1. Do acetil coenzima A ao mevalonato

O colesterol é sintetizado nos mamíferos a partir do acetil CoA, derivado da oxidação intramitocondrial do ácido pirúvico e dos ácidos gordos, e transportado para o citosol pelo sistema de transporte do citrato. A primeira etapa desta síntese envolve a condensação sequencial de três moléculas de acetil CoA pelas enzimas acetil CoA C-acetiltransferase (também conhecida por aceto-acetiltransferase ou β -cetotilase) (Lynen, 1953) e HMG CoA sintase. Estas reações originam a HMG CoA (Lynen *et al.*, 1958) que se acumula nas mitocôndrias (onde é utilizada na cetogénese) e na vizinhança e membrana citosólica do RE (onde é utilizada na síntese do colesterol). Nestas duas localizações intracelulares encontram-se também as enzimas acetil CoA C-acetiltransferase e HMG CoA sintase, o que está de acordo com a observada independência entre as vias de síntese dos corpos cetónicos e dos esteróis. A HMG CoA é posteriormente reduzida pela HMG CoA reductase microssomal a mevalonato, um composto com 5 átomos de carbono (C_5) (Bucher *et al.*, 1960). Na sequência destas observações, passou a considerar-se como a primeira enzima da via biossintética do colesterol a acetil CoA C-acetiltransferase citosólica e não a HMG CoA reductase microssomal (Mathé e Lutton, 1984).

3.1.2. Do mevalonato ao esqualeno

A transformação do mevalonato em esqualeno tem como cofactor o trifosfato de adenosina (ATP) (Amdur *et al.*, 1957). O mevalonato é fosforilado via mevalonato cinase e fosfomevalonato cinase, conduzindo à formação do 5-difosfomevalonato. Este origina o difosfato de isopentenil por uma reacção de desidratação-descarboxilação, também dependente do ATP e catalisada pela difosfomevalonato descarboxilase. O difosfato de isopentenil sofre então uma condensação com um seu isómero, o difosfato de dimetilalil, levando à formação do difosfato de geranil (C₁₀). Uma segunda condensação entre o difosfato de geranil e o difosfato de isopentenil origina o difosfato de farnesil (C₁₅) (Chaykin *et al.*, 1958). As enzimas envolvidas nestas reacções são a dimetilalil-*trans*-transferase e a geranil-*trans*-transferase, isoladas pela primeira vez em hepatócitos de ave por Reed e Rilling (1975). Por fim, uma condensação de duas unidades de difosfato de farnesil leva à formação do esqualeno (C₃₀) (Dugan e Porter, 1972).

3.1.3. Formação do núcleo esterol: do esqualeno ao colesterol

O mecanismo de ciclização do esqualeno em lanosterol foi sugerido por Woodward e Bloch (1953), tendo Gibbons *et al.* (1982) identificado as enzimas responsáveis pela oxidação e ciclização do esqualeno como a esqualeno 2,3-oxidase e a esqualeno 2,3-oxidociclase. O lanosterol é já uma estrutura do tipo esterol. A sua acumulação celular desencadeia mais 20 etapas que conduzem à formação do colesterol (C₂₇). Esta é conseguida através de algumas alterações fundamentais: o desaparecimento do grupo metilo 14 α , a saturação da dupla ligação Δ^{24} da cadeia lateral, a perda dos grupos metilo 4 α e 4 β e a passagem da dupla ligação de Δ^8 para Δ^5 (Zubay, 1998).

Para se realizar, a biossíntese celular de colesterol depende do transporte dos substratos até às enzimas intervenientes no processo. Tal função foi relacionada com pequenas proteínas citosólicas transportadoras de esteróis (SCP – “sterol carrier proteins”) capazes de se ligar aos precursores do colesterol e de os transportar até aos microsomas, onde se encontram as enzimas ligadas à biossíntese do colesterol, estimulando-a (Bell, 1975; Scallen *et al.*, 1975). A ubíqua SCP2 apresenta maiores concentrações precisamente ao nível dos hepatócitos, enterócitos e células esteroideogénicas dos tecidos dos mamíferos (Vahouny *et al.*, 1987).

3.2. Débito da secreção interna de colesterol

Quando consumindo regimes alimentares semi-sintéticos sem colesterol, fêmeas suínas adultas Large White apresentaram uma secreção interna deste esterol de $22 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso vivo (PV) (Aigueperse, 1979). No Homem ela varia entre os 10 e $20 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ PV (Férézou e Chevallier, 1986) mas em ratos chega aos $50 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ PV (Dietschy *et al.*, 1993). Esta secreção contribui com 2 a 3 vezes mais colesterol para o “pool” corporal que a absorção do colesterol presente em regimes alimentares ditos tradicionais (Lu *et al.*, 2001). Por outro lado, ela apresenta uma adaptabilidade enorme às variações das necessidades do organismo neste esterol para o crescimento celular e a síntese de ácidos biliares e hormonas, podendo-as satisfazer mesmo na ausência de aportes de colesterol exógeno (Dietschy *et al.*, 1993).

Segundo Dietschy *et al.* (1993) no período fetal de várias espécies animais, onde a maioria do colesterol necessário ao crescimento tissular provém da síntese *de novo*, a secreção interna de colesterol é 3 a 4 vezes superior à registada nos animais adultos. Já em recém-nascidos, tal secreção atinge só o dobro da verificada nos adultos. Assim, a secreção interna vai-se reduzindo com a idade, atingindo valores em animais idosos 60% inferiores aos de animais jovens e sexualmente maduros. Esta secreção interna de colesterol eleva-se bastante durante a gestação e a lactação (Lutton e Chevallier, 1972a). A interrupção cirúrgica do ciclo enterohepático dos ácidos biliares (Lutton *et al.*, 1973), bem como o consumo da resina colestiramina e de componentes fibrosos do regime como a pectina (Mathé *et al.*, 1977), contribuem para o aumento da excreção fecal dos ácidos biliares e do colesterol, aumentando significativamente a secreção interna deste esterol. No entanto, ela é muito deprimida ao adicionar-se colesterol ao regime alimentar (Marsh *et al.*, 1972; Mathé e Chevallier, 1979).

3.3. Locais de síntese do colesterol

Nos mamíferos, apesar de virtualmente todos os tecidos poderem sintetizar este esterol (Spady e Dietschy, 1983), o fígado, o intestino e os tecidos esteroideogénicos são considerados como os principais locais da síntese *de novo* de colesterol (Brown e Goldstein, 1976; Lutton, 1976; Dietschy *et al.*, 1993). Apesar disto, as variações que afectam a secreção interna de colesterol estão relacionadas fundamentalmente com as grandes modificações detectadas na síntese hepática de colesterol, visto a síntese intestinal ser mais estável e a síntese nos tecidos esteroideogénicos permanecer virtualmente inalterada (Mathé e Lutton, 1984; Dietschy *et al.*, 1993). Assim, em situações onde se limite ou anule o ciclo enterohepático ou quando se induz um aumento na

excreção fecal do colesterol e seus derivados neutros e ácidos, observa-se um aumento na síntese hepática de colesterol e na sua importância relativa (Dietschy *et al.*, 1993).

Os resultados contraditórios observados na literatura em relação à importância relativa da secreção interna hepática e intestinal, podem ser consequência de diferenças ao nível das condições experimentais implementadas e de alguma falta de precisão na comparação e confrontação dos resultados obtidos. Um outro factor preponderante é a espécie em estudo. Em circunstâncias onde a ingestão dos principais macronutrientes foi similar e a de colesterol alimentar nula ou desprezível, o fígado de ratos e ratinhos apresentou um papel preponderante (40-50%) na síntese corporal total do colesterol, mas noutros mamíferos como no coelho, porquinho da Índia e hamsters tal importância atingiu valores inferiores a 20% (Dietschy *et al.*, 1993). Em fêmeas adultas suínas Large White (Aigueperse e Chevallier, 1982) e no Homem, os estudos sugerem que cerca de 50% da síntese total de colesterol é devida ao tracto digestivo e não ao fígado. Por fim, a ingestão de regimes com um nível de colesterol alimentar idêntico ao detectado em dietas do tipo ocidental (entre 300 e 600 mg·d⁻¹) leva a que a síntese hepática seja praticamente suprimida, passando então os tecidos extra-hepáticos a ser responsáveis provavelmente por mais de 80% da síntese corporal total de colesterol em virtualmente todas as espécies mamíferas estudadas (Dietschy *et al.*, 1993; Turley e Dietschy, 2003).

A síntese intestinal de colesterol dá-se essencialmente na mucosa, sendo negligenciável na parede muscular subjacente (Dietschy e Siperstein, 1965). Ela também depende da localização do enterócito no intestino delgado e da sua posição na vilosidade. Assim, em ratos consumindo regimes semi-sintéticos com ou sem colesterol, a síntese de colesterol, avaliada pela actividade da HMG CoA reductase ou pela utilização *in vivo* de vários precursores do colesterol, é cerca de 2 vezes superior no intestino proximal que no distal, com um gradiente de síntese decrescente em direcção ao íleo (Sugano *et al.*, 1980; Perrodin e Lutton, 1985). Estudos *in vitro* e *in vivo* apontam para uma síntese 2 a 5 vezes mais elevada nas criptas que no topo das vilosidades, qualquer que seja a secção do intestino delgado considerada (Shakir *et al.*, 1978; Perrodin e Lutton, 1985). Assim, a maturação do enterócito ao longo da sua migração na vilosidade é acompanhada por uma diminuição sensível da sua capacidade de sintetizar colesterol, atribuída aos processos de regulação de origem luminal, essencialmente a absorção de colesterol e de ácidos biliares (Dietschy e Siperstein, 1965).

3.4. Controlos fisiológicos da síntese

Quando Tavormina *et al.* (1956) observaram que o [2-¹⁴C]mevalonato era eficazmente convertido em colesterol no fígado, sugeriram que as etapas pós-mevalonato não eram

limitantes para a síntese de colesterol. Posteriormente, Siperstein e Fagan (1966) colocaram esta etapa chave entre a HMG CoA e o mevalonato, atribuindo à HMG CoA reductase o papel de primeira enzima da síntese de colesterol. Se hoje se sabe que esta não é a primeira enzima da síntese, o papel essencial desempenhado pela HMG CoA reductase como etapa limitante na síntese de colesterol não foi posto em causa. Na realidade, em condições fisiológicas que influenciam a velocidade de síntese do colesterol, a actividade de enzimas como a acetil CoA C-acetiltransferase varia paralela mas mais lentamente que a da HMG CoA reductase. Tal comportamento sugere que as primeiras etapas da síntese de colesterol actuam como um mecanismo secundário de regulação dessa mesma síntese (Mathé e Lutton, 1984). No intestino humano, a etapa pós-HMG CoA de desmetilação do lanosterol pode também actuar como um outro mecanismo secundário de regulação da síntese de colesterol (Tabacik *et al.*, 1981). Por fim, o consumo de regimes ricos em colesterol leva a uma inibição crescente ao longo do tempo das actividades da difosfomevalonato descarboxilase, da dimetilalil-*trans*-transferase e da difosfato-farnesil farnesiltransferase, enzimas intervenientes na conversão de HMG CoA em esqualeno (Slakey *et al.*, 1972). Tais factos sugerem assim uma resposta coordenada das enzimas que participam na biossíntese do colesterol em função da variação de factores ambientais e/ou alimentares.

3.4.1. Principais factores que influenciam a actividade da HMG CoA reductase e a velocidade de biossíntese do colesterol

3.4.1.1. Modificações ao longo do desenvolvimento

Nos mamíferos, a actividade da HMG CoA reductase hepática sofre uma ligeira redução no fim da 1ª semana pós-nascimento, estabilizando então até ao desmame, altura em que se observa um aumento sensível da sua actividade. Nos enterócitos, o decurso dos acontecimentos é idêntico, mas a redução verifica-se logo desde os primeiros dias pós-nascimento (Carroll *et al.*, 1973; Hahn e Smale, 1982). Tais factos parecem depender do conteúdo em colesterol do leite materno (Carroll *et al.*, 1973; Rioux e Innis, 1993; Devlin *et al.*, 1998) e da diminuição dos níveis de colesterol plasmático no período pós-desmame (Carroll *et al.*, 1973; Kwekkeboom *et al.*, 1990a; Valencia e Chavez, 1997). Em ratos, a estimulação do crescimento por injeções de triiodotironina entre o 5º e 12º dias, aumentaram a actividade da HMG CoA reductase hepática. Este efeito, não detectado no intestino e no tecido adiposo castanho, aponta assim para uma influência hormonal sobre a actividade biossintética variável segundo os tecidos em causa (Hahn e Smale, 1982).

3.4.1.2. Variações circadianas

Após a observação inicial de Kandutsch e Saucier (1969) de um ritmo circadiano da síntese hepática de colesterol em murganhos, a actividade da HMG CoA reductase no fígado foi quantificada como sendo 5 a 10 vezes mais elevada durante o período nocturno que durante o período diurno no rato (Shapiro e Rodwell, 1971) e no hamster (Ho, 1975). Em espécies de hábitos diurnos como o suíno e o cobaio, é durante o dia que se verifica a maior actividade da HMG CoA reductase (cuja $t_{1/2}$ é de cerca de 4 h), bem como uma estimulação da sua síntese. No entanto, a sua taxa de degradação mantém-se relativamente constante ao longo do período nictimeral (Rogers *et al.*, 1981). Assim, o ritmo circadiano da actividade da HMG CoA reductase hepática está relacionado com o ritmo das refeições e não com a alternância luz-obscuridade propriamente dita (Edwards *et al.*, 1972), o mesmo se verificando em relação ao ritmo da actividade da colesterol 7α -hidroxilase (Li *et al.*, 1980). A síntese intestinal de colesterol está também sujeita a variações, mas de menor amplitude. Em suínos consumindo um regime comercial, Rogers *et al.* (1981) observaram que a actividade da HMG CoA reductase hepática era cerca de 3 vezes mais elevada às 14.00 que às 9.00 h, ao passo que no intestino delgado tal factor de variação era de 1,6. Esta menor amplitude foi também verificada em ratos (Perrodin e Lutton, 1985). No Homem, dados obtidos extrapolando de resultados *in vitro* (Dietschy e Gamel, 1971; Angel e Bray, 1979) sugerem também uma variação diurna da síntese intestinal de colesterol mais fraca que a hepática.

3.4.1.3. Acções hormonais

O interesse em relação à influência das hormonas do córtex supra-renal na actividade da HMG CoA reductase, esteve sempre ligado ao seu possível papel na manutenção do ritmo circadiano enzimático. A concentração em corticosterona plasmática varia ciclicamente em ratos adaptados a condições regulares de luz/obscuridade (Guillemin *et al.*, 1959) com um pico cinco horas antes da actividade máxima da HMG CoA reductase. No entanto, a remoção cirúrgica das supra-renais tanto origina a abolição do ritmo circadiano e diminuição da actividade enzimática (Edwards, 1973) como só uma diminuição da amplitude do ritmo circadiano (Mitropoulos e Balasubramaniam, 1976).

As hormonas pancreáticas parecem afectar a actividade da HMG CoA reductase hepática, sendo esta estimulada pelo aumento da relação insulina:glucagon plasmática (Forsythe *et al.*, 1986). O efeito da insulina foi recentemente relacionado com o aumento da transcrição da HMG CoA reductase, possivelmente através de um elemento de resposta insulínico presente no seu gene (Ness e Chambers, 2000).

As hormonas da tiróide parecem ter influência na homeostase do colesterol, em particular na sua síntese. Os animais hipertiróidicos aumentam a captação hepática de [¹⁴C]acetato e os níveis de HMG CoA reductase, mas sem conseguir compensar a hipocolesterolemia detectada. O hipotireoidismo por seu lado origina reduções no catabolismo das LDL e na síntese de colesterol, em consonância com a hipercolesterolemia verificada (Gibbons *et al.*, 1982). O mecanismo de acção destas hormonas parece verificar-se ao nível da transcrição (aumento dos níveis de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA)) e da pós-transcrição (aumento da $t_{1/2}$ dos mRNA) da HMG CoA reductase (Ness e Chambers, 2000).

As hormonas sexuais também influenciam a síntese *de novo* do colesterol. Assim, o estradiol aumenta-a e a testosterona diminui-a (Fillios *et al.*, 1958). A progesterona, por seu lado, parece aumentar essa síntese ao bloquear a acção de um derivado oxigenado do colesterol supressor da actividade da HMG CoA reductase, o oxisterol 24(S),25-epoxicolesterol (Panini *et al.*, 1987).

3.4.1.4. Adição de colesterol ao alimento

Já foi demonstrado num grande número de espécies que a adição de colesterol ao regime alimentar provoca uma diminuição na sua biossíntese, ao diminuir a actividade da HMG CoA reductase hepática (Shefer *et al.*, 1973; Rogers *et al.*, 1981; Gibbons *et al.*, 1982; Férézou *et al.*, 1997) e induzir a degradação das moléculas de HMG CoA reductase existentes (McKee e McKee, 1999). Este é assim um exemplo de retro-inibição da velocidade de uma via metabólica pelo seu produto final (Mitropoulos *et al.*, 1981), como o comprova a forte correlação negativa verificada entre o colesterol livre presente na membrana do RE e a actividade da HMG CoA reductase (Gibbons *et al.*, 1982). Em situação de escassez celular de colesterol livre, a modulação da actividade da HMG CoA reductase depende das SREBP-1a e 2. As proteínas precursoras das SREBP, presentes na membrana do RE, são transportadas para o aparelho de Golgi pela proteína SCAP ("SREBP cleavage-activating protein") (Brown e Goldstein, 1999). Aqui, a intervenção sequencial de duas proteases, a S1P ("site-1 protease") e a S2P ("site-2 protease"), levam à clivagem dos seus domínios N-terminais, as SREBP ditas maduras. Estes factores de transcrição entram no núcleo e ligam-se ao SRE ("sterol regulatory element") do promotor do gene *HMG CoA reductase*, desencadeando a sua activação nuclear. Quando se dá a acumulação celular de colesterol e/ou oxisteróis, esta é reconhecida pela SCAP, que em caso de excesso destes compostos não migra para o organito onde a S1P actua, impedindo assim a clivagem inicial (Brown e Goldstein, 1999; Blanchette-Mackie, 2000). Esta acção moduladora não é tão eficaz no intestino, onde a diminuição da síntese de colesterol e da actividade da HMG CoA reductase é muito mais discreta (Ho, 1975;

Lutton, 1976; Rogers *et al.*, 1981). A regulação da expressão do gene *HMG CoA reductase* dá-se ao nível da transcrição em espécies sensíveis ao colesterol como ratinhos e hamsters, mas parece dar-se ao nível pós-transcricional em espécies menos sensíveis como o rato, estando ainda por esclarecer (Ness e Chambres, 2000).

3.4.2. Modulação da eficiência catalítica da HMG CoA reductase

A actividade enzimática da HMG CoA reductase pode ser afectada por mecanismos de fosforilação-desfosforilação. Assim, a incubação de microsomas na presença de Mg^{2+} e de [^{32}P]ATP provoca a fosforilação da enzima e uma diminuição da sua actividade ou mesmo a sua inactivação (Mathé e Lutton, 1984). No entanto, os factores fisiológicos identificados como modulando a actividade da HMG CoA reductase parecem não actuar por alteração do estado de fosforilação da enzima. Brown *et al.* (1979) observaram que a proporção de enzima fosforilada permanece constante em condições que provocam uma variação da actividade enzimática e da síntese de colesterol de cerca de 50 vezes. Venkatesan e Mitropoulos (1982) confirmaram tais observações em hepatócitos, sugerindo que as alterações na actividade desta enzima seriam o resultado de diferenças na concentração de colesterol livre na membrana do RE das células.

4. O PAPEL DO FÍGADO

4.1. O sistema colesterol do fígado

O colesterol hepático encontra-se sob a forma livre e esterificada, detectando-se o primeiro nas estruturas membranares dos hepatócitos e seus organitos celulares e o colesterol esterificado essencialmente no RE, no aparelho de Golgi e nas vesículas de armazenamento. A origem do colesterol livre hepático pode derivar da síntese *de novo* e/ou da transferência de colesterol plasmático por mecanismos de troca bidireccionais ao nível da membrana citoplásmica. Esta transferência de superfície resulta geralmente de uma troca mole a mole, que não altera o conteúdo celular em colesterol (Mathé e Lutton, 1984). No entanto, se uma modificação do equilíbrio aparece, este processo pode originar um fluxo líquido de colesterol para o hepatócito (Rothblat *et al.*, 1978). Um factor determinante neste processo é a relação colesterol livre:fosfolípidos da lipoproteína (ver 2.2.5.). A captação de lipoproteínas inteiras através de receptores específicos (ver 2.2.6.)

é uma via que permite a penetração simultânea de colesterol livre e esterificado nos hepatócitos. O fígado cataboliza a maior parte das lipoproteínas, mas tem uma acção quase exclusiva e determinante no catabolismo dos quilomicrons e seus resíduos (Felts *et al.*, 1975; Andersen *et al.*, 1977; Aigueperse, 1979). Finalmente, a recente descoberta da captação de HDL por receptores SR-BI sem a sua internalização, originando o influxo dito selectivo de ésteres de colesterol (ver 2.2.5.), veio ampliar as vias de entrada referenciadas (Acton *et al.*, 1996 e 1999). O influxo de colesterol livre *in natura* e o resultante da hidrólise do colesterol esterificado, exerce um efeito de retro-inibição sobre a síntese *de novo* hepática (Nervi *et al.*, 1975) e, como nas outras células, pode ser utilizado para a síntese de membranas celulares e/ou esterificado e armazenado em vesículas lipídicas. Por fim, os hepatócitos também podem incorporar colesterol livre em lipoproteínas nascentes e na bília, além de transformá-lo em ácidos biliares (Kempen, 1980; Chapman, 1982).

Tal como os hepatócitos, os macrófagos dos sinusóides hepáticos (células de Küpffer) catabolizam lipoproteínas, mas aparentemente com uma capacidade superior e sem saturarem, pelo que a sua contribuição para o metabolismo das lipoproteínas não deve ser negligenciado (Van Berkel *et al.*, 1978). Estudos *in vitro* demonstraram que os macrófagos catabolizam LDL modificadas não reconhecidas pelos receptores de LDL, intervindo assim na transferência de colesterol para o músculo liso dos vasos sanguíneos. Parte do colesterol esterificado acumulado nos macrófagos seria hidrolisado e exportado da célula, captado pelas lipoproteínas do meio e transferido para as células do músculo liso por mecanismos que não implicariam o sistema de receptores específicos (Stein *et al.*, 1981).

4.2. A biossíntese dos ácidos biliares

Bloch *et al.* (1943) demonstraram que o colesterol é convertido em ácidos biliares no fígado, mas só após os trabalhos de Bergström (1952) e Siperstein *et al.* (1952b) é que esta foi reconhecida como uma via importante na eliminação do colesterol e portanto na sua homeostase. A produção média destes ácidos anfipáticos é inferior a $10 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ PV no Homem e atinge os 20 mg no suíno e os 40 no rato, exprimindo respectivamente cerca de 50, 84 e 86% da excreção total diária do colesterol (Lutton, 1990).

O precursor directo dos ácidos biliares é o colesterol livre hepático originado pela síntese *de novo* microssomal e pela transferência de colesterol plasmático, regra geral de origem alimentar (Dupont *et al.*, 1974; Kim *et al.*, 1975). A contribuição maioritária do colesterol plasmático vem do colesterol livre das HDL e não do das LDL (Schwartz *et al.*, 1978). O fígado também produz fosfolípidos (essencialmente fosfatidilcolina) para serem

incorporados na bÍlis, cuja constituição também inclui colesterol livre, proteÍnas (essencialmente albumina), bilirrubina e gua. A sÍntese e secreção dos ácidos biliares segue um ritmo circadiano intimamente relacionado com o ritmo das tomas alimentares e as vagas pós-prandiais de absorção de ácidos biliares detectadas na veia porta (Haslewood, 1978). Os principais ácidos biliares detectados no Homem e no hamster são os ácidos cólico ($3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihidroxi-5 β -colan-24-óico) e quenodesoxicólico ($3\alpha,7\alpha$ -dihidroxi-5 β -colan-24-óico) (Elliot e Hyde, 1971). No rato, detectam-se também os ácidos α - e β -muriclico ($3\alpha,6\beta,7\alpha$ - e $3\alpha,6\beta,7\beta$ -trihidroxi-5 β -colan-24-óico) (Hsia, 1969). No suÍno, a via sinttica do ácido cólico é praticamente inexistente, sendo o ácido biliar predominante o hiocólico ($3\alpha,6\alpha,7\alpha$ -trihidroxi-5 β -colan-24-óico), resultante da 6 α -hidroxilação do ácido quenodesoxicólico e muito hidrófilo (Haslewood, 1978; Lundell *et al.* 2001). As vias metabólicas que conduzem a estes ácidos biliares ditos primários são duas, diferentes e independentes: a via clássica ou neutra e a via alternativa ou ácida (Figura 7). Esta última foi identificada recentemente (Vlahcvic *et al.*, 1996) e o seu conhecimento e importância relativa não são ainda completos (Souidi *et al.*, 2001).

A via biossintética clássica ou neutra, assim denominada devido ao facto da função carboxÍlica existente no fim da cadeia alifática dos ácidos biliares não aparecer senão nas etapas finais da sÍntese, tem como enzima-chave a colesterol 7 α -hidroxilase (CYP7A1). A via alternativa ou ácida, assim apelidada devido à oxidação da cadeia lateral do colesterol produzir intermediários ácidos, tem como enzima-chave a esterol 27-hidroxilase (CYP27A1) (Stravitz *et al.*, 1996; Vlahcvic *et al.*, 1996). No entanto, na transformação hepática do colesterol em ácidos biliares intervm muitas enzimas diferentes (Russell e Setchell, 1992), numa cascata de reacções ao nÍvel do citosol, do RE, das mitocôndrias e dos peroxissomas (Princen *et al.*, 1997). A sua formação implica o transporte de compostos intermédios hidrófobos para junto dos diferentes sistemas enzimáticos actuantes por proteÍnas citosólicas das células hepáticas (Bell, 1975; Princen *et al.*, 1997). Os cidos biliares primários produzidos são então conjugados com glicina ou taurina no seu terminal carboxilo pela acção da *N*-aciltransferase, de modo a aumentar a sua solubilidade, salificados por Na⁺ e K⁺ (Princen *et al.*, 1997) e secretados activamente na bÍlis (Goodwin e Kliewer, 2002). Os sais biliares são libertados no lúmen duodenal onde, entre outras funções, participam na absorção lipÍdica (Westergaard e Dietschy, 1976). Os principais sais biliares vesiculares do suÍno são as formas glicoconjugadas dos ácidos hiocólico, hiodesoxicólico ($3\alpha,6\alpha$ -dihidroxi-5 β -colan-24-óico) e quenodesoxicólico (Haslewood, 1978; Legrand-Defretin *et al.*, 1986; Férézou *et al.*, 1997).

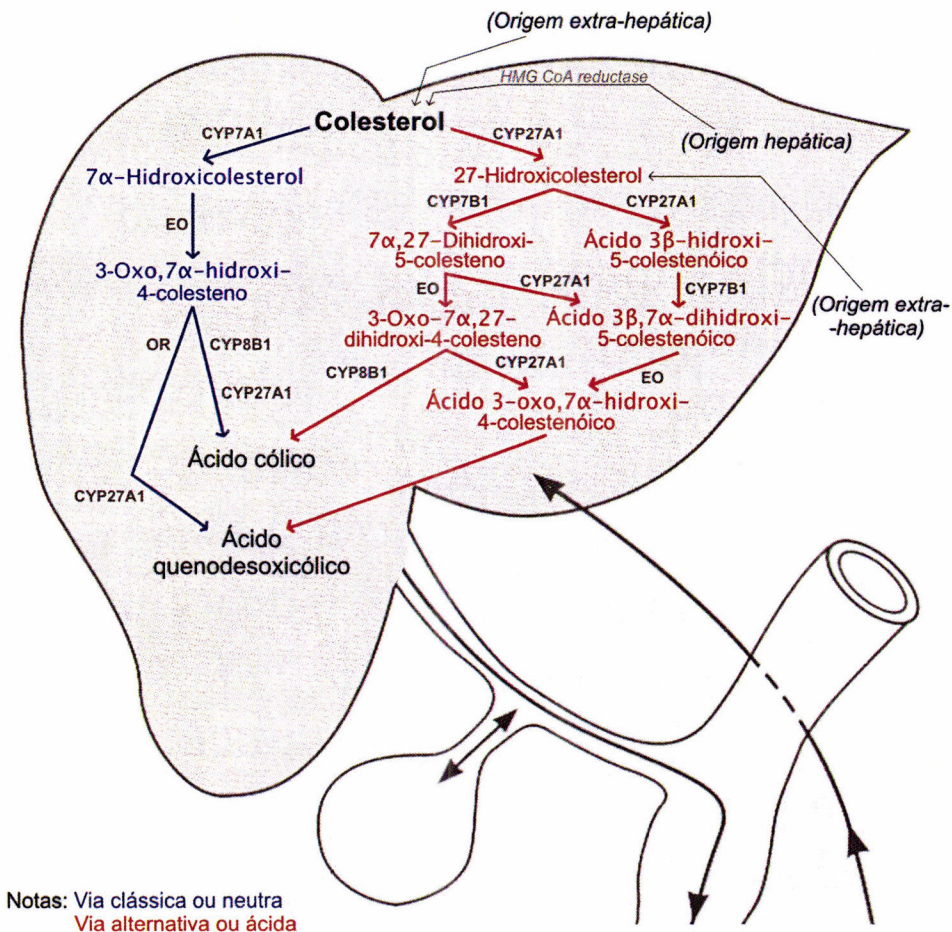


Figura 7. Esquema simplificado da biossíntese dos ácidos biliares em mamíferos (Adaptado de Souidi *et al.*, 2001).

A secreção dos sais biliares é um processo que requer energia, uma vez que a sua concentração na biliar pode ser mais de 1000 vezes superior à do hepatócito (Kullack-Ublick *et al.*, 2000). O seu transporte activo através da membrana hepatocitária apical ou canalicular (que forma os canalículos, túbulos de 1 μm entre hepatócitos adjacentes) depende de proteínas da família dos transportadores ABC (Borst *et al.*, 2000) cuja estrutura é composta por dois conjuntos de seis segmentos transmembranares formando um poro, e dois locais de ligação do ATP (Lu *et al.*, 2001; Borst e Elferink, 2002). A principal interveniente no processo é a ABCB11 ou bomba de secreção de sais biliares (BSEP – “bile salt export pump”), originalmente conhecida por Spgp (“sister of P-glycoprotein”) (Borst e Elferink, 2002). O seu gene, identificado em hepatócitos de suíno e outros mamíferos (Childs *et al.*, 1995), apresenta um domínio de fixação para o receptor nuclear FXR (“farnesoid X receptor”) (ver Figura 8 e 4.2.3.2.). Este receptor não é mais do que uma proteína ou factor de transcrição intracelular que induz a expressão do gene *BSEP* ao ser activado pelos ácidos biliares (Ananthanarayanan *et al.*, 2001). Assim, em presença de um excesso destes ácidos, a transcrição do gene *BSEP* é estimulada,

umentando a produção de BSEP e portanto o efluxo hepatocanalicular de sais biliares (Borst e Elferink, 2002). Nesta secreção intervém ainda o transportador hepático ABCB2 ou MRP2 (“multidrug resistance protein 2”), também implicado no transporte da bilirrubina e de outros aniões orgânicos (Elferink e Groen, 2000; Borst e Elferink, 2002). A actividade destes transportadores é modulada pelos próprios ácidos biliares (ligandos dos receptores nucleares), manifestando os ácidos hidrófobos como o quenodesoxicólico um efeito mais marcado na sua estimulação (Elferink e Groen, 2000). Deste modo, evita-se a acumulação intracelular ou canalicular de sais biliares, com acção detergente e potencialmente citotóxica (Borst e Elferink, 2002).

No íleo e intestino grosso, os ácidos biliares primários são geralmente desconjugados e depois transformados em ácidos biliares secundários pela população microbiana. No Homem, rato e hamster, predominam o ácido desoxicólico ($3\alpha,12\alpha$ -dihidroxi- 5β -colan-24-óico) (obtido a partir do ácido cólico) e o litocólico (3α -hidroxi- 5β -colan-24-óico) (obtido a partir do ácido quenodesoxicólico), e no suíno o hiodesoxicólico (obtido a partir do ácido hiocólico) (Hofmann, 1988). A (re)absorção dos ácidos biliares dá-se passivamente ao longo de todo o intestino e por transporte activo essencialmente ao nível do íleo (Schiff *et al.*, 1972), sendo esta última considerada a via mais importante (Shneider, 2001). Regra geral, os ácidos biliares conjugados (particularmente os tauroconjugados) apresentam uma menor taxa de absorção passiva que os ácidos biliares livres, mas a conjugação aumenta a sua absorção activa em relação à destes últimos (Schiff *et al.*, 1972). Por outro lado, a taxa de absorção passiva diminui de importância dos ácidos biliares mono aos trihidroxilados, ao passo que a activa aumenta (Schiff *et al.*, 1972; Hofmann, 1988). Existem vários transportadores de ácidos biliares nas células de bordadura em escova do íleo terminal, sendo a absorção destes compostos diferenciada da do colesterol (Lu *et al.*, 2001). O transportador intestinal de ácidos biliares (IBAT – “intestinal bile acid transporter”), uma proteína também denominada transportador apical de ácidos biliares dependente do Na^+ (ASBT – “apical sodium-dependent bile acid transporter”), e a proteína citosólica IBABP (“ileal bile acid-binding protein”) modulam o influxo enterocitário dos ácidos e sais biliares e o seu transporte intracelular da membrana apical para a basolateral do enterócito ileal (Love e Dawson, 1998; Shneider, 2001). Estas proteínas vêm a sua expressão genética induzida pelo FXR, o qual é activado por ácidos ou sais biliares hidrófobos (Makishima *et al.*, 1999; Repa e Mangelsdorf, 1999; Li *et al.*, 2004). Tais observações suportam a ideia de que os ácidos e sais biliares modulam o seu próprio transporte ao longo do enterócito, bem como a sua circulação enterohepática (ver 4.2.), por regulação da expressão genética das suas proteínas transportadoras (Makishima *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004).

Após a sua absorção, os ácidos e sais biliares são conduzidos ao fígado pela veia porta. Neste órgão, a anatomia dos sinusóides permite a passagem de componentes ligados a proteínas através das *fenestras* endoteliais para os espaços de Disse, onde se desencadeiam os processos de influxo de ácidos e sais biliares para as membranas basolaterais dos hepatócitos (Reichen, 1999). Os polipeptídeos OATP (“organic anion transporting polypeptides”) e NTCP (“Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide”) parecem ser os transportadores basolaterais mais relevantes neste influxo do sangue portal para os hepatócitos (Kullack-Ublick *et al.*, 2000). Este último privilegia o transporte de sais biliares, di e trihidroxilados (Labori *et al.*, 2002). O transporte intracelular dos ácidos biliares, cujo mecanismo é ainda pouco conhecido, parece resultar da difusão de complexos formados com proteínas citosólicas, as quais também contribuem para a redução do potencial tóxico destes ácidos (Kullack-Ublick *et al.*, 2000). Os ácidos biliares são então 7 α -hidroxilados (secundários) e reconjugados (primários e secundários), para serem novamente secretados. Este ciclo enterohepático, que no suíno representa cerca de 94% da secreção total (Legrand-Defretin *et al.*, 1986), permite a manutenção de uma forte concentração destes compostos no lúmen intestinal. Num estado de equilíbrio, a limitada perda fecal de ácidos biliares é compensada pela síntese hepática a partir do colesterol (Lindstedt, 1957; Hofmann, 1988).

4.2.1. As vias hepáticas de biossíntese dos ácidos biliares

4.2.1.1. A via clássica ou neutra

A primeira etapa da via neutra, limitante, corresponde à hidroxilação do colesterol em 7 α -hidroxicolesterol pela CYP7A1 microsomal (Myant e Mitropoulos, 1977; Li e Kim, 1979) (ver Figura 7). Esta enzima microsomal do RE, pertencente à família do citocromo P-450 (Russel e Setchell, 1992), encontra-se activa na sua forma fosforilada (Nguyen *et al.*, 1996). Sendo detectada fundamentalmente no fígado, a actividade da CYP7A1 está submetida a variações circadianas dependentes do número de refeições e do tipo de alimento consumido. Quando consumindo um regime comercial (9.00 h), suínos em crescimento apresentaram um pico de actividade máxima cerca das 14.00 h (Li *et al.*, 1980), ao contrário do observado em animais de hábitos nocturnos como os ratos, onde este se verificou a meio da noite (Mitropoulos *et al.*, 1973; Chiang *et al.*, 1990). A actividade da CYP7A1 hepática também aumenta com a idade (Norlin, 2002). A sua $t_{1/2}$ e a do seu mRNA foram estimadas em cerca de 4 h no rato (Twisk *et al.*, 1993) e de 3 a 9 h no coelho (Kinowaki *et al.*, 2002). A segunda parte da biossíntese dos ácidos biliares é catalisada no RE pela 3 β -hidroxi- Δ^5 -C₂₇-esteróide oxidoredutase (EO) (Furster *et al.*,

1996). O produto resultante, o 3-oxo,7 α -hidroxi-4-colesteno, pode ser utilizado para a formação de ácido cólico com a intervenção inicial da esteroide 12 α -hidroxilase (CYP8B1), ou de ácido quenodesoxicólico com a intervenção inicial da Δ^4 -3-oxosteróide-5 β -redutase (OR) microsomal (Russell e Setchell, 1992). A CYP8B1, membro da família do citocromo P-450 (Souidi *et al.*, 2001), apresenta uma $t_{1/2}$ (actividade e mRNA) de 4 h no rato (Vlahcécic *et al.*, 2000). As etapas finais da via neutra conduzem ao encurtamento da cadeia lateral do colesterol, processo que se desenrola nas mitocôndrias e peroxissomas. Ele inclui a oxidação da cadeia lateral pela CYP27A1 e a introdução de um agrupamento CoA éster. Por fim, e após uma 24-hidroxilação, o esteroide formado é decomposto em propionil-CoA e num composto com 24 átomos de carbono, futuro ácido biliar. Antes da sua secreção pelo hepatócito, a função ácida do ácido biliar é activada pela fixação do CoA, sendo este então conjugado (Princen *et al.*, 1997).

4.2.1.2. A via alternativa ou ácida

Estudos em hepatócitos de suíno (Bergman e Postlind, 1991), rato (Vlahcécic *et al.*, 1997) e coelho (Xu *et al.*, 1999) identificaram recentemente uma segunda via de biossíntese dos ácidos biliares, a via ácida. Dados obtidos *in vitro* indicam que esta via pode representar 50% da biossíntese total de ácidos biliares (Stravitz *et al.*, 1996; Princen *et al.*, 1997). A sua enzima-chave, a CYP27A1 mitocondrial (ver Figura 7), pertence à família do citocromo P-450 (Wikvall, 1984; Okuda, 1994). Esta enzima, activa na forma fosforilada (Souidi *et al.*, 1999), exhibe uma especificidade de substratos alargada ao colesterol, a oxisteróis de origem extra-hepática, a compostos intermédios da biossíntese dos ácidos biliares e ao colecalciferol (Okuda, 1994). Estudos efectuados em ratos e hamsters mostraram que a CYP27A1 apresenta um ritmo nictimeral, com uma actividade máxima a meio da noite e mínima a meio do dia (Vlahcécic *et al.*, 1996; Audas *et al.*, 1999). A $t_{1/2}$ do seu mRNA foi quantificada em 13 h em hepatócitos *in vitro* (Twisk *et al.*, 1995a). A CYP27A1 inicia a via ácida transformando o colesterol em 27-hidroxicolesterol (Russell e Setchell, 1992), um forte inibidor da actividade da HMG CoA reductase (Esterman *et al.*, 1983). Este composto é então 7 α -hidroxilado pela 27-hidroxicolesterol-7 α -hidroxilase (CYP7B1) microsomal do Homem (Martin *et al.*, 1993), rato (Vlahcécic *et al.*, 1997) e hamster (Lee *et al.*, 1996) ou pela CYP7B1 mitocondrial do suíno (Axelson *et al.*, 1992). Esta enzima, também conhecida por oxisterol 7 α -hidroxilase (Toll *et al.*, 1994), é considerada a segunda enzima mais importante da via ácida (Vlahcécic *et al.*, 1997). A sequência da cadeia de reacções enzimáticas origina o 3-oxo-7 α ,27-dihidroxi-4-colesteno, substrato a partir do qual a CYP8B1 forma o ácido cólico. Assim, no Homem e nestes modelos animais, bem como no coelho (Xu *et al.*, 1999), a inibição da via neutra

não pára a produção de ácidos biliares, tomando a via ácida o seu lugar. Neste caso, esta última via pode mesmo tornar-se a via de síntese de ácidos biliares mais importante no rato (Vlahcévíc *et al.*, 1997) e no coelho (Xu *et al.*, 1999).

4.2.2. A via extra-hepática de biossíntese dos ácidos biliares

Esta via depende da acção da CYP27A1 e da CYP7B1 extra-hepáticas. A primeira enzima foi já isolada no intestino, pulmões, glândulas supra-renais, testículos, ovários, artérias, células endoteliais, macrófagos e fibroblastos (Souidi *et al.*, 2001), sendo-lhe atribuído um papel de desintoxicação pela transformação extra-hepática do colesterol em compostos mais solúveis e portanto mais facilmente elimináveis do plasma como o 27-hidroxicolesterol e o ácido 3 β -hidroxi-5-colestenóico (Lund *et al.*, 1996). Transportados para o fígado respectivamente pelas lipoproteínas (principalmente as HDL) e pela albumina, estes compostos são então transformados em ácidos biliares pela CYP7B1 hepática (Björkhem *et al.*, 1999). A esta última enzima, detectada em diversos tecidos extra-hepáticos como os do intestino, encéfalo, pulmões, rins, pâncreas, testículos, ovários e próstata (Wu *et al.*, 1999), é também atribuído um papel desintoxicante por metabolização de oxisteróis (Souidi *et al.*, 2001).

4.2.3. Regulação da biossíntese dos ácidos biliares e da actividade das principais enzimas nela intervenientes

4.2.3.1. Efeito dos ácidos biliares e da colestiramina

A biossíntese dos ácidos biliares está sujeita a diferentes tipos de modulação. Um dos mais importantes diz respeito ao efeito dos ácidos biliares sobre a sua própria síntese, via ciclo enterohepático. Assim, a administração oral de resinas como a colestiramina (Schneider *et al.*, 1966) e de inibidores do IBAT/ASBT (Huff *et al.*, 2002), bem como a ressecção ileal (Beher *et al.*, 1960) e a fístula biliar (Mitropoulos *et al.*, 1973), ao diminuírem ou impedirem o fluxo de retorno dos ácidos biliares ao fígado, aumentam a sua biossíntese hepática através dum estímulo da síntese e actividade da CYP7A1 (Chiang *et al.*, 1990; Huff *et al.*, 2002). Inversamente, o aumento do "pool" dos ácidos biliares da bilis (Xu *et al.*, 1999) e a junção de ácidos biliares hidrófobos a hepatócitos (Kwekkeboom *et al.*, 1990b; Souidi *et al.*, 1999) ou ao regime alimentar (Heuman *et al.*, 1988; Pandak *et al.*, 1994) levam a uma diminuição da actividade da CYP7A1 e da síntese de ácidos biliares. A modulação desta síntese via CYP7A1, do tipo retro-controlo negativo, dá-se ao nível da transcrição: os ácidos biliares hidrófobos são ligandos dos

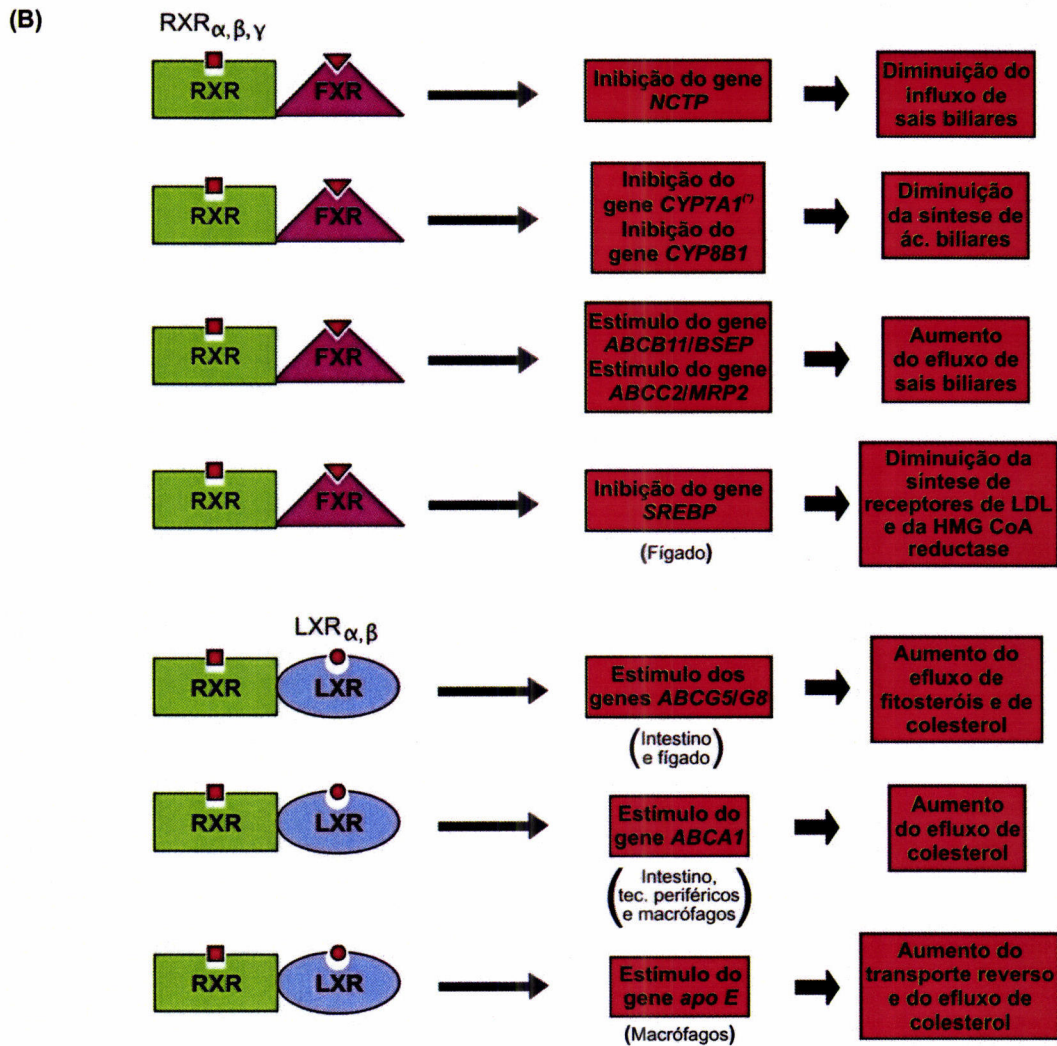
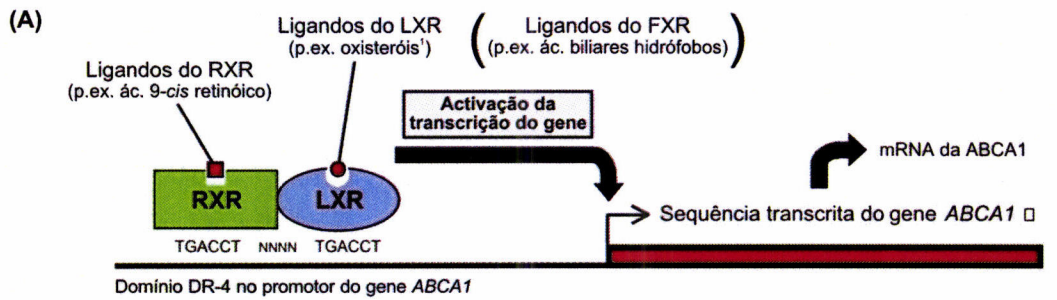
receptores nucleares, que quando activados se vão ligar a duas regiões do promotor do gene *CYP7A1*, as BARE (“bile acid response element”) I e II, reprimindo a expressão desta enzima (Repa e Mangelsdorf, 1999; Goodwin e Kliewer, 2002; Kinowaki *et al.*, 2002) (Figura 8). Assim, ácidos como o quenodesoxicólico ou o desoxicólico e seus conjugados são ligandos activadores do FXR, o qual inibe a síntese da *CYP7A1* (Makishima *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004) via SHP (“short heterodimer partner”) e LRH-1 (“liver receptor homolog-1”) (Goodwin e Kliewer, 2002), até a concentração hepatocitária nesses ácidos diminuir. A regulação da expressão da *CYP7A1* pelos ácidos biliares hidrófobos pode dar-se igualmente ao nível da estabilidade dos seus mRNA. Estes ácidos parecem exercer um retro-controlo negativo na expressão desta enzima, induzindo a transcrição de mRNA instáveis através de mecanismos ainda desconhecidos (Agellon e Cheema, 1997).

No Homem, a regulação da *CYP27A1* é pouco conhecida (Souidi *et al.*, 2001). No entanto, no rato e no hamster foi já determinado que a supressão do ciclo enterohepático dos ácidos biliares pela colestiramina estimula a actividade desta enzima, apesar de a um nível menos marcado que o registado com a *CYP7A1* (Lutton *et al.*, 1973; Vlahcécic *et al.*, 1996; Souidi *et al.*, 1999). Resultados recentes demonstram que também existe uma regulação da *CYP27A1* pelo tipo de ácidos biliares. A adição de ácidos hidrófobos a hepatócitos em cultura leva a uma diminuição na quantidade e na actividade da enzima (Twisk *et al.*, 1995c), assim como a sua adição ao regime alimentar diminui a actividade e a quantidade do mRNA da *CYP27A1* (Stravitz *et al.*, 1996; Vlahcécic *et al.*, 1996).

O efeito dos ácidos biliares sobre as actividades da *CYP8B1* e da *CYP7B1* foi também estudado. A interrupção do ciclo enterohepático ou o tratamento com colestiramina estimulam a actividade da *CYP8B1* no Homem e no rato (Einarsson *et al.*, 1992). Por outro lado, no Homem (Ahlberg *et al.*, 1980), no hamster (Kuroki e Hoshita, 1983) e no rato (Davis *et al.*, 1992), a ingestão dos ácidos cólico e quenodesoxicólico origina uma inibição importante na sua actividade. Quanto à *CYP7B1*, tratamentos à base de colestiramina estimulam fortemente a sua actividade (Martin *et al.*, 1993) mas a ingestão de ácido cólico por ratinhos inibe-a ligeiramente (Schwartz *et al.*, 1997).

4.2.3.2. Efeito do colesterol e dos oxisteróis

Apesar da velocidade de transformação do colesterol em ácidos biliares ser regra geral acelerada pelo aumento da síntese hepática e da ingestão de colesterol (Mathé e Chevallier, 1980), existem particularidades inerentes à espécie em estudo. Assim, no rato o colesterol absorvido em excesso é primordialmente transformado em ácidos biliares (Wilson, 1962), mas no Homem esta absorção inibe preferencialmente a síntese hepática e/ou aumenta a excreção fecal do colesterol (Dietschy e Wilson, 1970).



(A) Activados pelos seus ligandos, os receptores nucleares LXR e FXR formam heterodímeros com o receptor nuclear RXR e só nessa forma se ligam a um domínio (DR-4) no promotor do gene-alvo (p.ex. ABCA1), estimulando a transcrição do gene. Os receptores nucleares que constituem o heterodímero podem ser activados de forma separada ou em sinergia.
Nota: ¹Oxisteróis já identificados como ligandos: 24,25(S)-epoxicolesterol, 22(R)-hidroxicoolesterol, 20(S)-hidroxicoolesterol, 24(S)-hidroxicoolesterol e 27-hidroxicoolesterol.

(B) Mecanismo de acção proposto para a regulação de genes envolvidos no metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos pelos receptores nucleares.
Nota: ¹A inibição do gene CYP7A1 pelo heterodímero RXR/FXR é dominante em relação ao estímulo provocado pelo heterodímero RXR/LXR.

Figura 8. Exemplos de regulação pelos receptores nucleares de genes envolvidos no metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos (Adaptado de Goodwin e Kliewer, 2002; Zhang e Mangelsdorf, 2002; Souidi *et al.*, 2003).

O efeito de regimes suplementados com colesterol nas actividades da CYP7A1 e da CYP27A1 tem sido objecto de estudos recentes. No suíno e no rato, animais com um “pool” de ácidos biliares essencialmente hidrófilo, os regimes ricos em colesterol provocam um aumento na actividade da CYP7A1 como meio de transformar o excesso de colesterol hepático em ácidos biliares (Férezou *et al.*, 1997; Pandak *et al.*, 1998), sem variar a da CYP27A1 (Pandak *et al.*, 1998). Por outro lado, no coelho, no hamster e no Homem, cujos “pools” de ácidos biliares são essencialmente hidrófobos, o colesterol alimentar leva a uma diminuição na actividade da CYP7A1 (Pandak *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1999) sem influenciar a da CYP27A1 (Pandak *et al.*, 1998), mas diminuindo a da CYP8B1 (Kuroki e Hoshita, 1983). O efeito inibidor do esteroide nestas enzimas pode ser explicado pelo retorno preferencial ao fígado de ácidos como o quenodesoxicólico e a sua acção via receptores nucleares (Souidi *et al.*, 2001).

O efeito de certos oxisteróis como o 7 α - e 7 β -hidroxicolesterol e o 7-oxocolesterol sobre a actividade da CYP7A1 tem sido estudado essencialmente *in vitro*. A actividade desta enzima diminui em presença dos oxisteróis, os quais parecem exercer uma inibição competitiva ao nível do centro activo da enzima (Schwartz e Margolis, 1983; Souidi *et al.*, 1999). A regulação das enzimas da síntese dos ácidos biliares pelos oxisteróis ganhou uma nova dimensão com a recente descoberta de receptores nucleares específicos como os LXR. Estes receptores, quando activados por concentrações intracelulares elevadas de esteróis (especialmente oxisteróis), ligam-se à sequência de DNA LXRE no promotor do gene *CYP7A1*, estimulando assim a sua transcrição (Brendel *et al.*, 1999; Repa e Mangelsdorf, 1999). Estes dados estão em aparente contradição com as observações *in vivo*, onde o efeito dominante dos oxisteróis sobre a actividade da CYP7A1 é inibitório. Tal contradição resulta da regulação do gene *CYP7A1* ser feita positivamente pelo LXR activado pelos oxisteróis, mas negativamente pelo FXR. Este receptor nuclear é activado por ácidos biliares hidrófobos como o quenodesoxicólico e o desoxicólico, que podem resultar da transformação dos oxisteróis (Makishima *et al.*, 1999) e dados obtidos *in vivo* confirmam a predominância da acção do FXR sobre o LXR e portanto sobre a estimulação (Souidi *et al.*, 2003). Segundo Wade e Owen (2001), estes receptores nucleares inibem ou activam os promotores de genes na forma de heterodímeros com o receptor nuclear RXR (ver Figura 8). Assim, o conjunto destes resultados sugere que o colesterol e seus metabolitos (oxisteróis e compostos intermédios do metabolismo dos ácidos biliares) podem ser moduladores importantes da biossíntese dos ácidos biliares *in vivo* e portanto, da homeostase do colesterol.

4.2.3.3. Efeitos das hormonas

O papel das hormonas no metabolismo dos ácidos biliares tem sido estudado essencialmente ao nível da enzima-chave da via neutra, a CYP7A1. Os glucocorticóides parecem estimular a biossíntese dos ácidos biliares, como o sugere a redução da actividade da CYP7A1 em ratos sem as supra-renais e a sua restauração parcial (Mitropoulos e Balasubramaniam, 1976), bem como o aumento da expressão da CYP27A1 (Stravitz *et al.*, 1996) obtidas pela administração destas hormonas. A junção de insulina a hepatócitos de rato em cultura leva a uma diminuição da actividade enzimática e da concentração em mRNA da CYP7A1 e da CYP27A1 (Twisk *et al.*, 1995b), mas *in vivo* esta última parece ser menos sensível aos efeitos da insulina que a CYP7A1 (Dubrac *et al.*, 2001). As hormonas da tiróide estimulam *in vivo* a síntese de ácidos biliares e a actividade da CYP7A1 (Gebhard e Prigge, 1992), tendo recentemente sido descoberta uma zona de regulação pelas hormonas da tiróide (“thyroid response elements”) no promotor do gene *CYP7A1* (Crestani *et al.*, 1994). Não obstante, estas hormonas parecem não ter efeito sobre a actividade da CYP27A1 (Björkhem *et al.*, 1973). Por fim, a administração de hormonas sexuais femininas (estradiol e progesterona) a ratos, mesmo em pequenas doses, leva a uma diminuição da síntese dos ácidos biliares (Davis e Kern, 1976) e da actividade da CYP7A1 (Chico *et al.*, 1994). Esta acção seria mediada por receptores nucleares recentemente identificados, como o SXR (“sterol xenobiotic receptor”) humano ou o seu homólogo PXR (“pregnane X receptor”) em roedores, activados por esteróides naturais como a progesterona e a pregnenolona (Brendel *et al.*, 1999).

4.3. O colesterol e os fosfolípidos biliares

Uma segunda via de eliminação do colesterol hepático implica a sua transferência para a bília (Hofmann, 1988). Existe uma correlação positiva muito significativa entre a secreção de sais biliares e a de colesterol e fosfolípidos na bília de numerosas espécies animais (Mazer e Carey, 1984).

Os mecanismos através dos quais os lípidos biliares são secretados e o seu controlo são ainda pouco conhecidos. A origem da maioria do colesterol biliar parece ser plasmática (Chevallier e Branco, 1963), apesar de uma parte do colesterol sintetizado *de novo* no fígado poder ser secretado directamente na bília (Normann e Norum, 1976). O débito do colesterol biliar, bem como o dos outros lípidos biliares e do próprio fluxo biliar, é aumentado pela ingestão de ácidos biliares (Turley e Dietschy, 1979). Esta capacidade dos ácidos biliares solubilizarem e incorporarem colesterol na bília aumenta com a sua hidrofobicidade (Heuman *et al.*, 1988). Assim, as bílias de rato e suíno, com índices de

hidrofobicidade baixos, apresentam concentrações em colesterol fracas, o que não se verifica no Homem, cuja bilis hidrófoba contém uma concentração em colesterol mais elevada (Lutton, 1990). O rato não aumenta a incorporação de colesterol na bilis, mesmo em presença de ingestões elevadas deste esterol, ao contrário do que acontece no Homem, macaco, hamster e outras espécies (Turley e Dietschy, 1979).

A secreção do colesterol biliar nos mamíferos é um processo activo ainda pouco conhecido que depende de duas proteínas semi-transportadoras, as ABCG5 e ABCG8, também denominadas esterolinas 1 e 2. Unindo-se para formar um transportador funcional, estas proteínas têm sido detectadas só no intestino e fígado (Elferink e Groen, 2000; Lu *et al.*, 2001). Na secreção da fosfatidilcolina, o fosfolípido predominante na bilis e obtido sobretudo via síntese *de novo*, interferem as ABCB4 hepatocitárias, também designadas MDR3 (“multidrug resistance 3”) nos humanos, Mdr2 (“multidrug resistance 2”) nos roedores (Lu *et al.*, 2001; Borst e Elferink, 2002) e Pgp3 (“P-glycoprotein 3”) nos suínos (Childs e Ling, 1996). A actuação destes transportadores leva à formação de vesículas ricas em fosfolípidos no folheto externo da membrana canalicular do hepatócito. Estas vesículas seriam solubilizadas pelas micelas de sais biliares presentes nos canalículos hepatocitários, sais estes que estimulam assim indirectamente a actividade destes transportadores ABC (Borst e Elferink, 2002). As micelas mistas resultantes (constituídas por colesterol, fosfolípidos e ácidos biliares) solubilizariam então mais eficientemente que as micelas simples (ricas em sais biliares) o colesterol exportado do hepatócito pelas ABCG5 e ABCG8. Tais factos, explicariam porque é que a secreção biliar de colesterol depende indirectamente da dos fosfolípidos (Elferink e Groen, 2000).

A contribuição da secreção biliar de colesterol para a excreção total deste esterol é limitada, uma vez que o colesterol biliar é libertado no duodeno sob a forma de micelas mistas e complexos lipoproteicos, particularmente favoráveis à sua (re)absorção no jejuno e íleo, a um coeficiente superior ao do colesterol alimentar (Lutton e Brot-Laroche, 1979; Turley e Dietschy, 2003). A importância desta secreção, bem como a dos fosfolípidos, está mais relacionada com a acção protectora que estes lípidos biliares têm nos hepatócitos e células epiteliais dos canalículos hepáticos e ductos biliares em relação aos efeitos detergentes e citotóxicos dos sais biliares (Elferink e Groen, 2000).

4.4. Esterificação do colesterol hepático

Apesar da concentração em colesterol livre do fígado ser relativamente constante (Gould e Swyryd, 1966), a do colesterol esterificado não é. A sua concentração pode variar de 0,1 a dezenas de miligramas por grama de tecido, segundo o estado fisiológico dos animais e as condições experimentais. Ela é pequena durante a gestação e a

lactação (Lutton e Chevallier, 1972a), bem como quando a reabsorção dos ácidos biliares é interrompida ou diminuída por fístula biliar (Mathé *et al.*, 1972), pela ingestão de colestiramina (Schneider *et al.*, 1966), de fibras alimentares (Mathé *et al.*, 1977) ou de ácido hiodesoxicólico (Mathé e Chevallier, 1977). Por outro lado, aumenta após a ingestão de colesterol (Goodman, 1965; Gould e Swyryd, 1966), de ácidos gordos monoinsaturados (Avigan e Steinberg, 1958) ou a administração de estradiol e progesterona (Davis e Kern, 1976).

A esterificação enzimática do colesterol hepático foi referida pela primeira vez no rato por Mukherjee *et al.* (1958) e posteriormente caracterizada por Goodman *et al.* (1964). Este processo, catalisado pela enzima intracelular ubíqua ACAT, requer acil CoA (Goodman, 1964) ou ATP e CoA (Swell *et al.*, 1964). Ao contrário de outras duas enzimas-chave do metabolismo do colesterol, a HMG CoA reductase e a CYP7A1 do REL, a ACAT encontra-se essencialmente nas membranas do RER (Stokke e Norum, 1970). Esta enzima apresenta um pH óptimo perto da neutralidade e o ácido oleico como substrato preferencial para a esterificação do colesterol livre celular (Balasubramaniam *et al.*, 1978; Chang e Doolittle, 1983). Activada alostericamente pela ligação ao colesterol ou a oxisteróis (Buhman *et al.*, 2000), a ACAT responde rapidamente a alterações do metabolismo que levem à acumulação de colesterol livre nos hepatócitos, esterificando a fracção deste esteroide não imediatamente utilizada para as necessidades celulares. Esta acção tem um papel importante na homeostase do colesterol e permite que o conteúdo em colesterol livre membranar se mantenha constante, «protegendo» a célula dos efeitos que poderiam resultar das variações em tal conteúdo (Papahadjopoulos *et al.*, 1973). No entanto, a actividade desta enzima não se encontra directamente ligada à síntese *de novo* de colesterol: a ingestão de colestiramina não tem efeitos sobre a actividade da ACAT, apesar de estimular a síntese hepática (Rogers *et al.*, 1981), e o enriquecimento *in vitro* de microssomas em colesterol livre estimula a actividade da ACAT, mas inibe a da HMG CoA reductase (Mitropoulos *et al.*, 1981). Por outro lado, a diminuição da actividade da ACAT induz uma diminuição na síntese de apo B hepática (Huff *et al.*, 1994).

Cerca de metade do colesterol hepático é esterificado pelo ácido oleico, seguindo-se em ordem decrescente a esterificação pelos ácidos linoleico, palmítico e palmitoleico. Assim, quando o conteúdo em colesterol esterificado do fígado aumenta, o esteril oleato é o éster que se acumula (Goodman, 1965). Esta diferença em relação aos ésteres do plasma, onde predomina a esterificação pelo linoleico, mostra que a origem dos ésteres de colesterol do fígado depende mais de uma esterificação intra-hepática do que da acumulação de ésteres provenientes das lipoproteínas (Mathé e Lutton, 1984).

4.5. Renovação do colesterol esterificado hepático

A renovação dos ésteres de colesterol hepáticos pode ser obtida pela sua hidrólise intracelular ou pela sua incorporação nas lipoproteínas nascentes. No fígado, a hidrólise de ésteres de colesterol foi confirmada pela primeira vez por Deykin e Goodman (1962) ao identificarem em ratos uma colesteril éster hidrolase citosólica, actuando a um pH próximo da neutralidade. Depois, Stokke (1972) isolou em lisossomas de hepatócitos humanos a colesterol esterase (também conhecida por colesteril éster hidrolase ou esterol esterase), que pode hidrolisar ou esterificar o esterol a pH ácido. Tal localização confere-lhe um papel importante na hidrólise dos ésteres de colesterol das lipoproteínas internalizadas, nomeadamente dos quilomicrons (Rachmilewitz *et al.*, 1972). Apesar da hidrólise dos ésteres de colesterol das lipoproteínas internalizadas pelo fígado estar já bem definida, o mesmo não acontece com a hidrólise das reservas citosólicas de ésteres de colesterol hepáticos. Esta última foi confirmada *in vivo* (Giraud-D'Hollander *et al.*, 1976) mas parece ter um papel pouco importante na renovação dos ésteres de colesterol do fígado (Mathé *et al.*, 1984). Assim, a renovação efectuar-se-ia principalmente pela secreção dos ésteres sob a forma de lipoproteínas como as VLDL nascentes (Kempen, 1980). De facto, a composição em ácidos gordos dos ésteres de colesterol dos microsomas hepáticos é idêntica à dos ésteres das VLDL secretadas pelo fígado (Gidez *et al.*, 1965), sugerindo que o colesterol esterificado das VLDL plasmáticas pode ter origem hepática (Swell e Law, 1966). As relações lineares obtidas entre o conteúdo em colesterol esterificado dos hepatócitos e a sua taxa e velocidade de secreção sob a forma de VLDL (Davis *et al.*, 1982), sugerem uma incorporação de ésteres de colesterol formados pela ACAT hepática nas lipoproteínas nascentes (Balasubramaniam *et al.*, 1978). Esta contribuição aumenta muito em ratos ingerindo regimes ricos em colesterol, onde o aporte acrescido de colesterol é canalizado para incorporação nas lipoproteínas sob a forma de ésteres (Mathé *et al.*, 1984).

5. O PAPEL DO INTESTINO

O intestino é considerado como uma barreira que regula a absorção do colesterol e minimiza a de fitosteróis. A absorção intestinal desempenha um papel importante na homeostasia do colesterol, sendo o primeiro passo numa cadeia de acontecimentos que permitem ao esterol exercer os seus efeitos metabólicos (Lu *et al.*, 2001). Para além do papel dos ácidos biliares (Westergaard e Dietschy, 1976), a recente identificação de

novos mecanismos moleculares intervenientes no processo de absorção dos esteróis tem originado alterações em algumas das teorias aceites nesta matéria (Lu *et al.*, 2001).

5.1. O conteúdo intestinal

5.1.1. O colesterol alimentar e o colesterol endógeno

O colesterol alimentar ingerido mistura-se no conteúdo gástrico com o colesterol endógeno oriundo da porção pré-gástrica e gástrica do tracto digestivo (secreções e descamação das mucosas pré-gástrica e gástrica) cuja proporção é, no entanto, bastante modesta (Chevallier e Lutton, 1972). Este colesterol do conteúdo gástrico entra no duodeno, onde se vai misturar com o colesterol endógeno intestinal (Aigueperse, 1979). A mistura é parcial, provavelmente progressiva e sincronizada com a ingestão de alimento (Chevallier e Lutton, 1972). No suíno, tal como no rato, a distribuição do colesterol faz-se por dois compartimentos concêntricos seguindo o eixo do órgão: um compartimento axial, com colesterol endógeno e colesterol de origem alimentar, e um intermédio, apenas com colesterol endógeno (Aigueperse, 1979).

5.1.2. O colesterol fecal

Ao longo do ceco-cólon, a microflora produz modificações estruturais no colesterol alimentar e endógeno, transformando-o em coprostanol e colestanol pela hidrogenação da sua dupla ligação Δ^5 (Aigueperse, 1979), e em esteróis cetónicos (colestanona, coprostanona...) por oxidação (Lutton e Chevallier, 1972b). Assim, as fezes contêm colesterol de origem alimentar e endógena, bem como os seus derivados microbianos. O perfil de distribuição dos esteróis neutros fecais, dominado pelo coprostanol e pelo colesterol, é similar em humanos e suínos (Férézou *et al.*, 1997; Fadden *et al.*, 1999).

O colesterol endógeno fecal, com origem na mucosa intestinal, é composto por colesterol de excreção (de origem plasmática e biliar) e colesterol de secreção externa (sintetizado na mucosa intestinal e libertado no lúmen antes de qualquer troca com o plasma) (Chevallier e Lutton, 1973). Sendo a reabsorção intestinal do colesterol de excreção de origem biliar elevada (Aigueperse, 1979), uma parte importante do colesterol endógeno eliminado nas fezes é assim colesterol de secreção externa (Chevallier e Lutton, 1972). Ao contrário do Homem (Férézou *et al.*, 1981), o suíno produz uma secreção externa fecal importante, representando 25 a 35% do colesterol endógeno fecal (Aigueperse *et al.*, 1981). A descamação contínua da mucosa representa a principal fonte

deste colesterol (Wilson e Reinke, 1968). No entanto, outros mecanismos como a lise das membranas das células de bordadura em escova sob o efeito detergente das micelas mistas no lúmen intestinal ou a transferência de colesterol membranar para as micelas não são de excluir (Mathé e Lutton, 1984).

5.1.3. Físico-química do colesterol no conteúdo intestinal

O colesterol alimentar é constituído essencialmente por colesterol livre e uma porção variável de ésteres de colesterol. O colesterol esterificado existente é hidrolisado pela colesterol esterase pancreática no lúmen do intestino delgado de suínos (Momsen e Brockman, 1977) e diminui de proporção à medida que o bolo alimentar progride, deixando de se detectar no jejuno distal e íleo (Aigueperse, 1979). O colesterol é assim absorvido na sua forma livre ao longo do intestino delgado (Swell *et al.*, 1955), preferencialmente no jejuno e íleo (McIntyre *et al.*, 1971; Schiff *et al.*, 1972; Aigueperse, 1979). Esta absorção é precedida pela sua emulsificação duodenal e transporte até às células de bordadura em escova pelas micelas mistas (Westergaard e Dietschy, 1976). A interrupção do ciclo enterohepático dos ácidos biliares anula a absorção do colesterol (Siperstein *et al.*, 1952a), ao passo que a adição de um sal trihidroxilado como o taurocólico à alimentação a aumenta (Lutton *et al.*, 1973; Thomson e Dietschy, 1981).

Os trabalhos de Dietschy e Siperstein (1965) e Dietschy e Gamel (1971) sugeriram a grande importância da presença de uma camada de água não agitada ("unstirred water layer") adsorvida às células de bordadura em escova sobre a cinética de absorção do colesterol livre e dos outros produtos da hidrólise lipídica no seio da fase micelar. Esta camada de água, mais espessa na base do enterócito, introduz uma resistência à penetração do colesterol proporcional à sua espessura, pelo que esta é mais fácil e rápida na zona apical da vilosidade que na sua base (Sylvén e Nordström, 1970). Os constituintes da fase micelar (micelas mistas de 20 a 30 nm de raio, grandes micelas saturadas em colesterol e vesículas unilamelares compostas por colesterol, ácidos biliares, lecitinas e mono e diacilgliceróis) dissociam-se ao contactar com o microambiente ácido na vizinhança da membrana das células de bordadura em escova e os seus componentes individuais são captados pelas membranas enterocitárias, nomeadamente os monómeros de colesterol (Thomson e Dietschy, 1981).

Com base em estudos *in vitro*, a absorção do colesterol foi considerada como um processo de difusão passiva seguindo um gradiente de concentração (Thomson e Dietschy, 1981), mas certos factos não são explicados por tal teoria. Assim, Sylvén e Borgström (1969) observaram que a mucosa intestinal de ratos discrimina perfeitamente os esteróis e que o coeficiente de absorção do colesterol é 10 vezes superior ao do β -

sitosterol. Esta especificidade não se observa *in vitro*, visto a energia metabólica necessária à sua manutenção não estar disponível devido à ausência da circulação sanguínea entérica (Sylvén, 1970). Por outro lado, em segmentos revertidos de intestino delgado de rato ("small intestine everted sacs"), Chow e Hollander (1978) verificaram que o valor de energia livre de penetração do colesterol na mucosa era mais elevado do que o calculado para um simples processo de difusão. Mais recentemente, Watanabe *et al.* (1981) determinaram que a partir de determinada dose, a quantidade de colesterol intestinal absorvido era constante, sugerindo um nível de saturação. Estes autores também observaram que a absorção deste esterol era reduzida por inibidores metabólicos, assim como pela diminuição da temperatura corporal dos 37 para os 27°C. Todas estas observações sugerem que a absorção do colesterol está sujeita a um sistema de transporte activo e saturável (Hernandez *et al.*, 2000), provavelmente predominante em relação ao transporte passivo (Turley e Dietschy, 2003).

5.2. Processos celulares da absorção intestinal

5.2.1. Principais mecanismos da absorção intestinal

Nos mamíferos, os mecanismos moleculares que levam à transferência do colesterol da membrana apical das células de bordadura em escova para o seu citosol, são ainda pouco conhecidos. Para além do transporte passivo, dados recentes apontam para a intervenção na absorção deste esterol de receptores saturáveis, provavelmente proteínas específicas cuja identidade e modo de acção ainda não foram inequivocamente estabelecidos (Lu *et al.*, 2001; Kramer *et al.*, 2003; Turley e Dietschy, 2003).

Um dos candidatos à função de transportador membranar do colesterol é a SR-BI (Acton *et al.*, 1996; Hauser *et al.*, 1998), detectada nas membranas apical e basolateral das células de bordadura em escova do intestino delgado. A sua expressão genética foi positivamente correlacionada com a captação de colesterol das micelas mistas e das vesículas de fosfolípidos do lúmen intestinal, mas também com o efluxo de colesterol do enterócito (Hauser *et al.*, 1998). No entanto, os mecanismos moleculares que regem a sua acção ainda não foram identificados (Lu *et al.*, 2001) e observações recentes, onde ratinhos com o gene codificador desta proteína silenciado não apresentaram uma diminuição da absorção do colesterol, parecem pôr em causa a indispensabilidade da sua acção e/ou evidenciar a existência de mecanismos eficazes de compensação, que permitem nestes animais a manutenção do nível de absorção do esterol (Altmann *et al.*, 2002). A absorção intestinal de colesterol livre foi também relacionada com a proteína ABCA1 em pacientes com a doença de Tangier, cujo gene codificador desta proteína

contém mutações. Em modelos animais normais, o excesso de colesterol celular (fonte de oxisteróis) activa o heterodímero RXR/LXR, estimulando assim a transcrição da ABCA1 (ver 2.2.5). Esta proteína, geralmente localizada na *lamina propria* do intestino em mamíferos ingerindo regimes sem colesterol, expressa-se então em número muito elevado nas células de bordadura em escova do duodeno e jejuno, induzindo o efluxo de colesterol dos enterócitos para o lúmen intestinal contra o gradiente de concentração e com consumo de ATP (Berge *et al.*, 2000; Repa *et al.*, 2000). As ABCG5 e ABCG8, igualmente reguladas pelos receptores nucleares RXR/LXR, parecem também influenciar a absorção intestinal de colesterol, principalmente em casos de ingestão elevada de colesterol alimentar (Borst e Elferink, 2002). No entanto, a sua função primordial tem sido associada à modulação da absorção de fitosteróis como o β -sitosterol, pelo seu reenvio para o lúmen intestinal (Lu *et al.*, 2001). Assim, mutações nos genes *ABCG5* e/ou *ABCG8* causam sitosterolémia, uma doença caracterizada pela elevada absorção de fitosteróis e pela diminuição da sua secreção hepática (Berge *et al.*, 2000; Repa *et al.*, 2002), o que sugere que estas proteínas funcionam a nível enterocitário e hepatocitário (Borst e Elferink, 2002). Mais recentemente, a descoberta de uma nova proteína membranar existente nas células do duodeno, jejuno e íleo, e intervindo na absorção intestinal do colesterol e dos fitosteróis, parece sugerir que o influxo enterocitário destes esteróis pode ser feito por uma permease comum (Turley e Dietschy, 2003).

5.2.2. Das trocas intracelulares à origem do colesterol linfático

O colesterol dos enterócitos encontra-se principalmente na forma livre e a sua concentração é muito estável, mesmo aquando da ingestão de regimes ricos neste esterol (Perrodin e Lutton, 1985). Após a sua entrada no enterócito, o colesterol absorvido inicia uma troca rápida com o colesterol livre presente nas membranas dos organitos celulares (Murthy *et al.*, 1963), particularmente dos microssomas, mitocôndrias e núcleo (de Grella e Simoni, 1982). Tal como na membrana citoplásmica, esta trocas parecem ocorrer por difusão lateral (Scow *et al.*, 1980), mas também é possível que haja um mecanismo de transporte por proteínas citosólicas, mais lento (Mathé e Lutton, 1984).

Dados experimentais sugerem a existência de dois “pools” de colesterol celular: um citosólico e outro constituído pelo colesterol membranar, bastante mais importante. As trocas entre o colesterol exógeno e o colesterol das estruturas celulares levam a que o seu tempo médio de trânsito intracelular seja longo e maior que o dos ácidos gordos de cadeia longa. Assim, cerca de 1 h 30 min após a infusão intraduodenal em ratos de colesterol e de ácido oleico isotopicamente marcados, a linfa oriunda do intestino e rica em substâncias lipídicas (quilo) só continha 2 a 6% de colesterol, contra 22 a 40% de

ácido oleico. Mesmo após 8 h de perfusão, o colesterol marcado representava menos de 1/3 do colesterol total linfático (Watt e Simmonds, 1976).

O transporte do colesterol no quilo mesentérico é efectuado pelas lipoproteínas secretadas pelos enterócitos através da membrana basolateral. Esta secreção é um processo rápido, podendo por exemplo os quilomicrons nascentes aparecer no espaço intercelular 12 min após a entrada de lípidos no lúmen intestinal (Jersild, 1966). Em ratos em jejum ou ingerindo regimes livres de colesterol, cerca de 2/3 do colesterol do quilo é transportado pelos quilomicrons, sendo o restante pelas VLDL e HDL (Chevallier e Vyas, 1963). Com a adição de colesterol ao regime, a maior parte do colesterol alimentar detecta-se ao nível dos quilomicrons e das VLDL (Chevallier e Lutton, 1968). Tal situação também se detecta no suíno, com os quilomicrons a apresentar um papel predominante no transporte do colesterol alimentar absorvido (Aigueperse, 1979). Por outro lado, o transporte para o plasma do colesterol sintetizado *de novo* pelos enterócitos destas espécies é efectuado sobretudo pelas VLDL. Após a administração de [1-¹⁴C]acetato, a radioactividade específica do colesterol livre das VLDL foi 2 a 4 vezes maior que a do colesterol livre dos quilomicrons no quilo e no plasma (Chevallier e Vyas, 1963; Aigueperse, 1979). Por fim, existe uma outra via possível de transporte de colesterol para o plasma, a qual envolve a captação do esterol sintetizado *de novo* pelas apo A_I e A_{IV} de origem intestinal (Windmueller *et al.*, 1973; Windmueller e Wu, 1981).

Uma fracção variável mas importante do colesterol destas lipoproteínas está esterificado. Esta re-esterificação, realizada no RE dos enterócitos, foi inicialmente atribuída a duas enzimas microssomais: a colesterol esterase, idêntica à pancreática (Borja *et al.*, 1964) e a ACAT (Norum *et al.*, 1979). Hoje sabe-se que a enzima responsável pelo processo de esterificação entérica do colesterol é a ACAT (Hernandez *et al.*, 2000), enzima já identificada no intestino delgado do Homem (Norum *et al.*, 1979) e de outros mamíferos como o suíno (Chang e Doolittle, 1983). Heider *et al.* (1983) sugeriram que tal re-esterificação seria um passo importante no processo absorptivo, ao verificar que inibidores da actividade da ACAT reduziam simultaneamente a absorção de colesterol alimentar. Assim, ao formar ésteres de colesterol, a ACAT impediria o reenvio do colesterol livre para o lúmen intestinal (Dawson e Rudel, 1999). Duas formas desta enzima foram recentemente identificadas em humanos, macacos e ratinhos, sendo a ACAT1 ubíqua e a ACAT2 localizada sobretudo no fígado e intestino delgado. A ACAT2 parece responsável pela esterificação da maioria do colesterol absorvido no intestino dos mamíferos (Cases *et al.*, 1998; Dawson e Rudel, 1999).

As lipoproteínas secretadas pelos enterócitos atingem o espaço intercelular da *lamina propria* e após atravessarem os poros da membrana basal, penetram nos canais quilíferos e no sistema linfático (Hernandez *et al.*, 2000). Ao longo do trajecto intracelular

e da circulação linfática, as lipoproteínas captam colesterol livre do meio extracelular (Chevallier e Phillipot, 1962; Chevallier e Mathé, 1964), sofrendo também trocas nos seus restantes constituintes (colesterol esterificado, fosfolípidos, apoproteínas) tal como se verifica no plasma (Schaefer *et al.*, 1978). O enriquecimento em colesterol esterificado dos quilomicrons e das VLDL do quilo, pode ser originado por uma transferência de ésteres de colesterol de outras lipoproteínas (HDL em particular) ou por uma esterificação *in situ* (Chevallier e Phillipot, 1962). Encontrando-se o colesterol esterificado no centro da lipoproteína, a sua transferência para outras lipoproteínas e o seu transporte no plasma só foi compreendido quando vários autores (Zilversmit *et al.*, 1975; Chajek e Fielding, 1978; Pattnaik *et al.*, 1978) revelaram a existência de proteínas responsáveis pela transferência do colesterol esterificado entre as lipoproteínas do plasma no Homem e noutros mamíferos (ver 2.2.4.).

5.3. Aspectos quantitativos da absorção

Apesar do transporte pelas micelas mistas do colesterol luminal para os enterócitos estar associado ao dos ácidos gordos de cadeia longa, a sua absorção difere da destes últimos em aspectos qualitativos e quantitativos. A absorção do colesterol alimentar no rato (Schiff *et al.*, 1972) e no suíno (Aigueperse, 1979; Juste *et al.*, 1988) dá-se essencialmente no jejuno e íleo, parecendo assim mais distal que a dos ácidos gordos. Por outro lado, o seu coeficiente de absorção é inferior ao dos ácidos gordos de cadeia longa predominantes (oleico, linoleico e palmítico), que ultrapassa os 90 a 95%. Em suínos, observou-se uma absorção intestinal média de 41,5% em fêmeas adultas miniatura Hormel ingerindo um regime comercial (Dupont *et al.*, 1974) e de 56,5% em machos Yorkshire de 20 kg PV ingerindo um regime com 0,38% de colesterol (Kim *et al.*, 1974). A absorção do colesterol alimentar pode ser influenciada por muitos factores, como variações geneticamente determinadas, a idade, o sexo ou o estado fisiológico do animal, mas também pela velocidade do trânsito intestinal, a concentração em colesterol do alimento, a riqueza e natureza dos seus lípidos, proteínas ou glúcidos, e a importância e natureza do "pool" de ácidos biliares do animal (Mathé e Lutton, 1984; Shutler, 1988; Turley e Dietschy, 2003). Ao nível celular, o facto das trocas de colesterol alimentar com as membranas das células e seus organitos ao longo do trânsito intra-enterocitário atrasarem a sua chegada aos vasos quilíferos, levam a que uma fracção do colesterol alimentar, após ter sido absorvida pelo enterócito, volte novamente ao lúmen intestinal por descamação celular. Este fenómeno decorre ao longo de todo o intestino delgado e é bastante importante devido à absorção se efectuar primordialmente nas células situadas no topo das vilosidades, as mais sujeitas ao processo de descamação. Assim, mesmo

que todas as outras variáveis intervenientes na absorção do colesterol permaneçam inalteradas, uma aceleração da renovação celular da mucosa intestinal como a verificada em animais jovens, deve levar a uma diminuição do coeficiente de absorção do colesterol e vice-versa (Mathé e Lutton, 1984).

Como foi visto anteriormente, a solubilização micelar do colesterol é uma condição indispensável à sua absorção enterocitária, pelo que numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido dedicados às propriedades detergentes dos principais ácidos biliares e à sua capacidade de activarem o transporte do colesterol através da mucosa e no quilo. Os trabalhos de Gallo-Torres *et al.* (1971) demonstraram que o ácido taurocólico é mais eficaz a estimular a absorção do colesterol que o taurodesoxicólico, sendo os ácidos glicocólico e glicodesoxicólico menos eficientes que os seus tauroconjugados correspondentes. Já Mathé e Chevallier (1977) demonstraram que o ácido hiodesoxicólico diminuía a absorção deste esterol. Esta maior eficiência dos ácidos hidrófobos e dos tauroconjugados em solubilizar o colesterol e estimular a sua velocidade de penetração no enterócito, foi depois confirmada em diversos modelos animais (Lutton *et al.*, 1973; Reynier *et al.*, 1979; Lutton, 1990; Wang *et al.*, 1999). Por outro lado, as micelas ricas em ácidos biliares trihidroxilados, mais facilmente absorvidos activamente (Schiff *et al.*, 1972; Hofmann, 1988), podem também influenciar a absorção do colesterol, ao acumulá-lo em maior quantidade na vizinhança das células de bordadura em escova. Para Watt e Simmonds (1976) as etapas intracelulares da absorção como a re-esterificação intra-enterocitária do colesterol estariam também implicadas no processo de absorção, o que explicaria certas variações do coeficiente de absorção do colesterol alimentar. Num estudo realizado em ratos, estes autores sugeriram que a etapa limitante da esterificação do colesterol durante a sua absorção estava ligada à actividade de uma denominada colesterol éster sintetase (Watt e Simmonds, 1981), que provavelmente corresponde à ACAT (Mathé e Lutton, 1984). O coeficiente de absorção do colesterol alimentar no suíno é geralmente considerado como idêntico ao do Homem e menos elevado que o do rato, provavelmente pelo facto dos ácidos biliares do suíno e humanos serem essencialmente glicoconjugados di e trihidroxilados, ao passo que os do rato são tauroconjugados trihidroxilados (Mathé e Lutton, 1984). Por outro lado, a ACAT intestinal humana parece ser sensivelmente menos activa que a do rato (Norum *et al.*, 1979; Helgerud *et al.*, 1982).

Estas observações demonstram a complexidade dos factores que influenciam a absorção do colesterol. Um conhecimento mais preciso destes factores é importante, uma vez que o coeficiente de absorção do colesterol modula vários parâmetros da renovação do colesterol no organismo (Turley e Dieschy, 2003).

6. AS LEGUMINOSAS E SEUS COMPONENTES: EFEITOS NO METABOLISMO DO COLESTEROL

Estudos epidemiológicos e observações em humanos e modelos animais têm correlacionado níveis sanguíneos de colesterol elevados (Keys, 1970; Zyriax e Windler, 2000), especialmente de colesterol das LDL (Keys, 1970; Mahley, 1978; Smith, 1998), com o risco de doenças cardiovasculares. A diminuição da colesterolémia com vista a minorar tais riscos é assim há muito uma prioridade, como o demonstram o elevado número de testes a factores farmacológicos e alimentares intervenientes no metabolismo do colesterol citados na literatura científica. A alimentação é um campo fundamental neste corpo de investigação, visto reconhecer-se que muitas das doenças comuns nos países ditos desenvolvidos têm origem alimentar (Khosla e Sundram, 1996; Setchell, 1998). Macro, micronutrientes ou componentes bioactivos são utilizados em regimes alimentares e suplementos para prevenir ou contrariar patologias como as hiperlipémias e hipercolesterolémias, onde uma redução no nível de colesterol sanguíneo pode beneficiar indivíduos em risco de sofrer um acidente cardiovascular (Kerckhoffs *et al.*, 2002).

Um dos grupos de alimentos que tem sido apontado como hipocolesterolémico, é o das leguminosas. Desde os estudos com grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) na década de 60 (Mathur *et al.*, 1964, 1965 e 1968) que relatórios e artigos científicos referem a aptidão hipocolesterolémica dos grãos das leguminosas e/ou seus componentes no Homem (Mathur *et al.*, 1968; Jenkins *et al.*, 1983) e em modelos animais como o suíno (Combs *et al.*, 1967; Topping *et al.*, 1980; Diersen-Schade *et al.*, 1986; Kingman *et al.*, 1993), o rato (Devi e Kurup, 1970; Soni *et al.*, 1982) e o coelho (Finnigan, 1983). No entanto, a magnitude das respostas observadas inicialmente entre os diferentes estudos veio chamar a atenção para aspectos que poderiam afectar o resultado final, entre eles o tipo de regime controlo utilizado e os valores de colesterolémia ao início do estudo. Até à década de 80, era pouca a importância dada ao regime controlo contra o qual se testava o regime experimental (Kingman, 1991). Em sujeitos hiperlipémicos, certos investigadores optavam pela utilização de regimes controlo hipolipémicos (Jenkins *et al.*, 1983; Molgaard *et al.*, 1987), ao passo que outros preferiam um regime dito tradicional com elevado teor em lípidos (Anderson *et al.*, 1984b e 1990), apesar de vários estudos apontarem já para uma influência do tipo de ingredientes do regime controlo na colesterolémia (Grande *et al.*, 1974; Kingman, 1991). Na realidade, as reduções mais importantes na colesterolémia têm sido observadas quando os regimes são ricos em lípidos, pelo que se supõe que as leguminosas sejam particularmente eficazes a contrariar a elevação do colesterol plasmático causado pelo seu consumo (Kingman,

1991). Por outro lado, apesar das reduções na colesterolémia induzidas por regimes à base de leguminosas se verificarem em humanos e modelos animais normo e hiperlipémicos, o efeito é mais marcado quando os níveis iniciais de colesterol sanguíneo são elevados. Bingwen *et al.* (1981) observaram que 77% dos humanos hipercolesterolémicos apresentavam reduções na colesterolémia ao consumirem um regime com leguminosas, contra 48% dos normocolesterolémicos. Aliadas a estes factos, certas características do modelo animal utilizado como a idade, o sexo, a espécie e mesmo a estirpe, podem também influenciar a resposta ao regime alimentar e assim modular os efeitos no metabolismo do colesterol, pelo que não devem ser menosprezadas (Van der Meer e Beynen, 1987).

Apesar da maioria da investigação ao nível do efeito das leguminosas no metabolismo do colesterol até à década de 90 se ter pautado mais por uma abordagem terapêutica que mecanística e haver áreas onde a investigação necessita ser aprofundada (Kingman, 1991), ainda assim foi possível sugerir algumas linhas de actuação das leguminosas ao nível do referido metabolismo.

6.1. O consumo de grãos de leguminosas e seus efeitos

Há várias décadas que se realizam estudos para verificar os efeitos do consumo de grãos de leguminosas inteiros nos níveis lipídicos sanguíneos do Homem e de modelos animais normo e hipercolesterolémicos. A maioria destes estudos comprovou a aptidão hipocolesterolémica das leguminosas testadas (Shutler *et al.*, 1987a; Carroll e Kurowska, 1995), mesmo quando comparadas com regimes controlo isoproteicos e isoenergéticos (Anderson *et al.*, 1984a; Kingman *et al.*, 1993; Anderson e Major, 2002). No entanto, são muitas as sugestões em relação ao factor responsável por esta aptidão. Ultimamente, revisões bibliográficas de vários autores (Kritchevsky, 1979; Shutler *et al.*, 1987a; Potter, 1995; Orzechowski *et al.*, 2002) apontam antes para um efeito aditivo de diversos componentes alimentares benéficos existentes nos grãos de leguminosas.

6.1.1. Efeitos relacionados com a dose consumida

São poucos os estudos sobre a acção da dose consumida de grãos de leguminosas na colesterolémia e ainda não foi claramente definida a quantidade mínima a consumir para que se note um efeito hipocolesterolémico. A longo prazo, é possível manter o efeito hipocolesterolémico através do consumo regular de pequenas quantidades de grãos de leguminosas. Neste caso, a quantidade mínima a apresentar tal efeito em humanos foi de

cerca de 33 g MS·d⁻¹ (Bingwen *et al.*, 1981). No entanto, tal limite aumenta para os 60 a 120 g MS·d⁻¹ a curto prazo (Shutler *et al.*, 1989; Kingman, 1991), nomeadamente após 2 semanas de consumo de feijão em conserva (*Phaseolus vulgaris* L.) por humanos normocolesterolémicos (Shutler *et al.*, 1989). O consumo de quantidades superiores a 100 g MS·d⁻¹ de leguminosas tem dado resultados contraditórios no que respeita à colesterolémia. Em humanos hipercolesterolémicos, Jenkins *et al.* (1983) não conseguiram correlacionar a diminuição do colesterol sérico com a quantidade de feijão consumida (entre os 95 e 190 g·d⁻¹), mas Anderson *et al.* (1984b) observaram que consumos superiores a 100 g MS·d⁻¹ originavam reduções no nível de colesterol maiores que consumos mais baixos. Em modelos animais, Malinow *et al.* (1980) observaram uma correlação negativa entre a colesterolémia e o consumo de luzerna (*Medicago sativa* L.) (50 a 300 g·kg⁻¹) em ratos normocolesterolémicos, facto corroborado por Costa *et al.* (1994) em suínos hipercolesterolémicos consumindo feijão (100 a 300 g·kg⁻¹).

6.1.2. Efeito da duração do estudo

Estudos a curto prazo demonstraram que a fase inicial de redução na colesterolémia induzida pelo consumo de um regime à base de grãos de leguminosas é rápida, tornando-se evidente em 1 semana. Shutler *et al.* (1989) e Anderson *et al.* (1990) observaram uma redução significativa no nível de colesterol total médio em humanos após 3 dias de consumo de feijão. Um estado de equilíbrio parece ser atingido após 4 a 8 semanas de consumo, não se detectando benefícios adicionais durante períodos longos de estudo, se o regime não for alterado (Bingwen *et al.*, 1981). No entanto, os benefícios ao nível da redução na colesterolémia persistem enquanto o regime que lhes deu origem for consumido (Jenkins *et al.*, 1983; Anderson *et al.*, 1984a).

6.1.3. Efeitos da espécie leguminosa em estudo

O nível de inclusão necessário para se notar um efeito hipocolesterolémico da leguminosa pode depender da espécie em estudo. Estas diferenças específicas às espécies são no entanto difíceis de avaliar, visto existirem poucas comparações directas de leguminosas utilizando o mesmo protocolo experimental. Apesar disto, as evidências sugerem que certas leguminosas são mais eficazes que outras, provavelmente devido a diferenças na sua composição (quantitativa e qualitativa) em fibra alimentar, proteína e componentes bioactivos (Soni *et al.*, 1982; Shutler *et al.* 1988; Kingman *et al.*, 1993; Kahlon e Shao, 2004). Em suínos hipercolesterolémicos em crescimento, Shutler *et al.* (1988) e Kingman *et al.* (1993) demonstraram que o consumo de regimes contendo

respectivamente 300 e 333 g·kg⁻¹ MS de grãos de feijão, feijão-espadinho (*Phaseolus lunatus* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.) ou lentilhas (*Lens culinaris* Medikus), reduzem em proporções diferentes a colesterolemia quando comparados com regimes controle à base de caseína e amido de milho.

6.1.4. Efeito do consumo de leguminosas nos diferentes “pools” de colesterol

No plasma, o colesterol das LDL parece ser o mais sensível à intervenção com leguminosas, descendo paralelamente à redução em colesterol total (Shutler, 1988). Em humanos consumindo luzerna, a apo B plasmática acompanhou a redução do colesterol das LDL, sugerindo um decréscimo no número e não no tamanho das partículas de LDL circulantes (Molgaard *et al.*, 1987). Tal decréscimo pode resultar de uma diminuição na formação de LDL (por conversão das VLDL em LDL ou síntese hepática) ou de um aumento específico no catabolismo das LDL (Shutler, 1988; Huff *et al.*, 2002). Por seu lado, os níveis de colesterol das HDL e da apo A₁ não são em geral afectados pelos regimes à base de leguminosas, apesar de haverem alguns relatos que referem um aumento (Anderson *et al.*, 1984b) e outros uma redução (Shutler *et al.*, 1989). A longo prazo, nota-se uma redução na relação entre o colesterol das LDL e o das HDL (Anderson *et al.*, 1984a).

Alguns estudos epidemiológicos indicam que o consumo de grandes quantidades de grãos de leguminosas está associado ao aumento da prevalência de cálculos biliares formados por acumulação de colesterol, sugerindo que as leguminosas podem afectar a capacidade de saturação da biliar em colesterol (Covarrubias *et al.*, 1984). De facto, o consumo por humanos de uma mistura de leguminosas contendo feijão, ervilha e lentilhas (120 g MS·d⁻¹), além de reduzir a colesterolemia total e os níveis de colesterol das LDL, originou um aumento da concentração em colesterol na biliar vesicular (Nervi *et al.*, 1989). Thewles *et al.* (1993) relacionaram tal saturação biliar com a absorção de sapogeninas, as quais estimulariam a secreção biliar de colesterol (ver 6.2.4.).

A excreção fecal de esteróis neutros e ácidos tem sido determinada em poucos estudos e essencialmente com modelos animais consumindo componentes das leguminosas (ver 6.2.). Os dados existentes em relação à acção *in vitro* (Kahlon e Shao, 2004) e ao consumo de grãos de leguminosas (Malinow *et al.*, 1980; Sharma, 1984 e 1986; Duane, 1997; Jenkins *et al.*, 2001; Macarulla *et al.*, 2001) indicam uma correlação negativa entre a colesterolemia e a excreção de esteróis em humanos e modelos animais normo e hipercolesterolémicos. No entanto, num estudo realizado em suínos hipercolesterolémicos consumindo grãos de feijão, feijão-espadinho e ervilha, a diminuição da colesterolemia obtida não foi acompanhada por alterações ao nível da

excreção de esteróis, cerca de 10 vezes superior à verificada nos suínos consumindo o regime caseína sem adição de colesterol (Kingman *et al.*, 1993). Estes resultados podem ter sido devidos a uma suplementação excessiva em colesterol, quer directa (10 g·kg⁻¹), quer indirectamente (incorporação nos regimes de cerca de 130 g·kg⁻¹ de gordura animal).

6.2. O consumo de componentes das leguminosas e seus efeitos

Quando consumidos isolados, muitos dos componentes das leguminosas apresentam características hipocolesterolémicas. Dados obtidos em estudos com humanos e modelos animais sugerem que tais componentes (polissacáridos não amiláceos (PNA), lípidos, proteínas, saponinas e fitosteróis, por exemplo) intervêm no metabolismo lipídico através de diferentes mecanismos, actuando em consonância com vista à redução do nível sanguíneo de colesterol (Shutler *et al.*, 1987a; Kingman, 1991; Lin *et al.*, 2004).

6.2.1. A fibra alimentar

Em monogástricos, a fibra alimentar é definida como o conjunto da lenhina e dos polissacáridos vegetais que escapam à digestão enzimática intestinal, o que engloba numerosos compostos das células vegetais (Jones, 2002). Estudos epidemiológicos em humanos e modelos animais têm correlacionado negativamente a quantidade de fibra consumida com patologias como as doenças cardiovasculares (Trowell, 1972) e tumores do cólon (Burkitt, 1971), e positivamente com os efeitos hipocolesterolémicos (Hillman *et al.*, 1985; Shutler *et al.*, 1987b; Fernandez, 2001). No entanto, os primeiros estudos a testar esta última sugestão originaram resultados aparentemente conflituosos, devido a um conhecimento incompleto da acção das diferentes fracções da fibra alimentar (Hillman *et al.*, 1985; Shutler *et al.*, 1987b). Actualmente, sabe-se que a lenhina (Valencia e Chavez, 1997) e a fracção insolúvel dos PNA (celulose e algumas hemiceluloses) têm pouca ou nenhuma influência na colesterolémia (Kim *et al.*, 1981; Anderson *et al.*, 1994; Kreuzer *et al.*, 2002), ao contrário da fracção solúvel dos PNA (pectinas, gomas, mucilagens e algumas hemiceluloses de leguminosas, cereais, frutos e *Psyllium* (*Plantago* spp.)) (Jenkins *et al.*, 1975; Reddy *et al.*, 1980; Kritchevsky, 1987; Anderson *et al.*, 1994; Sindhurani e Rajamohan, 1998; Kreuzer *et al.*, 2002). O declínio no colesterol plasmático assim obtido em sujeitos normo e hipercolesterolémicos é significativo quando o consumo de fibra é igual ou superior a 25 g·d⁻¹ (Fernandez, 2001) e resulta geralmente de uma diminuição do colesterol das LDL, sem afectar o nível de colesterol das HDL e o dos triacilgliceróis (Anderson *et al.*, 1984b; Shutler, 1988; Fernandez, 2001). Por fim, o

amido resistente, definido como aquele que escapa à digestão no intestino delgado e presente em leguminosas e cereais (Englyst *et al.*, 1992) pode também gerar efeitos hipocolesterolémicos por mecanismos semelhantes aos detectados na presença da fracção solúvel dos PNA (Topping, 1991; Abadie *et al.*, 1994).

A hipótese mais aceite sobre o efeito hipocolesterolémico destes compostos envolve um metabolismo biliar alterado, mediado pela capacidade dos componentes da fracção solúvel dos PNA formarem no duodeno ligações químicas (hidrófilas ou hidrófobas) com os ácidos biliares e/ou sequestrarem as micelas mistas ou seus componentes (colesterol incluído) em géis ou soluções viscosas. Tais capacidades, comparáveis às das resinas terapêuticamente utilizadas para reduzir a hipercolesterolemia e já verificadas *in vitro* (Kritchevsky e Story, 1974) e *in vivo* (Vahouny *et al.*, 1980; Soni *et al.*, 1982), contribuem para o aumento da excreção fecal de ácidos biliares e colesterol (Reddy *et al.*, 1980; Soni *et al.*, 1982) ou levam à libertação dos compostos sequestrados no intestino grosso após a fermentação da fibra solúvel, local onde a sua absorção é menos eficiente que a verificada no intestino delgado (Vahouny *et al.*, 1980; Kreuzer *et al.*, 2002). Esta fracção solúvel origina também um aumento da duração do trânsito intestinal e da microflora e metabolismo intestinal (Truswell, 1993). No intestino grosso, o aumento da actividade microbiana origina uma desconjugação e 7 α -desidroxilação acrescidas, sendo os ácidos biliares resultantes não tão facilmente absorvidos (Hillman *et al.*, 1986). A diminuição ou inibição da absorção intestinal dos ácidos biliares e do colesterol repercute-se no ciclo enterohepático, estimulando a utilização de colesterol para a síntese de novos ácidos biliares, bem como a depleção do "pool" corporal deste esteroide (Marlett *et al.*, 1994). Por seu lado, componentes da fracção insolúvel dos PNA como a celulose diminuem a duração do trânsito intestinal e aumentam a excreção fecal de MS, o que, apesar do aumento simultâneo na massa microbiana, pode contribuir para a diminuição da absorção dos ácidos biliares (Sacquet *et al.*, 1982). O consumo de PNA insolúveis origina também um aumento da síntese do ácido quenodesoxicólico. O aumento neste ácido biliar primário, um efeito contrário àquele promovido pelos PNA solúveis, deve-se ao facto da fermentação microbiana de PNA insolúveis como a celulose originarem um abaixamento do pH do conteúdo cólico. Esta alteração de pH inibe a 7 α -desidroxilase microbiana e interfere na obtenção e absorção do ácido desoxicólico, o qual inibe a síntese hepática do ácido quenodesoxicólico (Hofman, 1988). A possível aptidão hipocolesterolémica da fracção insolúvel dos PNA parece também ser modulada pela retenção física de colesterol e de ácidos biliares (além de outros compostos alimentares) numa matriz de compostos não digeridos (Kies, 1985).

O facto de nem sempre se verificar uma relação directa entre a capacidade de ligação dos PNA a ácidos biliares e a diminuição da colesterolémia levou vários autores a

sugerirem mecanismos de acção diferentes. Assim, sabendo-se que a fracção solúvel dos PNA das leguminosas são fermentados no ceco-cólon originando ácidos gordos voláteis (AGV) que são absorvidos e transportados pela veia porta ao fígado (Cummings, 1981), onde o ácido propiónico foi implicado na inibição da síntese *de novo* do colesterol (Bush e Milligan, 1971), estes eventos foram correlacionados com o efeito hipocolesterolémico da fibra. Parecendo confirmar esta hipótese, a suplementação de regimes ricos em colesterol com ácido propiónico originou decréscimos na colesterolémia em ensaios com suínos (Thacker *et al.*, 1981) e ratos (Chen *et al.*, 1984). No entanto, a inibição *in vitro* da HMG CoA reductase só foi detectada com níveis deste ácido superiores aos observados *in vivo* no fígado e intestino (Illman *et al.*, 1988), não se verificando quando tais níveis eram semelhantes aos fisiológicos (Nishina e Freedland, 1990). Por outro lado, estes efeitos foram detectados em suínos a perder peso (Thacker *et al.*, 1981) devido à depressão do apetite induzida pela ingestão de ácido propiónico. Experiências mais recentes em suínos e ratos, onde a infusão cecal de pectina (Ahrens *et al.*, 1986), de ácido propiónico (Beaulieu e McBurney, 1992) ou a suplementação deste AGV (Illman *et al.*, 1988), bem como a fermentação de regimes ricos em pectina e fibra de ervilha (Stark e Madar, 1993) não inibiram a síntese *de novo* nem diminuíram a colesterolémia, sugerem que a modulação *in vivo* do metabolismo do colesterol pelo ácido propiónico não passa pela inibição da actividade enzimática da HMG CoA reductase e é questionável. Outros mecanismos envolvendo a elevada capacidade de retenção de água da fracção solúvel dos PNA e alterações da relação entre as substâncias lipídicas absorvidas utilizadas na síntese das lipoproteínas intestinais, da dimensão dos quilomicrons e VLDL sintetizadas no intestino e/ou fígado (Vahouny *et al.*, 1980; Shutler *et al.*, 1987b), bem como a diminuição da taxa de absorção de glucose, originando menores insulínemias (Kerckhoffs *et al.*, 2002) têm sido também sugeridos para explicar os efeitos da fibra alimentar no metabolismo do colesterol.

Os grãos de leguminosas são considerados uma fonte concentrada de fibra alimentar. Nas leguminosas consumidas pelo Homem, o teor em fibra varia com a espécie em causa e pode ir em média de 80 a 275 g·kg⁻¹, com a fracção solúvel a variar entre 33 e 138 g·kg⁻¹ (Guillon e Champ, 2002) (ver Anexo II). A fibra solúvel destes grãos é apontada por vários autores como o seu principal factor hipocolesterolémico. Assim, o consumo de extractos de fibra de ervilha, grão-de-bico, lentilhas e feijões das espécies *Vigna radiata* (L.) Wilczek e *Vigna mungo* (L.) Hepper por ratos hipercolesterolémicos originou decréscimos na colesterolémia (Soni *et al.*, 1982). Quando sujeitos a extracção lipídica, os resíduos fibrosos de feijão-frade (*Vigna unguiculata* (L.) Walpers) e fenacho (*Trigonella foenum-graecum* L.) mantiveram a capacidade de reduzir o nível de colesterol sanguíneo (Mahadevappa e Raina, 1983; Sharma, 1986). No entanto, tais resultados

podem ter sido potencializados pelo efeito da proteína, das saponinas e de outros compostos bioativos possivelmente hipocolesterolémicos presentes após extracção lipídica. Só estudos como o de Sharma (1984), testando a fracção pectínica do grão-de-bico, demonstram o efeito do consumo das fracções fibrosas isoladas. Assim, o consumo de pectina durante 2 semanas por ratos hipercolesterolémicos reduziu o colesterol sérico e hepático. No entanto, o consumo do grão-de-bico inteiro induziu reduções mais marcadas, bem como um aumento significativo da excreção diária de ácidos biliares, provavelmente devido à presença de saponinas no grão (Sharma, 1984), as quais facilitariam a ligação dos ácidos biliares à fibra (Oakenfull e Fenwick, 1978) (ver 6.2.4.). Outra fracção solúvel isolada de PNA estudada pelo seu efeito hipocolesterolémico em humanos (Jenkins *et al.*, 1975; Simons *et al.*, 1982; Turner *et al.*, 1990) e modelos animais (Chen e Anderson, 1979; Ahrens *et al.*, 1991; Fernandez, 1995; Fadden *et al.*, 1999) é a goma de guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.), uma galactomanana que actua como polissacárido de reserva da leguminosa. Esta goma é altamente viscosa em solução e a sua influência na viscosidade luminal intestinal é tida como a causa dos seus efeitos fisiológicos (Blackburn *et al.*, 1984) que incluem reduções no colesterol total e no colesterol das LDL, detectáveis 2 semanas após o início do seu consumo (Jenkins *et al.*, 1975; Khan *et al.*, 1981; Kingman, 1991; Fadden *et al.*, 1999). Estes efeitos podem acentuar-se durante mais 2 semanas antes de estabilizarem (Simons *et al.*, 1982), sendo a goma de guar mais eficaz a reduzir a colesterolémia em sujeitos normocolesterolémicos que a goma de alfarroba (*Ceratonía siliqua* L.) e os grãos de leguminosas (Zavoral *et al.*, 1983; Kingman, 1991). Em humanos consumindo goma de guar (30 g·d⁻¹), a menor reabsorção intestinal de esteróis neutros e ácidos detectada originou a redução dos níveis das LDL e IDL circulantes. Esta redução, atribuída ao aumento do catabolismo hepático das apo B, foi modulada pelo aumento da produção de receptores de LDL hepáticos (e de colesterol) com vista à obtenção de colesterol suficiente para a síntese compensatória de novos ácidos biliares (Turner *et al.*, 1990).

Os polissacáridos estruturais de leguminosas têm vindo a ser cada vez mais utilizados pela indústria alimentar humana (Belitz e Grosch, 1999). No entanto, a utilização destes polissacáridos, nomeadamente os de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), não tem demonstrado inequivocamente ser capaz de reduzir o nível de colesterol sanguíneo em sujeitos normocolesterolémicos (Kingman, 1991). Quando tal decréscimo se verifica, geralmente em sujeitos hipercolesterolémicos (Shorey *et al.*, 1985; Lo *et al.*, 1986), resulta de uma redução no colesterol das LDL (Lo *et al.*, 1986; Kingman, 1991). A excreção de esteróis neutros e ácidos em humanos e modelos animais consumindo polissacáridos estruturais, ainda pouco estudada, tem também originado resultados contraditórios (Kreuzer *et al.*, 2002). Os efeitos não uniformes do seu consumo estariam

assim relacionados com as características físico-químicas da(s) componente(s) utilizada(s) (Kingman, 1991).

As leguminosas têm também demonstrado capacidade de diminuir os níveis de triacilgliceróis sanguíneos em sujeitos hipertriacilglicerolémicos (Anderson *et al.*, 1984b; Shutler *et al.*, 1987b; Kingman, 1991). Sendo os regimes ricos em leguminosas regra geral pobres em mono e dissacáridos, este efeito pode estar relacionado com a diminuta resposta insulínica detectada após o seu consumo, a qual está associada a baixos níveis de triacilglicerolémia (Frost *et al.*, 1999). Segundo Jenkins *et al.* (1983) os níveis deprimidos de glucose e insulina verificados após a ingestão de uma mistura de grãos de leguminosas secos, estariam relacionados com a taxa lenta à qual as leguminosas libertam os produtos de digestão do amido, quando incubadas em sucos digestivos humanos. Tal foi atribuído à natureza do próprio amido e à rigidez das células nas quais ele está armazenado (Würsch *et al.*, 1986; Guillon e Champ, 2002).

6.2.2. A componente lipídica

Estudos epidemiológicos e resultados experimentais estabeleceram uma correlação positiva entre a ingestão de lípidos alimentares e a colesterolémia média numa população (Greer *et al.*, 1966; Keys, 1970; Martincic *et al.*, 1984; Kwiterovich, 1997). No entanto, as diferenças qualitativas nos tipos de lípidos são determinantes na expressão desta correlação. O consumo de regimes experimentais contendo ácidos gordos individualizados tem sugerido que o efeito hipercolesterolémico dos ácidos gordos está inversamente relacionado com o tamanho da sua cadeia mas não com o seu grau de saturação. Excepção à regra é a classe dos polinsaturados, que parece ver a sua influência alterar-se consoante a configuração e o grau de insaturação (Siljander-Rasi *et al.*, 1994; Khosla e Sundram, 1996; Smith, 1998). A relação entre ácidos gordos polinsaturados e saturados é assim particularmente importante, chegando os regimes alimentares ricos em ácidos gordos polinsaturados a ter uma influência mais forte no colesterol plasmático que um regime pobre em lípidos totais (Woollett *et al.*, 1992).

A substituição de lípidos animais por lípidos vegetais, com uma componente polinsaturada maior, origina um decréscimo nos níveis séricos de colesterol total (Hutagalung *et al.*, 1969; Kwiterovich, 1997; Harris *et al.*, 2003), fundamentalmente ao nível do colesterol das LDL (Siljander-Rasi *et al.*, 1994; Kwiterovich, 1997; Harris *et al.*, 2003). Os mecanismos envolvidos ainda não foram identificados, sugerindo-se para tal a influência negativa da estrutura tridimensional dos ácidos gordos polinsaturados na capacidade de transporte de colesterol das LDL (Spritz e Mishkel, 1969), decréscimos na produção de LDL a partir das VLDL (Boberg *et al.*, 1981) e alterações na composição das

LDL que levam possivelmente ao seu catabolismo acelerado (Shepherd *et al.*, 1980). Aumentos da excreção de colesterol (Connor *et al.*, 1969; Balasubramaniam *et al.*, 1985) e da secreção e excreção de ácidos biliares (Connor *et al.*, 1969; Ramesha *et al.*, 1980) são também referidos e autores como Shutler *et al.* (1987a) e Khosla e Sundram (1996) sugerem mesmo uma acção em paralelo de alguns ou de todos estes mecanismos. Os ácidos gordos polinsaturados parecem também estimular a transcrição de genes envolvidos no metabolismo lipídico (como ligandos de vários factores de transcrição como o LXR e os PPAR α ("Peroxisome proliferator-activated receptor α "), estes últimos via modulação da expressão de genes como o *SR-BI* e o *ABCA1*) ao mesmo tempo que deprimem a dos envolvidos na síntese (por exemplo via inibição da transcrição das SREBP) (Worgall *et al.*, 1998; Lada e Rudel, 2003). O ácido oleico, monoinsaturado, exerce um efeito hipocolesterolémico através da modulação da produção de receptores hepáticos de LDL em hamsters. Sendo este ácido o substrato preferencial da ACAT, ele estimula a esterificação do colesterol hepático, diminuindo assim o "pool" de colesterol livre, regulador da expressão dos citados receptores (Daumerie *et al.*, 1992). Segundo estes autores, os ácidos gordos saturados exerceriam precisamente o efeito contrário, resultados que foram confirmados por Faidley *et al.* (1999) em suínos. Mais recentemente, autores como Zyriax e Windler (2000) vieram chamar a atenção para o efeito na colesterolémia dos ácidos gordos do tipo *trans*, indicando que o seu consumo aumenta o colesterol das LDL e reduz o das HDL, pelo que deveria ser limitado, tal como o dos ácidos gordos saturados.

Os lípidos alimentares são essencialmente constituídos por triacilgliceróis, ácidos gordos e colesterol. Os ácidos gordos presentes nos triacilgliceróis alimentares podem ser saturados ou insaturados, essencialmente do tipo *cis*. Os ácidos gordos saturados como o palmítico (16:0) predominam nos tecidos adiposos animais. Os ácidos gordos monoinsaturados como o oleico (18:1) são comuns nos lípidos vegetais e animais, e os polinsaturados como o linoleico (18:2) prevalecem nos lípidos vegetais e dos animais marinhos. É nesta última categoria que se incluem as famílias ω -3 e ω -6 (Khosla e Sundram, 1996; Orzechowski *et al.*, 2002). Por fim, os ácidos gordos *trans*, que resultam da hidrogenação dos ácidos gordos *cis*, têm como fonte natural os produtos lácteos e a carne de ruminantes, para além de estarem presentes em quantidade apreciáveis em certos alimentos processados (Zyriax e Windler, 2000). Se exceptuarmos as oleaginosas como a soja, o tremçoço (*Lupinus spp.*) e o amendoim (*Arachis hypogea L.*), a maioria das leguminosas é amilácea, contendo apenas pequenas doses de lípidos totais (Belitz e Grosch, 1999). Assim, poder-se-ia supor que o efeito hipocolesterolémico dos regimes à base de leguminosas resultaria de uma mera substituição de lípidos alimentares por hidratos de carbono. No entanto, são vários os estudos que demonstram tal efeito das

leguminosas quando comparadas a regimes controlo com proporções idênticas dos principais grupos de macronutrientes (Shutler *et al.*, 1987a; Khosla e Sundram, 1996). Os lípidos das leguminosas são altamente insaturados, contendo em particular ácidos linoleico e linolénico (18:3), cuja contribuição na redução do nível de colesterol sanguíneo em humanos e modelos animais tem sido sugerida (Khosla e Sundram, 1996; Zyriax e Windler, 2000). Regimes suplementados com um extracto lipídico de grão-de-bico (30 g·kg⁻¹) originaram uma redução no colesterol plasmático de ratos hipercolesterolémicos (Mathur *et al.*, 1964), o mesmo se verificando com o consumo de extractos lipídicos de feijão-frade (30 g·kg⁻¹), apesar desta ter sido inferior à obtida pelo consumo do grão extraído e do grão inteiro (Mahadevappa e Raina, 1983). Neste caso, os lípidos presentes no extracto (essencialmente triacilgliceróis de ácidos gordos polinsaturados e fitosteróis) contribuíram de forma importante para o efeito hipocolesterolémico, mas não foram o único factor interveniente. Por outro lado, extractos lipídicos de fenacho (21 g·kg⁻¹) consumidos por ratos hiperlipémicos (Sharma, 1986) não afectaram a colesterolémia, ao contrário do grão extraído e do grão inteiro. Como nesta experiência não foi apresentado o perfil lipídico do extracto, pode-se supor que os níveis de ácidos gordos insaturados, fitosteróis ou outras substâncias extraídas pelo hexano diferiram dos obtidos nas outras experiências. Tal confirma a importância da composição qualitativa dos extractos lipídicos no desencadear dos efeitos hipocolesterolémicos (Khosla e Sundram, 1996; Zyriax e Windler, 2000).

6.2.3. A componente proteica

Estudos epidemiológicos indicam que a incidência de (e mortalidade por) doenças cardiovasculares está correlacionada positivamente com o consumo de proteína de origem animal (proteína animal) (Yudkin, 1957) e negativamente com o de proteína de origem vegetal (proteína vegetal) (Connor e Connor, 1972). Resultados experimentais obtidos em humanos (Kritchevshy, 1979; Terpstra *et al.*, 1983) e em modelos animais como o suíno (Kim *et al.*, 1978 e 1980), o coelho (Terpstra e Sanchez-Muniz, 1981) e o rato (Jacques *et al.*, 1986; Potter, 1995), também sugerem uma influência do tipo de proteína alimentar na colesterolémia. No entanto, a obtenção destes resultados tem sido mais consistente em estudos com humanos e modelos animais hipercolesterolémicos (Terpstra *et al.*, 1982b; Shutler *et al.*, 1987a; Kingman, 1991) que com humanos e modelos animais normocolesterolémicos (Jacques *et al.*, 1986; Carroll e Kurowska, 1995). O modelo biológico utilizado, bem como diferenças na quantidade e tipo de ingredientes empregues na formulação dos regimes, incluindo o tipo de proteína, parecem também influenciar a magnitude do efeito (Potter, 1998; Belleville, 2002).

O efeito da quantidade de proteína consumida na colesterolémia de modelos animais tem dado resultados inconsistentes, inter e intra-espécie. Em coelhos, o aumento do consumo de caseína eleva proporcionalmente os níveis plasmáticos de colesterol, facto não verificado com a proteína vegetal (Huff *et al.*, 1977). Em suínos, o consumo de regimes pobres em proteína vegetal tende a aumentar (Greer *et al.*, 1966; Hutagalung *et al.*, 1969) ou não afecta (Pfeuffer *et al.*, 1988) a sua colesterolémia, ao passo que em ratos não a afecta (Madani *et al.*, 2000) ou diminui-a. Neste animal, regimes pobres em proteína de soja originaram uma diminuição das LDL plasmáticas, tendo os seus níveis normalizado após a adição de colina ao regime ou após a substituição da soja por uma quantidade similar de caseína, mais rica em metionina (Olson *et al.*, 1958). Com base nestas observações, os autores afirmaram que a metionina seria necessária para a biossíntese da colina, a qual por sua vez é essencial à síntese da fosfatidilcolina das LDL. Tal facto, parece assim relacionar o efeito hipocolesterolémico verificado com o desequilíbrio num aminoácido e não com uma carência em proteína *per se*.

O mecanismo na base do efeito na colesterolémia das proteínas vegetais não foi ainda completamente elucidado (Potter, 1998) e são várias as hipóteses propostas para o explicar. Este efeito parece estar parcialmente relacionado com a sua composição em aminoácidos, nomeadamente nos essenciais (Jones, 2002), mas ainda não existem certezas. A metionina, por exemplo, tem apresentado (Morita *et al.*, 1997) ou não (Kim *et al.*, 1978; Kern *et al.*, 2002) efeitos hipercolesterolémicos. Por seu lado, a relação lisina:arginina da proteína alimentar parece desempenhar um papel importante no efeito colesterolémico e aterogénico (Kritchevsky, 1979). Assim, a relativa abundância de lisina na proteína animal foi relacionada com a inibição da actividade da arginase hepática (Cittadini *et al.*, 1964), o que aumenta a disponibilidade em arginina para a síntese da apo B das LDL, rica neste aminoácido. Parecendo sustentar tal hipótese, a adição de lisina à proteína de soja com vista a que a relação lisina:arginina desta simulasse a da caseína, levou à diminuição do seu efeito hipocolesterolémico. No entanto, a adição de arginina à caseína de modo a que a sua relação lisina:arginina simulasse a da soja originou resultados inconclusivos (Kritchevsky, 1979). Por fim, ao demonstrarem que o efeito hipocolesterolémico da proteína de soja era mimetizado pelos seus hidrolisados enzimáticos mas não pelas misturas de aminoácidos simulando a proteína de soja, Huff *et al.* (1977), Nagata *et al.* (1982) e Tanaka *et al.*, (1984) sugeriram que a composição em aminoácidos das proteínas poderia não explicar totalmente o seu efeito na colesterolémia. Na realidade, Jacques *et al.* (1986) demonstraram *in vitro* que, após uma digestão proteica de 6 h, a composição em aminoácidos dos produtos obtidos era diferente da das fontes proteicas originais.

Quando presente, o efeito hipocolesterolémico dos produtos à base de proteína vegetal é muito semelhante ao obtido com os grãos de leguminosas. Este efeito centra-se principalmente na redução do colesterol das LDL, paralela a uma descida na quantidade de apo B circulante (Ho *et al.*, 1989; Carroll e Kurowska, 1995). Segundo Sirtori *et al.* (1984) e Lovati *et al.* (1992) as globulinas da soja, particularmente a 7S, induzem *in vitro* um aumento no metabolismo hepático das lipoproteínas ao estimular a expressão dos receptores de LDL. A modulação ao nível da apo B circulante pode ser acompanhada por descidas na concentração das apo A₁ e E, o que sugere uma intervenção dos péptidos resultantes da digestão proteica na síntese das apoproteínas e lipoproteínas (quilomicrons e VLDL) nos enterócitos, com o consequente efeito deletério na eficiência de transporte do colesterol alimentar para a linfa e para o “pool” plasmático (Ho *et al.*, 1989). No entanto, dada a elevada digestibilidade da proteína de soja, é de crer que a globulina 7S dificilmente é absorvida intacta ou sob a forma de péptidos de elevado peso molecular em quantidades apreciáveis, o que torna este papel hipocolesterolémico *in vivo* questionável (Kerckhoffs *et al.*, 2002). Por seu lado, o metabolismo hepático do colesterol parece também ser afectado ao nível enzimático. Assim, a actividade da HMG CoA reductase de coelhos e ratos normocolesterolémicos consumindo isolados proteicos de soja (Huff e Carroll, 1980; Sirtori *et al.*, 1984; Madani *et al.*, 1998), bem como a actividade da CYP7A1 de ratos consumindo isolados proteicos de soja, batata (*Solanum tuberosum* L.) e arroz (*Oriza sativa* L.) (Morita *et al.*, 1997) foram superiores quando comparadas com as actividades enzimáticas de animais consumindo caseína.

Proteínas vegetais como a de soja aumentam a excreção fecal de esteróis neutros (Kim *et al.*, 1980; Beynen *et al.*, 1990; Catala *et al.*, 2000) e ácidos (Kim *et al.*, 1978 e 1980; Van der Meer e Beynen, 1987; Beynen *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 2004) quando comparadas com a caseína. Segundo Sugano *et al.* (1990), a hidrólise gástrica ou intestinal de isolados proteicos de soja origina uma fracção insolúvel de elevado peso molecular muito eficaz a adsorver ácidos biliares aos seus péptidos hidrófobos. Por isso, nos estudos onde misturas de aminoácidos simularam a proteína de soja (Huff e Carroll, 1980; Nagata *et al.*, 1982; Tanaka *et al.*, 1984), estas não foram tão eficazes como a proteína a aumentar a excreção dos ácidos biliares. A diminuição da circulação enterohepática dos esteróis é assim fundamental para a acção hipocolesterolémica das proteínas vegetais, ao modular o metabolismo do colesterol com vista à biossíntese de novos ácidos biliares. Esta alteração leva geralmente ao catabolismo do colesterol das LDL através de um aumento da síntese dos receptores hepáticos de LDL ou ao aumento na síntese *de novo* deste esterol (Kim *et al.*, 1980; Beynen *et al.*, 1990; Potter, 1995).

Os aminoácidos resultantes da digestão proteica das leguminosas modulam a secreção de certas hormonas que parecem afectar a colesterolémia. Quando comparada com a da proteína animal, a digestão da proteína vegetal origina conteúdos maiores de arginina e menores de aminoácidos ramificados como a leucina. Estes últimos são conhecidos por aumentar a síntese de insulina, pelo que a digestão da proteína vegetal pode originar uma diminuição da relação insulina:glucagon e assim inibir a actividade da HMG CoA reductase, reduzindo a colesterolémia (Forsythe *et al.*, 1986). A proteína de soja também modula a libertação das hormonas da tiróide, especialmente através da elevação da tiroxina plasmática, a qual parece induzir um aumento nos receptores de LDL hepáticos (Scholz-Ahrens *et al.*, 1990) que precede as alterações na colesterolémia (Wright e Salter, 1993). No entanto, dados experimentais mais recentes não confirmam este efeito hipocolesterolémico da tiroxina (Balmir *et al.*, 1996). Também foi sugerido que o efeito das proteínas na colesterolémia, particularmente o da caseína, seria modulado pelo balanço mineral. A caseína contém menos zinco e cobre que a proteína de soja, pelo que foi sugerido que o seu efeito hipercolesterolémico seria devido a uma menor ingestão nestes minerais (Allotta *et al.*, 1985). Esta hipótese não foi confirmada por estudos recentes, os quais apontam para uma fraca ou nula intervenção dos minerais no metabolismo do colesterol, nomeadamente do cobre (Armstrong *et al.*, 2001) e do zinco (Paul *et al.*, 2001).

A questão proteína animal *versus* proteína vegetal tem sido fortemente restringida ao estudo da caseína e da proteína de soja, duas proteínas bem caracterizadas e de fácil isolamento e obtenção. Apesar de todas as leguminosas serem fontes importantes de proteína vegetal, são poucos os estudos investigando a contribuição de proteínas de leguminosas que não a soja. Entre eles, referem-se estudos utilizando proteínas da ervilha (Jacques *et al.*, 1986), do feijão, do feijão-frade (Finnigan, 1983) e da fava (*Vicia faba* L.) (Macarulla *et al.*, 2001). A proteína de soja tem sido extensamente investigada também devido à sua versatilidade industrial e crescente utilização em alimentos para crianças, em produtos de panificação, pastelaria e em alimentos processados. Esta utilização tem-se generalizado ultimamente às proteínas de ervilha e tremço (Belitz e Grosch, 1999; Mellenthin e Galensa, 1999; Yoshie-Stark e Wäsche, 2004). No entanto, os produtos à base destas proteínas podem ser obtidos de várias formas e apresentar graus de pureza muito díspares, podendo assim originar interpretações erróneas de alguns resultados experimentais em trabalhos onde a sua caracterização é incompleta (Potter, 1995; Balmir *et al.*, 1996; Kerckhoffs *et al.*, 2002). Na realidade, os isolados proteicos de soja comerciais, que contêm geralmente valores elevados de saponinas, isoflavonas e outros componentes bioactivos (Anderson e Wolf, 1995), são muito mais eficazes a demonstrar efeitos hipocolesterolémicos que os isolados extra-puros. Assim, o consumo

de Cholsoy, um isolado proteico de soja que contém hidratos de carbono (40 g·kg⁻¹ de rafinose, 50 de estaquiose e 160 de PNA), leva à baixa do colesterol plasmático (Verrillo *et al.*, 1985) ao passo que a utilização de isolados proteicos de soja extra-puros (≥ 925 g·kg⁻¹) não (Pfeuffer *et al.*, 1988; Madani *et al.*, 1998 e 2000; Lucas *et al.*, 2001). Estes resultados sugerem que tal efeito está mais relacionado com os componentes não proteicos, isolados ou em conjunto com a proteína de soja, do que com a proteína *per se*.

6.2.4. As saponinas

As saponinas são glicosídeos de esteróis ou de triterpenos vulgarmente associadas à proteína vegetal (Price *et al.*, 1986; Champ, 2002) e encontram-se em quantidade relevante em leguminosas como a soja, a ervilha, o feijão e o grão-de-bico (Oakenfull, 1981; Price *et al.*, 1986), resistindo aos tratamentos térmicos (Anderson e Wolf, 1995). Estes complexos compostos anfipáticos estão associados a vários efeitos fisiológicos, entre os quais a capacidade de reduzir a colesterolémia pelo aumento da excreção fecal de colesterol e ácidos biliares (Oakenfull e Fenwick, 1978; Oakenfull, 1981; Sidhu e Oakenfull, 1986) de forma dose-dependente (Morehouse *et al.*, 1999). As leguminosas que demonstram um maior efeito hipocolesterolémico contêm saponinas, podendo estas ser responsáveis por tal efeito em estudos onde a redução do colesterol sanguíneo foi atribuída a outros componentes como a proteína e a fibra vegetais (Oakenfull e Fenwick, 1978; Potter, 1995). Segundo Thompson (1993), regimes contendo níveis de saponinas de 0,3 – 0,5 g·d⁻¹, podem reduzir a colesterolémia em 16 a 24%.

A absorção das saponinas ao nível do tracto digestivo é fraca e a sua actividade hipocolesterolémica parece desencadear-se essencialmente no lúmen intestinal. Ao verificarem *in vitro* que as saponinas formavam grandes micelas mistas com os ácidos biliares e/ou o colesterol, impedindo a sua absorção ao nível do intestino, Sidhu e Oakenfull (1986) confirmaram que a diminuição da colesterolémia por estes compostos resultava dum redução do ciclo enterohepático dos esteróis neutros e ácidos. O consumo de saponinas como as de soja, de quilaia (*Quilaja saponaria* Molina) ou dum preparado comercial denominado saponina branca, induz essencialmente um aumento da excreção de ácidos biliares (Newman *et al.*, 1957; Topping *et al.*, 1980; Oakenfull *et al.*, 1984), mas as de luzerna formam complexos insolúveis com o colesterol (Gestetner *et al.*, 1972; Birk e Peri, 1980), inibindo directamente a absorção intestinal do colesterol alimentar e endógeno (Oakenfull, 1981). Assim, saponinas de espécies vegetais diferentes, que são estruturalmente diferentes, actuam de maneira distinta. A sua acção parece também depender da interacção com outros componentes do regime, como o caso dos isolados proteicos de soja, com os quais as saponinas de quilaia formam

complexos insolúveis (Potter *et al.*, 1993). Mais recentemente Morehouse *et al.* (1999) notaram que a saponina sintética pamaquesida era eficiente a bloquear a absorção do colesterol alimentar e endógeno em coelhos, a concentrações muito inferiores às necessárias para complexar o esterol (relação molar saponina:colesterol de 1:4), induzindo aumentos significativos na excreção de esteróis neutros. Com base nestes resultados, os autores sugeriram que tal efeito seria resultado de uma interação desta saponina com o(s) transportador(es) membranar(es) de colesterol.

Parte das saponinas podem ser hidrolisadas pela microflora intestinal e absorvidas na forma de sapogeninas, como a diosgenina. Quando consumida por ratos, a diosgenina levou a um aumento da secreção de colesterol biliar (Ulloa e Nervi, 1985; Thewles *et al.*, 1993), tendo as diferentes formas de administração (oral e intraperitoneal) sugerido um efeito directo no fígado e não no lúmen intestinal (Ulloa e Nervi, 1985).

6.2.5. Os fitosteróis e os fitostanóis

As leguminosas e seus óleos apresentam na sua composição quantidades variáveis de vários esteróis vegetais ou fitosteróis, sendo os mais abundantes o β -sitosterol, o campesterol e o estigmasterol (Ling e Jones, 1995). Os fitostanóis, muito menos abundantes e presentes essencialmente no milho e outros cereais (Hicks e Moreau, 2001; Stuchlík e Zák, 2002), são fitosteróis saturados (5α -hidrogenados), como o β -sitostanol e o campestanol. Os fitosteróis também podem existir na forma livre, esterificados por ácidos gordos (Ling e Jones, 1995). Apesar da sua estrutura química ser semelhante à do colesterol, a presença de um grupo metilo ou etilo e de uma dupla ligação ao nível da cadeia lateral (fitosteróis) e a ausência da dupla ligação Δ^5 (fitostanóis) por comparação à molécula deste esterol, levam a que a absorção destes compostos se dê a taxas inferiores. Assim, mais de 95% dos fitosteróis e quase 100% dos fitostanóis ingeridos são detectados no cólon (Ling e Jones, 1995). Para além do ainda discutido efeito no combate a tumores do cólon (de Jong *et al.*, 2003), os fitosteróis e fitostanóis apresentam uma acção hipocolesterolémica ligada à inibição da absorção intestinal de colesterol (Lees *et al.*, 1977; Ikeda *et al.*, 1988a). Mesmo quando administrados em pequenas doses (1 a $1,5 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$, revisto por Hicks e Moreau, 2001) estes compostos diminuem o colesterol total e o colesterol das LDL em sujeitos normo e hipercolesterolémicos, sem alterar o das HDL (Miettinen e Gylling, 1999; Wester, 2000; Hicks e Moreau, 2001; de Jong *et al.*, 2003) e sem induzir efeitos secundários, mesmo após longos períodos de consumo (Lees *et al.*, 1977; Stuchlík e Zák, 2002).

O mecanismo pelo qual os fitosteróis e fitostanóis interferem na absorção do colesterol alimentar e endógeno depende da maior afinidade que estes compostos

apresentam para as micelas mistas, devido a uma hidrofobicidade maior que a do colesterol (Ling e Jones, 1995; Hicks e Moreau, 2001). Tal facto induz uma diminuição da solubilização micelar do colesterol e interfere assim com a sua absorção (Ikeda *et al.* 1988a; Pakarinen *et al.* 1996). Apesar desta substituição do colesterol pelos fitosteróis e fitostanóis nas micelas ser considerado o mecanismo mais importante na inibição da absorção do colesterol por estes esteróis (Carr *et al.* 2002), uma competição por parte dos fitosteróis para a ligação às células de bordadura em escova e/ou às mucinas superficiais celulares entéricas (Ikeda *et al.*, 1988a) e uma taxa de transferência mais lenta do β -sitosterol que do colesterol da superfície dos enterócitos para o espaço intracelular (Ikeda *et al.* 1990) têm também sido referidas. A discriminação na captação dos fitosteróis ao nível membranar nos enterócitos (Lu *et al.*, 2001) ou a possibilidade destes reduzirem a esterificação entérica do colesterol pela ACAT com a consequente diminuição da incorporação deste esterol nos quilomicrons (Ikeda *et al.* 1988b) podem também estar implicadas no processo. Por fim, a influência dos fitosteróis e fitostanóis na indução da expressão dos transportadores ABCA1, ABCG5 e ABCG8, aumentando o efluxo enterocitário do colesterol, é actualmente admitida apesar de ainda não quantificada (de Jong *et al.*, 2003; Turley e Dietschy, 2003).

A inibição da absorção intestinal do colesterol, originando um aumento da excreção fecal deste esterol em forma de esteróis neutros, leva a uma diminuição na entrada de colesterol alimentar e biliar via circulação portal no fígado, o que é geralmente acompanhado por um aumento compensatório da síntese *de novo* (Gyllin *et al.* 1999; Moghadasian 2000) e da expressão dos receptores hepáticos de LDL (de Jong *et al.*, 2003). O efeito líquido da acção dos fitosteróis implica uma redução do colesterol plasmático (Gyllin *et al.* 1999; Lin *et al.*, 2004) via colesterol das LDL (Heinemann *et al.* 1986; Miettinen e Gylling, 1999; de Jong *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2004). O β -sitostanol foi apontado como apresentando um efeito hipocolesterolémico mais importante que o β -sitosterol, provavelmente devido à sua menor absorção (Heinemann *et al.*, 1986). Tal sugestão, baseada na revisão de resultados experimentais onde, na maioria dos casos não foi realizada uma comparação directa do efeito de fitosteróis e fitostanóis, tem vindo a ser contrariada por resultados recentes. Hicks e Moreau (2001), Hayes *et al.* (2002) e Jones (2002) entre outros, compararam directamente tais compostos e obtiveram efeitos hipocolesterolémicos semelhantes com fitosteróis saturados ou não, mesmo quando consumidos como parte integrante de um regime pobre em lípidos e colesterol. Se eles forem correctamente solubilizados e incorporados na micelas, fitostanóis e fitosteróis são igualmente eficazes.

6.2.6. As isoflavonas

As isoflavonas são compostos fenólicos glicosilados ou não (agliconas) pertencentes ao grupo dos flavonóides. Encontram-se em várias leguminosas e em quantidades apreciáveis na soja e nos trevos vermelho (*Trifolium pratense* L.) e subterrâneo (*T. subterraneum* L.) (Harborne, 1971; Champ, 2002). As isoflavonas são sintetizadas durante a germinação, a partir de precursores como o ácido *p*-cumárico, presentes nas sementes dormentes (Goodwin, 1965). Excepção à regra é a soja, cujas sementes contêm já isoflavonas (0,12 a 0,31 mg·g⁻¹) (Eldridge e Kwolek, 1983). A concentração e composição destes compostos varia muito intra- e inter-espécie, dependendo também das condições edafo-climáticas e do posterior processamento industrial a que o material vegetal é sujeito (Eldridge e Kwolek, 1983; Champ, 2002).

Os efeitos fisiológicos das isoflavonas são vários, mas parecem depender de um consumo mínimo (30 a 50 mg·d⁻¹) para se expressarem (Setchell, 1998). Vários autores (Mathur *et al.*, 1968; Siddiqui e Siddiqui, 1976; Sharma, 1984) consideram-nas responsáveis pelo efeito hipocolesterolémico das leguminosas, como o parece sugerir a redução do nível de colesterol plasmático observada em ratos hipercolesterolémicos consumindo biochanina A e formononetina (derivados 4-metil-éter da genisteína e daidzeína) obtidas de sementes germinadas de grão-de-bico (Siddiqui e Siddiqui, 1976; Gopalan *et al.*, 1991). No entanto, apesar de isolados proteicos de soja cujas isoflavonas foram extraídas com etanol terem perdido o seu efeito hipocolesterolémico, o consumo do extracto resultante, rico em isoflavonas (Sirtori e Lovati, 2001), bem como o de extractos comerciais de isoflavonas de soja (Lin *et al.*, 2004) e o de leite de soja enriquecido em gliciteína (Sirtori *et al.*, 2000) não contribuiu para a redução do colesterol plasmático. Tal sugere que o efeito hipocolesterolémico depende do tipo de isoflavona presente, assim como da forma de administração. Quando evidente, este efeito exprime-se pela redução do colesterol das LDL (Balmir *et al.*, 1996; Lichtenstein, 1998; Kerckhoffs *et al.*, 2002).

O mecanismo de actuação das isoflavonas ainda não foi estipulado. O consumo de isoflavonas como a daidzina, genistina e glicitina leva à sua hidrólise pelas β -glicosidases dos microorganismos intestinais, originando as agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína ou outras isoflavonas mais simples (Setchell, 1998). Estes compostos, com uma estrutura e função semelhante à dos estrogénios dos mamíferos, quando absorvidos podem ligar-se a receptores estrogénicos (Shutt e Cox, 1972). Tendo sido observado que certos estrogénios fornecidos a ratos em doses farmacológicas induziam o aumento de receptores de LDL hepáticos (Windler *et al.*, 1980b), é possível que a actuação das isoflavonas seja desencadeada por um mecanismo semelhante, levando à redução do

nível plasmático destas lipoproteínas e do colesterol por elas transportado (Potter, 1998; Setchell, 1998). O seu papel na redução da susceptibilidade do colesterol das LDL à oxidação não deve ser desprezado e pode estar aliado a uma diminuição das lesões ateroscleróticas (Lichtenstein, 1998).

Os resultados experimentais descritos na bibliografia apontam para um efeito hipocolesterolémico dos grãos de leguminosas, mas os mecanismos através dos quais ele é obtido não são ainda conhecidos em detalhe. As reduções mais notáveis ao nível da colesterolémia obtêm-se quando se utilizam leguminosas (ou seus componentes) em regimes hiperlipémicos e hipercolesterolémicos (Mathur *et al.*, 1968; Soni *et al.*, 1982; Beynen *et al.*, 1990; Potter, 1995). Adicionalmente, a recente observação de que o consumo de componentes como as fibras e os fitosteróis apresentam efeitos sinérgicos na redução do colesterol plasmático por mecanismos diferentes, aponta para uma acção optimizada dos grãos de leguminosas quando consumidos inteiros (Macarulla *et al.*, 2001; Anderson e Major, 2002; Jenkins *et al.*, 2002). Por fim, o efeito do segmento cecocolón no metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos também ainda não foi completamente esclarecido. Assim, com vista a aprofundar os conhecimentos existentes sobre os efeitos do consumo de grãos de leguminosas inteiros no metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos de suínos intactos e com anastomose ileo-rectal, foi implementado o estudo experimental que a seguir se descreve.

III. ESTUDO EXPERIMENTAL

1. OBJECTIVOS DO ESTUDO

Este estudo teve como objectivo avaliar os efeitos do consumo de três espécies de leguminosas no metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos em suínos em crescimento intactos e com anastomose íleo-rectal, tornados hipercolesterolémicos pelo consumo de regimes enriquecidos em colesterol. A soja, universalmente consumida por humanos e animais, é a leguminosa mais estudada a nível do metabolismo do colesterol e foi utilizada para servir como referência em relação aos efeitos das outras leguminosas. O seu consumo na forma extrudida teve como finalidade evitar a influência de componentes bioactivos como os factores anti-tripsínicos (Anderson e Wolf, 1995; Friedman e Brandon, 2001) no modelo animal. Quanto à ervilha e ao tremço, leguminosas cada vez mais utilizadas nos regimes alimentares humano e animal, bem como na indústria de transformação alimentar (Pettersen, 1998; Guillon e Champ, 2002), estão ainda muito pouco estudadas ao nível dos seus efeitos na colesterolémia dos mamíferos. Assim sendo e caso modulassem a redução do colesterol plasmático, apresentariam um elevado potencial de utilização como alimentos funcionais com finalidades hipocolesterolémicas. Um segundo objectivo do trabalho foi determinar o efeito do segmento ceco-cólon no metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos deste modelo animal. Este segmento do intestino grosso pode desempenhar um papel importante neste metabolismo, nomeadamente quando os regimes alimentares consumidos são à base de leguminosas, cuja digestão se completa precisamente no ceco-cólon (Cummings, 1981; Conway, 1994). Para analisar o impacto deste segmento do intestino no metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos, recorreu-se à realização de anastomoses íleo-rectais em metade dos suínos utilizados nos trabalhos experimentais, uma técnica cirúrgica que permite a colheita dos conteúdos ileais por via natural.

Com vista a atingir os objectivos deste estudo, foram realizadas análises aos lípidos plasmáticos, hepáticos, biliares e fecais, bem como às actividades das principais enzimas envolvidas no metabolismo do colesterol e dos esteróis ácidos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais, instalações e equipamentos

Os trabalhos experimentais decorreram na Unidade de produção de Suínos do Centro de Estudos e Experimentação da Mitra, Universidade de Évora (Valverde, Portugal) e foram constituídos por três ensaios onde se estudaram os efeitos do consumo de três leguminosas (soja extrudida no Ensaio Soja, ervilha no Ensaio Ervilha e tremoço de folhas estreitas no Ensaio Tremoço) no metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal.

Em cada um dos ensaios foram utilizados 24 suínos machos cruzados (Duroc (♂) x (Large White x Landrace) (♀)) cedidos pelo Centro de Estudos e Experimentação da Mitra, Universidade de Évora. Os animais, vacinados (Bacterina mista porcina, Phylaxia, Budapeste, Hungria) e desparasitados, foram desmamados às 8 semanas de idade e sujeitos a um período de cria de 4 semanas, tendo posteriormente ingressado nos trabalhos experimentais.

Às 12 semanas de idade os suínos foram instalados em caixas metabólicas individuais (160 x 60 cm) com superfícies laterais amovíveis, uma manjedoura na porção frontal e tabuleiros metálicos permitindo a colheita separada de fezes ou conteúdo ileal e de urina. O PV inicial médio \pm erro padrão da média (EPM) dos animais utilizados foi de $30,1 \pm 0,8$, $29,8 \pm 0,6$ e $30,3 \pm 0,5$ kg respectivamente para os Ensaios Soja, Ervilha e Tremoço.

O maneo animal e os procedimentos experimentais a que os animais estiveram sujeitos foram realizados de acordo com os regulamentos e orientações éticas da Direcção de Serviços de Meios de Defesa da Saúde, Bem Estar e Alimentação Animal, Direcção Geral de Veterinária.

2.2. Regimes experimentais

Os regimes experimentais foram desenvolvidos recorrendo ao programa de formulação de alimentos compostos WinRações 4.00 (Softimbra2 – Agroinformática Lda., Coimbra, Portugal) com vista a apresentarem valores semelhantes de proteína bruta, certos aminoácidos essenciais (lisina, metionina e triptofano) e energia bruta. Os seus ingredientes foram adquiridos a várias empresas comerciais e misturados nas instalações da SANIPEC – Produtos para Pecuária Lda. (Alverca, Portugal).

2.2.1. Regimes à base de caseína e de soja extrudida

Um regime padrão semi-purificado à base de caseína ácida (C) e um regime contendo soja extrudida (SE), foram formulados. Cerca de 60% da proteína fornecida pela caseína no regime C foi substituída por proteína de grãos de soja extrudida (Sojex, Reagro Lda., Salvaterra de Magos, Portugal) no regime SE (Quadro IV). O colesterol, incluído nos regimes na proporção de 2,8 g·kg⁻¹, foi previamente dissolvido em óleo de soja. Ambos os regimes foram fornecidos na forma farinada.

Quadro IV. Ingredientes e composição química dos regimes experimentais (Ensaio Soja)

	Regime Caseína	Regime Soja
Ingredientes		g·kg⁻¹
Amido de milho	464,0	365,7
Sacarose	100,0	100,0
Palha de trigo	100,0	100,0
Óleo de soja	100,0	70,0
Caseína ácida	180,0	72,0
Sojex ⁽¹⁾	—	246,7
DL-Metionina	1,0	1,0
Carbonato de cálcio	16,2	12,3
Fosfato dicálcico	30,8	24,3
Cloreto de sódio	5,0	5,0
Mistura vitamínica e mineral ⁽²⁾	3,0	3,0
Colesterol	2,8	2,8
Composição química		g·kg⁻¹ MS
Matéria seca (g·kg ⁻¹)	910,6	917,4
Cinzas	73,8	109,7
Proteína bruta (N x 6,25)	159,8 ⁽³⁾	153,5 ⁽⁴⁾
Lípidos totais ⁽⁵⁾	95,2	102,8
Energia bruta (MJ·kg ⁻¹ MS)	17,8	17,9
Fibra insolúvel em detergente neutro (NDF)	82,1	114,1
Fibra insolúvel em detergente ácido (ADF)	51,2	74,1
Colesterol total	2,8	2,8
Fitosteróis totais	0,3	0,5

Notas: ⁽¹⁾ Grãos de soja extrudidos (extrusão a 16-18% humidade, 110 a 145° C e 2000 kPa de pressão);

⁽²⁾ Composição (mg·kg⁻¹ de regime): retinol, 30; colecalciferol, 5,4; DL- α -tocoferol, 22,5; tiamina, 0,75; riboflavina, 4,5; cianocobalamina, 0,023; D-biotina, 0,15; menadiona, 1,5; ácido fólico, 0,75; ácido nicotínico, 30; ácido pantoténico, 15; I, 1,13; Mn, 60; Zn, 150; Se, 0,18; Co, 0,15; Cu, 15; Fe, 135; antioxidante (BHT), 0,375;

⁽³⁾ Aminoácidos (g·kg⁻¹): Arg, 7,0; Cys-Cys, 1,0; Phe, 9,6; Gly+Ser, 14,2; His, 5,5; Ile, 9,2; Leu, 17,1; Lys, 14,0; Met, 5,9; Thr, 7,7; Val, 11,9;

⁽⁴⁾ Aminoácidos (g·kg⁻¹): Arg, 7,9; Cys-Cys, 1,5; Phe, 7,7; Gly+Ser, 12,4; His, 4,0; Ile, 7,2; Leu, 12,2; Lys, 9,2; Met, 3,5; Thr, 6,2; Val, 8,5;

⁽⁵⁾ Relação ácidos gordos polinsaturados : saturados : 3,7 (Regime caseína) e 3,6 (Regime soja).

2.2.2. Regimes à base de caseína e de ervilha

Neste ensaio, para além do regime padrão à base de caseína ácida (C) igual ao descrito em 2.2.1., foi também formulado um regime contendo ervilha (E). Cerca de 60% da proteína fornecida pela caseína no regime C foi substituída por proteína de grãos de ervilha (cv. Solara) no regime E (Quadro V). O colesterol, dissolvido em óleo de soja, foi incluído nos regimes na proporção de 2,8 g·kg⁻¹. A apresentação física dos regimes foi idêntica à utilizada em 2.2.1..

Quadro V. Ingredientes e composição química dos regimes experimentais (Ensaio Ervilha)

Ingredientes	Regime Caseína	Regime Ervilha
	g·kg ⁻¹	
Amido de milho	464,0	179,9
Sacarose	100,0	100,0
Palha de trigo	100,0	100,0
Óleo de soja	100,0	100,0
Caseína ácida	180,0	72,0
Ervilha cv. Solara	—	393,6
DL-Metionina	1,0	2,0
L-Triptofano	—	0,5
Carbonato de cálcio	16,2	21,5
Fosfato dicálcico	30,8	22,5
Cloreto de sódio	5,0	5,0
Mistura vitamínica e mineral ⁽¹⁾	3,0	3,0
Colesterol	2,8	2,8
Composição química	g·kg⁻¹ MS	
Matéria seca (g·kg ⁻¹)	911,0	916,9
Cinzas	76,1	108,6
Proteína bruta (N x 6,25)	162,7 ⁽²⁾	160,7 ⁽³⁾
Lípidos totais ⁽⁴⁾	97,6	107,9
Energia bruta (MJ·kg ⁻¹ MS)	17,3	16,9
Fibra insolúvel em detergente neutro (NDF)	83,6	113,3
Fibra insolúvel em detergente ácido (ADF)	49,8	56,6
Colesterol total	2,8	2,8
Fitosteróis totais	0,3	0,5

Notas: ⁽¹⁾ Composição (mg·kg⁻¹ de regime): retinol, 30; colecalciferol, 5,4; DL- α -tocoferol, 22,5; tiamina, 0,75; riboflavina, 4,5; cianocobalamina, 0,023; D-biotina, 0,15; menadiona, 1,5; ácido fólico, 0,75; ácido nicotínico, 30; ácido pantoténico, 15; I, 1,13; Mn, 60; Zn, 150; Se, 0,18; Co, 0,15; Cu, 15; Fe, 135; antioxidante (BHT), 0,375;

⁽²⁾ Aminoácidos (g·kg⁻¹): Arg, 6,2; Cys-Cys, 0,9; Phe, 8,6; Gly+Ser, 12,9; His, 4,9; Ile, 8,2; Leu, 15,4; Lys, 12,5; Met, 5,2; Thr, 6,9; Val, 10,7;

⁽³⁾ Aminoácidos (g·kg⁻¹): Arg, 9,5; Cys-Cys, 1,5; Phe, 8,2; Gly+Ser, 13,7; His, 4,6; Ile, 7,4; Leu, 13,4; Lys, 11,7; Met, 4,9; Thr, 6,5; Val, 9,2;

⁽⁴⁾ Relação ácidos gordos polinsaturados : saturados : 3,7 (Regime caseína) e 3,6 (Regime ervilha).

2.2.3. Regimes à base de caseína e de tremçoço

Neste ensaio foram utilizados o regime C e um regime contendo tremçoço (T). Cerca de 60% da proteína fornecida pela caseína no regime C foi substituída no regime T por proteína de grãos de tremçoço de folhas estreitas (tremçoço) (*Lupinus angustifolius* L.) (Quadro VI), uma espécie com baixo teor em alcalóides (ver Anexo II). O colesterol foi incluído na proporção de 2,8 g·kg⁻¹, segundo os procedimentos referidos em 2.2.1. e 2.2.2.. Os regimes alimentares foram consumidos sob a forma farinada.

Quadro VI. Ingredientes e composição química dos regimes experimentais (Ensaio Tremçoço)

	Regime Caseína	Regime Tremçoço
Ingredientes		g·kg⁻¹
Amido de milho	464,0	342,3
Sacarose	100,0	100,0
Palha de trigo	100,0	100,0
Óleo de soja	100,0	85,0
Caseína ácida	180,0	72,0
Tremçoço de folhas estreitas	—	244,0
L-Lisina	—	1,5
DL-Metionina	1,0	2,0
L-Triptofano	—	0,5
Carbonato de cálcio	16,2	18,4
Fosfato dicálcico	30,8	26,3
Cloreto de sódio	5,0	5,0
Mistura vitamínica e mineral ⁽¹⁾	3,0	3,0
Colesterol	2,8	2,8
Composição química		g·kg⁻¹ MS
Matéria seca (g·kg ⁻¹)	911,9	928,6
Cinzas	74,9	79,0
Proteína bruta (N x 6,25)	163,7 ⁽²⁾	155,1 ⁽³⁾
Lípidos totais ⁽⁴⁾	96,5	93,4
Energia bruta (MJ·kg ⁻¹ MS)	17,8	17,6
Fibra insolúvel em detergente neutro (NDF)	82,2	115,0
Fibra insolúvel em detergente ácido (ADF)	47,5	68,0
Colesterol total	2,8	2,7
Fitosteróis totais	0,3	0,9

Notas: ⁽¹⁾ Composição (mg·kg⁻¹ de regime): retinol, 30; colecalciferol, 5,4; DL- α -tocoferol, 22,5; tiamina, 0,75; riboflavina, 4,5; cianocobalamina, 0,023; D-biotina, 0,15; menadiona, 1,5; ácido fólico, 0,75; ácido nicotínico, 30; ácido pantoténico, 15; I, 1,13; Mn, 60; Zn, 150; Se, 0,18; Co, 0,15; Cu, 15; Fe, 135; antioxidante (BHT), 0,375;

⁽²⁾ Aminoácidos (g·kg⁻¹): Arg, 6,5; Cys-Cys, 1,0; Phe, 9,0; Gly+Ser, 13,3; His, 5,1; Ile, 8,6; Leu, 16,0; Lys, 13,1; Met, 5,5; Thr, 7,2; Val, 11,2;

⁽³⁾ Aminoácidos (g·kg⁻¹): Arg, 9,7; Cys-Cys, 1,3; Phe, 7,4; Gly+Ser, 13,1; His, 4,5; Ile, 7,0; Leu, 12,9; Lys, 11,2; Met, 5,2; Thr, 6,1; Val, 8,5;

⁽⁴⁾ Relação ácidos gordos polinsaturados : saturados: 3,7 (Regime caseína) e 3,5 (Regime tremçoço).

2.3. Químicos e isótopos

O colesterol incorporado nos regimes experimentais, com um grau de pureza de 95%, foi adquirido à firma H. Erhard Wagner GmbH (Bremen, Alemanha). Foram utilizados produtos químicos do mais alto grau de pureza da Merck (Merck, Darmstadt, Alemanha), Prolabo (Rhône-Poulenc Ltd., Paris, França) e Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os testes para determinação da ureia, glucose, creatinina, bilirrubina total, colesterol livre e total, colesterol das LDL e das HDL, triacilgliceróis e fosfolípidos foram adquiridos à Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemanha), à Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemanha) e à Wako Chemicals GmbH (Neuss, Alemanha). A hidroxipropil- β -ciclodextrina foi uma gentil oferta da Roquette Frères (Lestrem, França). A resina de troca aniônica AG1-X8 foi adquirida à Bio-Rad (Ivry-Seine, França) e a L-3-[glutaril-3- 14 C]hidroximetilglutaril coenzima A, a [5- 3 H]mevalonolactona, o [4- 14 C]colesterol, o 25-[26,27- 3 H₂]hidroxicolesterol e o sal sódico de [14 C]taurocolato à DuPont-NEN Products (Les Ulis, França). A Roussel-Uclaf (Romainville, França) forneceu graciosamente o 25-hidroxicolesterol. O 7 α - e 7 β -hidroxicolesterol foram sintetizados de acordo com o método descrito por Yamashita *et al.* (1989). O Emulsifier-Safe foi adquirido à Packard Instruments Company (Meriden, CA, EUA). Anticorpos policlonais produzidos contra receptores de LDL do córtex supra-renal de bovinos foram gentilmente cedidos por Paul Roach (Adelaide, Austrália). Anti-IgG de coelho F(Ab')₂ conjugados com peroxidase (HRP) obtidos a partir de burro ("anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-linked F(ab')₂ fragment (from donkey)") e o reagente de quimiluminescência foram adquiridos à Amersham Pharmacia Biotech (Les Ulis, França).

2.4. Procedimentos experimentais

Após o período de cria onde consumiram uma ração comercial (Ração S801, Rações Veríssimo, Leiria, Portugal), os suínos foram divididos em dois grupos experimentais de 12 animais com PV médios semelhantes e instalados em caixas metabólicas individuais. Durante o período experimental de cinco semanas que se seguiu, os animais foram alimentados duas vezes ao dia (8.30 e 18.00 h) a uma taxa diária de 50 g·kg⁻¹ PV. A água foi fornecida *ad libitum*, através de tetinas de baixa pressão.

A pesagem dos animais foi realizada semanalmente, antes da refeição matinal, tendo o nível de ingestão individual dos suínos para a semana seguinte sido ajustado com base nos valores de PV obtidos. Durante a última semana dos trabalhos experimentais, os refugos alimentares individuais foram recolhidos e pesados.

Os suínos foram submetidos a um período inicial de duas semanas consumindo o regime C, rico em colesterol, com vista à indução da hipercolesterolemia.

No fim da segunda semana, 6 animais de cada grupo experimental foram sujeitos a uma anastomose íleo-rectal (IRA). As operações foram realizadas nas instalações de cirurgia de pequenos animais do Instituto de Tecnologia Biomédica (Vale de Santarém, Portugal) (Ensaio Soja) e do Hospital Veterinário da Universidade de Évora (Ensaios Ervilha e Tremoço). Este procedimento cirúrgico consistiu no corte transversal do íleo cerca de 40 mm antes da válvula íleo-cecal e na junção deste à face ventral da porção inicial do recto (IRA pré-valvular) conforme descrito por Green (1988) e sem a remoção do segmento ceco-cólon. O processo cirúrgico foi seguido de um programa profilático de 4 dias, baseado em anti-inflamatórios (Devan, Hoechst Veterinär GmbH, Munique, Alemanha, 5 mL por animal e por dia, durante os primeiros três dias do programa), antibióticos (Omnaflopen ou Gorban, Hoechst Veterinär GmbH, 5 mL por animal no primeiro e terceiro dias do programa) e complexos vitamínicos (Duphafra Multi, Solvay Duphar B.V., Weesp, Holanda, 4 mL por animal ao segundo e quarto dias). Após a cirurgia, os animais retornaram às suas caixas metabólicas e foram privados de alimento até à primeira refeição do dia seguinte. O consumo alimentar foi então retomado (cerca de 30% do consumo normal) e gradualmente aumentado até ao terceiro dia pós-operatório, altura em que se atingiu o valor pré-definido ($50 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ PV}$). Os animais operados passaram a ser suplementados diariamente com cloreto de sódio e bicarbonato de sódio (20 g de cada), tendo em conta que a ausência funcional do ceco e do cólon origina uma menor absorção mineral (Fuller, 1991; Hennig *et al.*, 1997).

No início da terceira semana, quatro grupos experimentais ficaram definidos: 6 animais intactos e seis animais sujeitos à IRA, que iniciaram o consumo do regime à base da leguminosa em estudo, permanecendo os restantes 6 animais intactos e 6 animais operados a consumir o regime C.

Na última semana dos trabalhos experimentais os suínos foram submetidos a um período de colheitas de 5 dias. A totalidade das fezes e dos conteúdos ileais foi individualmente recolhida duas vezes (08.30 e 18.00 h) e oito vezes ao dia (com intervalos de 3 h) respectivamente. A urina foi recolhida uma vez por dia (18.00 h), em contentores plásticos com ácido sulfúrico para evitar perdas de azoto, tendo sido posteriormente homogeneizada e filtrada. Amostras dos regimes consumidos e amostras individuais dos refugos alimentares e das fezes, conteúdo ileal e urina representativas do período de colheitas, foram armazenadas a -20°C para posterior análise laboratorial.

No fim da 5ª semana e após um período médio de jejum de 10 a 12 h, os suínos foram abatidos por electronecrose e sangria. Imediatamente antes da exanguinação, amostras de sangue foram retiradas por punção cardíaca para tubos de vidro Venoject

(Terumo Europe N.V., Leuven, Bélgica) com heparina de lítio, heparina de sódio (10 mL) e EDTA (7 mL). O plasma foi separado por centrifugação durante 20 min a 4° C e 1 500 X g (Beckman J-6B, Bucks, Reino Unido) e quando não imediatamente utilizado, congelado a -80° C (Heto UF460, Brøndby, Dinamarca) até análise. Amostras de sangue fresco foram utilizadas para a realização dos micro-hematócitos numa centrifuga de bancada Centronic (J.P. Selecta, S.A., Barcelona, Espanha).

Após o abate, procedeu-se à abertura e evisceração da cavidade abdominal dos animais. O estômago e o intestino delgado foram esvaziados do seu conteúdo. Todos os órgãos foram libertos do tecido adiposo periférico, lavados em soro fisiológico e pesados. Amostras de fígado foram recolhidas para a obtenção de fracções celulares em fresco (1 g) e para armazenamento sob vácuo a -80° C (± 20 g), até análise. Um procedimento similar foi utilizado no armazenamento da vesícula biliar e seu conteúdo.

2.5. Análises laboratoriais

As análises laboratoriais descritas foram realizadas com a colaboração do Laboratório de Metabolismo Animal, do Laboratório de Nutrição e do Laboratório de Sanidade Vegetal, ICAM/Universidade de Évora (Évora, Portugal), do Centro de Biologia Ambiental do Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa (Lisboa, Portugal), da Secção de Produção Animal, Instituto Superior de Agronomia (Lisboa, Portugal), do Departamento de Nutrição e Alimentação Animal, Estação Zootécnica Nacional (Santarém, Portugal) e do Laboratoire de Physiologie de la Nutrition, Université Paris-Sud (Orsay, França). Todas as determinações foram efectuadas em duplicado, com excepção dos lípidos totais, realizados em triplicado.

2.5.1. Análise dos regimes e refugos alimentares, fezes e conteúdos ileais

As amostras dos ingredientes, regimes e refugos alimentares foram secas em estufa (60° C durante 24 h) (ULM 800, Memmert, Schwabach, Alemanha) e moídas em moinho de laboratório equipado com um crivo de 1 mm (Cyclotec 1093 Sample Mill, Tecator, Hoganas, Suécia) antes de serem homogeneizadas e analisadas. As amostras de fezes e conteúdos ileais foram liofilizadas (Modulyo Freeze Dryer, Edwards, Crawley, Reino Unido), moídas através de um crivo de 1 mm e homogeneizadas para análise.

Os factores anti-tripsínicos foram analisados nas três leguminosas em estudo pelo método proposto pela AOCS (AOCS, 1983) e os alcalóides totais foram analisados no tremçoço, de acordo com a Directiva Comunitária 71/250/EEC (EEC, 1971). Quanto à

sacarose e aos α -galactósidos, a sua análise foi realizada em todas as leguminosas por HPLC, segundo o método descrito por Quemener (1988) (ver Anexo II).

As amostras dos regimes, refugos, fezes e conteúdos ileais foram analisadas para a matéria seca (MS) (estufa a 105° C durante 24 h) (UM 500, Memmert, Schwabach, Alemanha) e cinzas (mufla a 550° C durante 3 h) (Muffle Furnace MR-170, Heraeus, Hanau, Alemanha). A proteína bruta (PB) (N x 6,25) foi determinada por combustão (FP 528 Protein/nitrogen analyzer, Leco, St. Joseph, CA, EUA), segundo o método de Dumas (AOAC, 2000). Os lípidos totais foram determinados por extracção com éter de petróleo (Soxtherm Automatic S206 MK, Gerhardt, Bonn, Alemanha) e a energia bruta numa bomba calorimétrica (Peribol bomb calorimeter 1261, Parr, Moline, IL, EUA). As fibras insolúveis em detergente neutro (NDF) e ácido (ADF) foram determinadas segundo Van Soest *et al.* (1991).

Os aminoácidos dos regimes foram determinados de acordo com a Directiva Comunitária 98/64/EC (EC, 1998) nos laboratórios da Degussa AG (Hanau, Alemanha). A composição em ácidos gordos foi determinada por GLC, após extracção (Folch *et al.*, 1957) e metilação (Bannon *et al.*, 1985), num cromatógrafo HP 6890 equipado com um injector automático Série 7683 (Hewlett Packard, Little Falls, DE, EUA), um detector de ionização por chama e uma coluna capilar de sílica fundida SP-2380 (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) com 60 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. A fase estacionária, composta por um polímero estabilizado (90% biscianopropilo e 10% cianopropilfenilo poli-siloxano), apresentava uma espessura de filme de 0,2 μ m. O hélio foi o gás de arraste utilizado, a um fluxo de 0,4 mL·min⁻¹. A temperatura inicial do forno foi de 180° C durante 5 min, seguida de uma rampa de subida de 2° C·min⁻¹ até se atingirem os 220° C, onde permaneceu mais 5 min. As temperaturas de funcionamento do injector e do detector foram de 220 e 240° C, respectivamente. A razão de "split" foi de 1:75, tendo a pressão à cabeça da coluna sido de 8 psi e o volume de amostra injectado de 1 μ L. Os ácidos gordos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos seus ésteres metílicos com os de uma mistura padrão de composição conhecida (Fatty acid methyl esters mix 47801, Supelco) e o seu teor foi expresso em percentagem do total dos ésteres metílicos identificados, recorrendo ao programa de aquisição e tratamento automático de dados HP GC Chemstation.

O conteúdo em colesterol total e fitosteróis dos regimes foi determinado por GLC em extractos lipídicos saponificados (Férézou *et al.*, 1993), seguindo o método e condições abaixo descritas para a análise e quantificação dos esteróis fecais e ileais.

Para a determinação dos esteróis fecais e ileais, amostras (2 g) homogeneizadas em água destilada (20 mL) foram submetidas durante 48 h a uma extracção etanólica em aparelhos de Soxhlet. A cada extracto lipídico foi adicionada uma quantidade conhecida

de sal sódico de [^{14}C]taurocolato (20 μL), seguindo-se a sua saponificação por ebulição em hidróxido de potássio etanólico (2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) durante 2 h. A extracção dos esteróis neutros foi realizada com éter de petróleo. Quanto aos sais biliares, presentes na fase aquosa, foram desconjugados pelo método de Grundy *et al.* (1965) e extraídos com éter dietílico. Posteriormente, a radioactividade presente foi medida por cintilação líquida (Tri-Carb Analyser, Packard, Rungis, França), com vista a dosear perdas devidas ao processamento. A preparação dos esteróis neutros e dos ácidos biliares livres para análise foi feita de acordo com o método proposto por Férézou *et al.* (1997). A identificação e quantificação destes compostos foi feita por GLC, na presença de colestano como padrão externo e de acordo com as condições descritas por Riottot *et al.* (1993), utilizando um cromatógrafo Carlo-Erba HRGC 5160 (Thermoquest, Les Ulis, França) equipado com uma coluna capilar de sílica WCOT, com 25 m de comprimento e 0,2 mm de espessura de filme, e uma coluna OV101 (Spiral, Dijon, França) para os esteróis neutros ou OV1701 (Spiral, Dijon, França) para os ácidos biliares. A excreção (fecal e ileal) diária de esteróis neutros e ácidos biliares foi calculada após correcção para o fluxo fecal e ileal, feita com base numa recuperação fecal teórica de 90% do β -sitosterol alimentar, um marcador de confiança em suínos (Marsh *et al.*, 1972).

2.5.2. Análises plasmáticas

Os níveis plasmáticos de ureia, glucose, creatinina, bilirrubina total, triacilgliceróis e fosfolípidos foram determinados com recurso a testes de análise comercialmente disponíveis (Boehringer Mannheim e Roche Diagnostics) em analisadores automáticos (Hitachi 704 e Hitachi 917 Automatic Analyser, Tóquio, Japão). Os valores da proteína total foram obtidos segundo a técnica de Lowry *et al.* (1951) em espectrofotómetros UV/Vis (Beckman DU-50 e DU-530, Fullerton, EUA) e utilizando albumina de soro de bovino como padrão.

O colesterol livre foi determinado num espectrofotómetro UV/Vis (Beckman DU-530) e o colesterol total num analisador automático (Hitachi 917 Automatic Analyser), ambos por testes enzimáticos (Wako Chemicals e Roche Diagnostics). As concentrações em colesterol das LDL e das HDL foram também determinadas por testes enzimáticos (Roche Diagnostics) num analisador automático (Hitachi 917 Automatic Analyser). O colesterol das LDL foi determinado de acordo com o método descrito por Nakamura *et al.* (1997) e o das HDL segundo o método descrito por Sugiuchi *et al.* (1995).

2.5.3. Análises hepáticas

2.5.3.1. Lípidos hepáticos

Os lípidos totais foram extraídos a partir de amostras congeladas (0,5 g), segundo o método descrito por Férézou *et al.* (1997). O colesterol livre e o colesterol total foram determinados enzimaticamente nos extractos obtidos em 2-propanol, recorrendo-se a testes comerciais (Wako Chemicals e Roche Diagnostics) e a um espectrofotómetro UV/Vis (Beckman DU-530). O colesterol esterificado foi calculado a partir da diferença entre as concentrações de colesterol total e livre. Os triacilgliceróis e os fosfolípidos foram determinados com base em testes comerciais (Roche Diagnostics) num analisador automático (Hitachi 917 Automatic Analyser).

2.5.3.2. Fracções celulares hepáticas

As fracções microssomais e mitocondriais foram preparadas a partir de amostras de fígado fresco (1 g), segundo o método descrito por Souidi *et al.* (1999), tendo a fracção microssomal sido suspensa num tampão modificado (di-hidrogenofosfato de potássio, 50 mmol·L⁻¹; sacarose, 300 mmol·L⁻¹; cloreto de sódio, 50 mmol·L⁻¹; EDTA, 10 mmol·L⁻¹; DL-ditiotreitol, 10 mmol·L⁻¹; pH 7,4) para a obtenção das fracções celulares a empregar na determinação da actividade enzimática da HMG CoA reductase. As fracções celulares obtidas foram conservadas a -80° C até análise.

O conteúdo proteico das fracções celulares foi determinado de acordo com Lowry *et al.* (1951) num espectrofotómetro UV/Vis (Uvicon 930, Kontron Instruments S.A., Watford, Herts, Reino Unido), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

2.5.3.3. Determinações enzimáticas

A actividade enzimática da HMG CoA reductase microssomal foi determinada utilizando a técnica radioisotópica de Philipp e Shapiro (1979) com ligeiras alterações. Assim, cada tubo analisado foi pré-incubado durante 60 min a 37° C na presença de fosfatase (0,5 UI) e incubado durante 30 min a 37° C após a adição de [¹⁴C]HMG CoA (20 nmol, 100 000 dpm) e NADPH (4,2 mmol·L⁻¹). A reacção foi parada com a adição de ácido clorídrico (5 mol·L⁻¹), responsável pela conversão do produto da reacção em [¹⁴C]mevalonolactona. Após a adição de um padrão interno ([³H]mevalonolactona, 10 000 dpm) para determinar os rendimentos de coluna, cada amostra foi passada por uma mini-coluna contendo resina aniónica AG1-X8 e a radioactividade do eluído medida (Tri-Carb Analyser). Cada série de análises foi acompanhada por quatro tubos contendo microssomas termicamente inactivados, utilizados como controlos.

As determinações das actividades enzimáticas da CYP7A1 microsomal e da CYP27A1 mitocondrial foram realizadas segundo técnicas radioisotópicas previamente descritas por Souidi *et al.* (1998) e Souidi *et al.* (1999), respectivamente.

As actividades enzimáticas específicas, calculadas em pmol·(min·mg de proteína microsomal ou mitocondrial)⁻¹, foram também expressas em pmol·(min·fígado)⁻¹ (actividades enzimáticas totais), levando em conta as variações no peso deste órgão devidas ao efeito regime.

2.5.3.4. Imunodeteccção dos receptores de LDL

As membranas celulares de amostras de tecido hepático foram obtidas de acordo com a técnica de Kovanen *et al.* (1979) a partir de amostras de fígado (1 g) conservado a -80° C. As proteínas das membranas foram solubilizadas num tampão contendo 2% de Triton X-100, de acordo com o método proposto por Schneider *et al.* (1982) e quantificadas (Lowry *et al.*, 1951) num espectrofotómetro UV/Vis (Uvicon 930), usando albumina de soro de bovino como padrão.

Para a imunodeteccção dos receptores de LDL, as proteínas membranares hepáticas foram diluídas num tampão de diluição (Tris-maleato, 125 mmol·L⁻¹; cloreto de cálcio, 2 mmol·L⁻¹; aprotinina, 200 UI·mL⁻¹; pH 6). As amostras diluídas (1 µg de proteína por cada 50 µL de tampão de diluição) foram colocadas em membranas de nitrocelulose utilizando um aparelho de Dot-blot (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA). Estas membranas foram incubadas durante a noite a 4° C, num tampão Quenching (Tris-HCl, 60 mmol·L⁻¹; cloreto de sódio, 25 mmol·L⁻¹; cloreto de cálcio, 2 mmol·L⁻¹; pH 8) contendo 5% de leite magro. Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes com um tampão salino Tween Tris (TTBS) (cloreto de sódio, 500 mmol·L⁻¹; Tris-base, 250 mmol·L⁻¹; Tween 20, 0,05%; pH 7,5) e incubadas durante 90 min na presença de anticorpos policlonais produzidos contra os receptores de LDL, diluídos a 1:2 000 num tampão de incubação (Tris-HCl, 60 mmol·L⁻¹; cloreto de sódio, 25 mmol·L⁻¹; cloreto de cálcio, 2 mmol·L⁻¹; pH 8) contendo 0,1% de leite magro. As membranas foram novamente lavadas três vezes com TTBS, incubadas durante 90 min com um anti-IgG de coelho F(ab')₂ conjugado com peroxidase (HRP) diluído a 1:5 000, e após um ciclo final de três lavagens com TTBS, incubadas durante 1 min com um reagente quimiluminescente. Filmes sensíveis (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech) foram expostos e após a sua revelação, lidos num densitómetro laser Ultrosan 2222 (LKB, Bromma, Suécia). O conteúdo relativo em receptores das LDL em cada mancha/poço foi estimado pela altura do pico de leitura e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias·mg de proteína⁻¹ e em unidades arbitrárias·fígado⁻¹. A linearidade de resposta como função da quantidade de proteína

deposta foi verificada. Os anticorpos específicos contra os receptores de LDL deram uma banda única em Western blots, com um peso molecular aparente de cerca de 130 kDa.

2.5.4. Análises biliares

2.5.4.1. Lípidos biliares

Os lípidos totais foram extraídos com 2-propanol, de acordo com o descrito por Férézou *et al.* (1997). O colesterol livre, colesterol total e os fosfolípidos da biliar foram determinados nos extractos em 2-propanol, utilizando testes enzimáticos (Roche Diagnostics) e um espectrofotómetro UV/Vis (Beckman DU-530).

2.5.4.2. Ácidos biliares

Após descongeladas, as amostras de biliar foram diluídas (1:1) em 2-propanol. A concentração total em ácidos biliares foi então determinada pelo método enzimático da desidrogenase 3 α -hidroxisteróide (Turley e Dietschy, 1978), com recurso a um espectrofotómetro UV/Vis (Uvicon 930). Por fim, os índices litogénicos foram calculados segundo os métodos de Thomas e Hofmann (1973) e de Carey (1978).

As concentrações em ácidos biliares individuais foram determinadas por GLC nas amostras diluídas em 2-propanol, de acordo com o descrito por Riottot *et al.* (1993).

2.6. Cálculos e análise estatística

Os resultados apresentados nesta tese, são-no sob a forma de média \pm EPM. As unidades utilizadas são as propostas pelo Sistema Internacional.

A análise estatística foi realizada através de uma análise de variância (ANOVA) dupla, para os efeitos regime, IRA e a interacção entre regime e IRA. Foi utilizado um modelo linear (GLM) do pacote estatístico Statview 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). O teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer foi utilizado como teste *post-hoc* para comparar o efeito IRA entre os regimes experimentais. A significância das diferenças entre médias foi testada pelo teste da diferença mínima significativa (LSD) e estabelecida para probabilidades iguais ou inferiores a 5% (*), 1% (**) e 0,1% (***).

IV. RESULTADOS

1. EFEITOS DO CONSUMO DO REGIME SOJA NOS DIFERENTES PARÂMETROS ANALISADOS EM SUÍNOS INTACTOS E COM ANASTOMOSE ÍLEO-RECTAL

1.1. Parâmetros zootécnicos e peso dos órgãos

Durante o período de adaptação aos regimes alimentares, notaram-se alguns problemas de aceitação do regime C e, posteriormente, do regime SE. O ganho médio diário (GMD) foi menor ($P \leq 0,05$) nos suínos consumindo o regime SE que nos consumindo o regime C (Quadro VII). No entanto, a ingestão voluntária de alimento apresentou uma tendência para ser superior ($P = 0,060$) nos grupos consumindo o regime SE. Tal ingestão voluntária e um maior conteúdo em NDF do regime SE (ver Quadro IV), originaram uma ingestão diária de NDF superior ($P \leq 0,001$) nos suínos consumindo o regime à base da leguminosa. O processo cirúrgico não afectou qualquer dos parâmetros fisiológicos medidos (Quadro VII).

O peso fresco do fígado foi menor ($P \leq 0,05$) nos suínos consumindo o regime SE que nos consumindo o regime C, mas o da vesícula biliar e seu conteúdo não foi afectado pelos tratamentos experimentais (Quadro VII).

1.2. Parâmetros plasmáticos

Os valores de micro-hematócrito não foram afectados pelos regimes alimentares nem pela cirurgia. Os parâmetros plasmáticos não lipídicos também não o foram, com excepção da urémia, mais elevada ($P \leq 0,05$) nos animais consumindo o regime SE que nos consumindo o regime C, mas menor ($P \leq 0,01$) nos suínos com IRA que nos intactos (Quadro VIII).

O perfil lipídico plasmático, incluindo o colesterol total e o colesterol das LDL e das HDL, não foi significativamente afectado pelos regimes alimentares nem pelo processo cirúrgico. No entanto, o colesterol das LDL tendeu a ser inferior ($P = 0,068$) nos animais com IRA, quando comparado com o detectado nos intactos (Quadro VIII). Todos os outros parâmetros não foram afectados pelos tratamentos.

Quadro VII. Efeitos do regime Soja em alguns parâmetros zootécnicos e no peso dos órgãos de suínos intactos e com anastomose ileo-rectal

	Regime Caseína			Regime Soja			Análise de variância		
	I	IRA	IRA	I	IRA	IRA	R	A	R*A
Peso final	37,1 ± 4,3	37,0 ± 3,1	37,0 ± 3,1	34,2 ± 2,0	39,7 ± 2,3	39,7 ± 2,3	NS	NS	NS
Ganho médio diário ⁽¹⁾	330,3 ± 42,9	326,8 ± 50,1	326,8 ± 50,1	181,5 ± 37,7	165,6 ± 96,6	165,6 ± 96,6	*	NS	NS
Ingestão voluntária ⁽¹⁾	37,7 ± 2,1	38,8 ± 2,5	38,8 ± 2,5	42,1 ± 1,5	42,4 ± 1,5	42,4 ± 1,5	0,060	NS	NS
Ingestão de NDF ⁽¹⁾	3,12 ± 0,29	3,15 ± 0,27	3,15 ± 0,27	4,56 ± 0,28	4,74 ± 0,27	4,74 ± 0,27	***	NS	NS
Ingestão de colesterol ⁽¹⁾	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	NS	NS	NS
Retenção de azoto ⁽¹⁾⁽²⁾	0,62 ± 0,05	0,64 ± 0,04	0,64 ± 0,04	0,63 ± 0,02	0,62 ± 0,06	0,62 ± 0,06	NS	NS	NS
Energia metabolizável ⁽¹⁾⁽²⁾	0,65 ± 0,04	0,64 ± 0,04	0,64 ± 0,04	0,66 ± 0,02	0,64 ± 0,01	0,64 ± 0,01	NS	NS	NS
Fígado	21,7 ± 0,9	22,4 ± 1,0	22,4 ± 1,0	19,5 ± 1,3	19,7 ± 1,2	19,7 ± 1,2	*	NS	NS
Vesícula biliar	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	NS	NS	NS

Notas: I – Animais intactos; IRA – Animais com anastomose ileo-rectal; Efeitos: R – Regime, A – Anastomose, R*A – Interação regime*anastomose; Significância: *** – P≤0,001, * – P≤0,05, NS – Não significativo (P>0,05);

⁽¹⁾ Valores referentes ao período de colheitas; ⁽²⁾ Calculada como a diferença entre a ingestão e a excreção (fezes e urina) por dia e kg PV.

Quadro VIII. Efeito do regime Soja em alguns parâmetros plasmáticos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal

	Regime Caseína		Regime Soja		Análise de variância		
	I	IRA	I	IRA	R	A	R*A
Micro-hematócrito	0,39 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,39 ± 0,01	NS	NS	NS
Proteína total	69,67 ± 2,27	62,83 ± 4,64	63,83 ± 2,26	64,40 ± 3,64	NS	NS	NS
Ureia	4,39 ± 0,40	2,52 ± 0,27	5,12 ± 0,58	4,15 ± 0,51	*	**	NS
Glucose	7,34 ± 0,74	5,99 ± 0,26	7,44 ± 0,71	8,18 ± 0,77	NS	NS	NS
Colesterol livre	0,72 ± 0,04	0,61 ± 0,05	0,79 ± 0,08	0,74 ± 0,06	NS	NS	NS
Colesterol total	4,24 ± 0,19	3,28 ± 0,24	4,15 ± 0,46	4,11 ± 0,53	NS	NS	NS
Colesterol das LDL	2,68 ± 0,23	1,96 ± 0,27	2,21 ± 0,15	2,10 ± 0,18	NS	0,068	NS
Colesterol das HDL	1,34 ± 0,07	1,25 ± 0,10	1,56 ± 0,25	1,63 ± 0,26	NS	NS	NS
LDL : HDL ⁽¹⁾	2,03 ± 0,20	1,68 ± 0,38	1,55 ± 0,19	1,36 ± 0,14	NS	NS	NS
Triacilgliceróis	0,61 ± 0,09	0,66 ± 0,03	0,52 ± 0,10	0,64 ± 0,07	NS	NS	NS
Fosfolípidos	1,94 ± 0,13	1,81 ± 0,14	2,12 ± 0,28	1,87 ± 0,13	NS	NS	NS
Creatinina	98,30 ± 6,06	80,15 ± 6,25	101,36 ± 7,42	95,83 ± 9,40	NS	NS	NS
Bilirrubina total	2,07 ± 0,21	2,06 ± 0,28	2,03 ± 0,25	1,55 ± 0,31	NS	NS	NS

Notas: I – Animais intactos; IRA – Animais com anastomose íleo-rectal; Efeitos: R – Regime, A – Anastomose, R*A – Interação regime*anastomose;

Significância: ** – P≤0,01, * – P≤0,05, NS – Não significativo (P>0,05);

⁽¹⁾ Relação entre o colesterol das LDL e o colesterol das HDL.

1.3. Parâmetros hepáticos

O regime SE originou valores hepáticos inferiores aos do regime C em colesterol livre ($P \leq 0,05$), esterificado e total ($P \leq 0,001$), bem como em triacilgliceróis ($P \leq 0,05$) e fosfolípidos ($P = 0,052$) (Quadro IX). Os regimes alimentares e a cirurgia não modificaram as actividades enzimáticas (específicas e totais) da HMG CoA reductase, da CYP7A1 e da CYP27A1 (Quadro IX) mas os animais sujeitos à IRA tenderam ($P = 0,054$) a apresentar uma quantidade de receptores hepáticos de LDL por g de proteína superior à dos animais intactos, tendência essa que se perdeu quando o parâmetro foi reportado ao peso total do órgão (Quadro IX).

1.4. Parâmetros biliares

Quando comparado com o do regime C, o consumo do regime SE deprimiu ($P \leq 0,05$) a concentração em colesterol livre e colesterol total da bÍlis vesicular, mas aumentou ($P \leq 0,05$) a de ácidos biliares totais (Quadro X). A concentração em fosfolípidos não foi afectada pelos tratamentos, mas ambos os índices litogénicos apresentaram valores inferiores ($P \leq 0,001$) nos animais consumindo o regime SE.

A composição em ácidos biliares da bÍlis vesicular foi marcadamente afectada pelos regimes alimentares e pela cirurgia (Quadro XI). Com a via do ácido cólico (ácidos cólico e desoxicólico) a mostrar-se ineficaz, a principal via de síntese de ácidos biliares foi a do ácido quenodesoxicólico, a qual representou mais de 98% do total dos ácidos biliares. O ácido hiocólico, o derivado trihidroxilado do ácido quenodesoxicólico, foi o ácido biliar predominante e aumentou significativamente ($P \leq 0,01$) nos animais consumindo o regime SE. A proporção em ácidos biliares hidrófobos (quenodesoxicólico, desoxicólico, litocólico, 3 α -hidroxi-6-oxo-5 β -colanólico, 7-oxo-litocólico e outras cetonas) da bÍlis vesicular foi de 31, 30, 15 e 18%, respectivamente para os animais intactos e com IRA consumindo o regime C e para os animais intactos e com IRA consumindo o regime SE. Assim, o consumo do regime SE contribuiu para a redução ($P \leq 0,01$) da concentração desses ácidos na bÍlis vesicular dos suínos. Por fim, a anastomose levou a uma importante redução na transformação microbiana dos ácidos biliares (fundamentalmente do ácido hiodesoxicólico), tendo este efeito sido reforçado pelo regime SE. Assim sendo, a relação entre ácidos biliares primários e secundários aumentou nos animais consumindo o regime SE quando comparados com os consumindo o regime C ($P \leq 0,01$) e nos animais com IRA quando comparados com os intactos ($P \leq 0,001$).

Quadro IX. Efeitos do regime Soja nos parâmetros hepáticos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal

	Regime Caseína		Regime Soja		Análise de variância		
	I	IRA	I	IRA	R	A	R*A
			mg.g ⁻¹				
Colesterol livre	4,01 ± 0,26	4,18 ± 0,18	3,55 ± 0,16	3,56 ± 0,14	*	NS	NS
Colesterol esterificado	1,19 ± 0,09	1,12 ± 0,08	0,51 ± 0,06	0,60 ± 0,11	***	NS	NS
Colesterol total	5,20 ± 0,32	5,30 ± 0,19	4,06 ± 0,18	4,16 ± 0,16	***	NS	NS
Triacilgliceróis	10,35 ± 1,58	10,75 ± 1,78	7,72 ± 0,22	7,52 ± 0,65	*	NS	NS
Fosfolípidos	21,72 ± 0,57	20,48 ± 0,06	19,97 ± 0,58	20,31 ± 0,42	0,052	NS	NS
			pmol·(min·mg proteína) ⁻¹ pmol·(min·órgão) ⁻¹				
HMG CoA reductase ⁽¹⁾	2,14 ± 0,50	6,52 ± 2,77	6,33 ± 0,24	7,49 ± 1,26	NS	NS	NS
	11 896 ± 1 585	47 090 ± 19 322	35 045 ± 2 837	36 518 ± 3 635	NS	NS	NS
CYP7A1 ⁽²⁾	19,92 ± 2,44	18,93 ± 3,77	14,07 ± 2,23	20,97 ± 3,42	NS	NS	NS
	102 917 ± 14 577	101 226 ± 20 195	69 974 ± 14 677	110 958 ± 21 164	NS	NS	NS
CYP27A1 ⁽³⁾	61,44 ± 11,70	51,82 ± 15,14	55,86 ± 11,59	54,84 ± 11,69	NS	NS	NS
	399 170 ± 48 380	306 444 ± 39 877	332 302 ± 106 860	257 919 ± 40 478	NS	NS	NS
			Unidades arbitrárias·g ⁻¹ proteína Unidades arbitrárias·órgão ⁻¹				
Receptores de LDL	1,83 ± 0,27	2,39 ± 0,45	1,51 ± 0,24	2,77 ± 0,70	NS	0,054	NS
	10 694 ± 2 228	11 025 ± 1 686	8 604 ± 1 751	16 321 ± 4 012	NS	NS	NS

Notas: I – Animais intactos; IRA – Animais com anastomose íleo-rectal; Efeitos: R – Regime, A – Anastomose, R*A – Interação regime*anastomose;

Significância: *** – P≤0,001, * – P≤0,05, NS – Não significativo (P>0,05);

⁽¹⁾ 3-Hidroxi-3-metilglutaryl coenzima A reductase (EC 1.1.1.34); ⁽²⁾ Colesterol 7α-hidroxilase (EC 1.14.13.17); ⁽³⁾ Esterol 27-hidroxilase (EC 1.14.13.15).

Quadro X. Efeitos do regime Soja nos lipídios, ácidos biliares e índices litogênicos da biliar vesicular de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal

	Regime Caseína		Regime Soja		Análise de variância		
	I	IRA	I	IRA	R	A	R*A
	mmol.L ⁻¹						
Colesterol livre	3,94 ± 0,46	4,42 ± 1,15	2,56 ± 0,27	2,28 ± 0,25	*	NS	NS
Colesterol total	4,18 ± 0,53	4,77 ± 1,27	2,76 ± 0,30	2,43 ± 0,31	*	NS	NS
Fosfolípidos	10,98 ± 4,15	9,15 ± 1,58	9,36 ± 1,06	12,17 ± 1,96	NS	NS	NS
Ácidos biliares	178,10 ± 23,88	135,96 ± 3,90	216,31 ± 15,12	191,96 ± 30,88	*	NS	NS
	Índices						
Índice litogénico ⁽¹⁾	0,33 ± 0,04	0,49 ± 0,07	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,03	***	NS	NS
Índice litogénico ⁽²⁾	0,56 ± 0,06	0,82 ± 0,13	0,31 ± 0,03	0,32 ± 0,06	***	NS	NS

Notas: I – Animais intactos; IRA – Animais com anastomose íleo-rectal; Efeitos: R – Regime, A – Anastomose, R*A – Interação regime*anastomose;

Significância: *** – P ≤ 0,001, * – P ≤ 0,05, NS – Não significativo (P > 0,05);

⁽¹⁾ Calculado segundo o processo proposto por Thomas e Hofmann (1973); ⁽²⁾ Calculado de acordo com Carey (1978).

Quadro XI. Efeitos do regime Soja na composição em ácidos biliares da bilis vesicular de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal

	Regime Caseína		Regime Soja		Análise de variância		
	I	IRA	I	IRA	R	A	R*A ⁽¹⁾
mmol·L⁻¹							
Ácidos biliares primários							
Ácido cólico	114,13 ± 27,86	121,96 ± 4,22	185,99 ± 17,70	177,24 ± 29,68	**	NS	NS
Ácido quenodesoxicólico	0,27 ± 0,19	0,29 ± 0,15	0,34 ± 0,18	0,27 ± 0,17	NS	NS	NS
Ácido hiocólico	32,42 ± 7,03	28,88 ± 9,22	16,19 ± 2,04	21,96 ± 3,41	0,083	NS	NS
Ácidos biliares secundários							
Ácido desoxicólico	81,44 ± 30,83	92,79 ± 7,44	169,46 ± 18,34	155,01 ± 30,10	**	NS	NS
Ácido litocólico	63,97 ± 14,52 ^a	14,00 ± 1,49 ^b	30,32 ± 2,76 ^b	14,72 ± 1,86 ^b	*	***	*
Ácido hiodesoxicólico	1,09 ± 0,39	0,91 ± 0,11	0,73 ± 0,08	0,83 ± 0,10	NS	NS	NS
Ácido hiodesoxicólico	8,03 ± 2,91	6,91 ± 1,64	4,25 ± 0,14	5,63 ± 1,03	NS	NS	NS
Ácido 3α-hidroxi-6-oxo-5β-colanólico	41,93 ± 12,22 ^a	1,75 ± 0,38 ^b	14,12 ± 2,83 ^b	3,07 ± 1,19 ^b	*	***	*
Ácido 7-oxo-litocólico	1,59 ± 1,52	0,00 ± 0,00	0,32 ± 0,14	0,00 ± 0,00	NS	NS	NS
Outras cetonas	4,25 ± 1,12	1,29 ± 0,25	4,25 ± 0,47	0,86 ± 0,21	NS	***	NS
	7,08 ± 2,37	3,14 ± 0,39	6,65 ± 1,73	4,33 ± 0,69	NS	*	NS
Relação							
Ácidos biliares primários : secundários ⁽²⁾	2,38 ± 0,89	9,24 ± 1,07	6,70 ± 1,26	12,05 ± 1,39	**	***	NS

Notas: I – Animais intactos; IRA – Animais com anastomose íleo-rectal; Efeitos: R – Regime, A – Anastomose, R*A – Interação regime*anastomose;

Significância: *** – P≤0,001, ** – P≤0,01, * – P≤0,05, NS – Não significativo (P>0,05);

⁽¹⁾ Quando significativa, médias com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (P≤0,05) pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer; ⁽²⁾ Relação entre os ácidos biliares primários e secundários da bilis vesicular.

1.5. Excreção de esteróis neutros e ácidos

O consumo do regime SE levou a um aumento ($P \leq 0,05$) da excreção diária de esteróis neutros (Quadro XII). O grosso dos esteróis excretados foi constituído por colesterol e pelo seu metabolito microbiano 5β -hidrogenado, coprostanol. A hidrogenação microbiana da ligação dupla 5-6 do colesterol foi menor nos suínos consumindo o regime SE que nos consumindo o regime C. Por seu lado, a cirurgia não influenciou a excreção de colesterol, mas reduziu significativamente a sua hidrogenação microbiana, impedindo assim a transformação deste esteroide em coprostanol (Quadro XII). Efeitos semelhantes ($P \leq 0,001$) foram registados ao nível da transformação microbiana do β -sitosterol, cuja transformação em copro- β -sitosterol foi de 33, 1,8, 16 e 7,1% nos animais intactos e com IRA consumindo o regime C e nos animais intactos e com IRA consumindo o regime SE, respectivamente.

O efeito dos regimes alimentares e do processo cirúrgico na excreção diária de ácidos biliares não foi semelhante. Assim, nos suínos consumindo o regime C, a IRA contribuiu para uma diminuição importante da excreção dos ácidos biliares, facto que não foi verificado nos suínos consumindo o regime SE (Quadro XII). A composição dos ácidos biliares excretados foi afectada pelos regimes e pela cirurgia (Quadro XII). Os metabolitos microbianos dos ácidos biliares representaram mais de 94% do total de ácidos biliares excretados pelos suínos intactos consumindo o regime C. Nestes animais, o ácido hiodesoxicólico representou mais de 62% dos ácidos biliares excretados. O regime SE alterou este padrão, reduzindo a percentagem de metabolitos microbianos para 69% do total de ácidos biliares excretados. Como consequência, o regime SE induziu um aumento ($P = 0,054$) na relação entre os ácidos biliares primários e secundários excretados. Este aumento foi também verificado nos animais anastomizados ($P \leq 0,01$). Nos suínos com IRA consumindo o regime C os ácidos biliares primários atingiram 50% do total de ácidos biliares excretados, ao passo que nos suínos com IRA consumindo o regime SE tal valor atingiu os 67%. Assim, o regime SE e o processo cirúrgico contribuíram ambos para a diminuição da transformação microbiana dos ácidos biliares nos suínos.

Finalmente, em termos quantitativos, a excreção diária total de esteróis neutros e ácidos não foi significativamente afectada nos suínos consumindo o regime SE ($P = 0,084$), nem pelo processo cirúrgico (Quadro XII).

Quadro XII. Efeitos do regime Soja na excreção dos esteróis neutros e ácidos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal

	Regime Caseína		Regime Soja		Análise de variância			
	I	IRA	I	IRA	R	A	R*A ⁽¹⁾	
Esteróis neutros			mg·(d·kg PV)⁻¹					
	52,6 ± 8,6	57,4 ± 9,9	81,3 ± 11,5	81,7 ± 15,3	*	NS	NS	
Colesterol	39,1 ± 9,0	56,7 ± 9,8	77,4 ± 9,7	81,1 ± 15,6	*	NS	NS	
Esteróis microbianos	13,5 ± 3,5 ^a	0,8 ± 0,3 ^b	3,9 ± 1,9 ^b	0,6 ± 0,6 ^b	*	**	*	
Coprostanol	11,8 ± 3,4 ^a	0,2 ± 0,2 ^b	2,9 ± 1,4 ^b	0,6 ± 0,6 ^b	0,055	**	*	
Epicoprostanol	1,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,4	0,0 ± 0,0	NS	*	NS	
Colesterol	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,4	0,0 ± 0,0	NS	NS	NS	
Ácidos biliares	29,0 ± 11,1 ^a	3,6 ± 0,9 ^b	13,4 ± 3,2 ^{ab}	15,6 ± 6,7 ^{ab}	NS	0,088	*	
Ácidos biliares primários	1,5 ± 0,7	1,8 ± 0,7	4,2 ± 0,6	10,4 ± 5,6	0,056	NS	NS	
Ácido quenodesoxicólico	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,9 ± 0,2	2,6 ± 0,9	*	NS	NS	
Ácido hiocólico	0,9 ± 0,5	1,4 ± 0,5	3,3 ± 0,5	7,8 ± 4,7	0,069	NS	NS	
Ácidos biliares secundários	27,5 ± 10,5	1,8 ± 0,3	9,2 ± 2,6	5,2 ± 1,2	NS	*	NS	
Ácido litocólico	6,2 ± 3,1	0,2 ± 0,1	1,2 ± 0,5	0,6 ± 0,1	NS	*	NS	
Ácido hiodesoxicólico	18,1 ± 6,7 ^a	0,7 ± 0,1 ^b	2,9 ± 0,5 ^b	1,5 ± 0,3 ^b	*	**	*	
Ácido 3α-hidroxi-6-oxo-5β-colanólico	1,7 ± 1,4	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	NS	NS	NS	
Ácido 7-oxo-litocólico	1,1 ± 0,3	0,3 ± 0,1	3,0 ± 2,0	1,8 ± 1,2	NS	NS	NS	
Outras cetonas	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	1,5 ± 0,6	0,6 ± 0,1	0,055	NS	NS	
			Relação					
Ácidos biliares primários : secundários ⁽²⁾	0,06 ± 0,01	0,98 ± 0,29	0,52 ± 0,06	1,69 ± 0,51	0,054	**	NS	
Esteróis neutros e ácidos totais	81,7 ± 15,4	61,0 ± 10,2	94,7 ± 12,8	97,2 ± 13,1	0,084	NS	NS	

Notas: I – Animais intactos; IRA – Animais com anastomose íleo-rectal; Efeitos: R – Regime, A – Anastomose, R*A – Interação regime*anastomose;

Significância: ** – P≤0,01, * – P≤0,05, NS – Não significativo (P>0,05);

⁽¹⁾ Quando significativa, médias com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (P≤0,05) pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer; ⁽²⁾ Relação entre os ácidos biliares primários e secundários excretados.

2. EFEITOS DO CONSUMO DO REGIME ERVILHA NOS DIFERENTES PARÂMETROS ANALISADOS EM SUÍNOS INTACTOS E COM ANASTOMOSE ÍLEO-RECTAL

Problemas relacionados com o pós-operatório de um animal anastomizado consumindo o regime C, impediu a sua utilização até ao final do período experimental. Assim sendo, este grupo ficou reduzido a cinco unidades experimentais.

2.1. Parâmetros zootécnicos e peso dos órgãos

O GMD dos grupos consumindo o regime E foi mais elevado ($P \leq 0,01$) que o dos consumindo o regime C, mas menor ($P \leq 0,05$) nos animais sujeitos à IRA que nos animais intactos (Quadro XIII). Os pesos finais apresentaram uma tendência para ser inferiores ($P = 0,076$) nos animais sujeitos ao processo cirúrgico. A ingestão diária do regime E foi superior ($P \leq 0,05$) à do regime C, o mesmo se verificando em relação à ingestão de NDF ($P \leq 0,001$) e de colesterol ($P \leq 0,05$). A retenção de azoto tendeu a ser superior ($P = 0,074$) nos animais consumindo o regime E, não tendo sido afectada pela cirurgia (Quadro XIII).

O peso fresco dos fígados não foi influenciado pelos tratamentos, mas o das vesículas biliares e seus conteúdos foi superior ($P \leq 0,05$) nos animais consumindo o regime E que nos consumindo o regime C (Quadro XIII).

2.2. Parâmetros plasmáticos

Os valores de micro-hematócrito, de proteína total, glucose, creatinina e bilirrubina não foram influenciados pelos tratamentos. A urémia tendeu a ser menor ($P = 0,061$) nos suínos consumindo o regime E que nos consumindo o regime C e foi inferior ($P \leq 0,01$) nos animais com IRA quando comparada com a dos intactos (Quadro XIV).

A colesterolémia foi marcadamente reduzida ($P \leq 0,001$) pelo consumo do regime E. Esta redução deveu-se à menor ($P \leq 0,05$) quantidade de colesterol transportado pelas LDL desses animais que pelas dos consumindo o regime C (-24%). O processo cirúrgico não afectou a colesterolémia, apesar de ter tendido a diminuir ($P = 0,077$) a concentração em colesterol das LDL. A concentração em colesterol das HDL e a relação entre o colesterol das LDL e o das HDL não foram significativamente afectadas pelos tratamentos, o mesmo se verificando para os restantes parâmetros (Quadro XIV).

Quadro XIII. Efeitos do regime Ervilha em alguns parâmetros zootécnicos e no peso dos órgãos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal

	Regime Caseína		Regime Ervilha		Análise de variância		
	I	IRA	I	IRA	R	A	R*A
Peso final	44,4 ± 3,7	37,5 ± 3,6	45,2 ± 0,6	41,3 ± 2,2	NS	0,076	NS
Ganho médio diário ⁽¹⁾	535,2 ± 104,9	382,4 ± 93,5	823,0 ± 39,3	633,2 ± 78,4	**	*	NS
Ingestão voluntária ⁽¹⁾	37,5 ± 1,9	35,8 ± 2,2	42,1 ± 1,4	40,0 ± 2,3	*	NS	NS
Ingestão de NDF ⁽¹⁾	3,23 ± 0,26	2,97 ± 0,31	4,33 ± 0,25	4,10 ± 0,29	***	NS	NS
Ingestão de colesterol ⁽¹⁾	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	*	NS	NS
Retenção de azoto ⁽¹⁾⁽²⁾	0,62 ± 0,06	0,59 ± 0,07	0,73 ± 0,03	0,67 ± 0,04	0,074	NS	NS
Energia metabolizável ⁽¹⁾⁽²⁾	0,63 ± 0,04	0,62 ± 0,05	0,67 ± 0,03	0,63 ± 0,02	NS	NS	NS
Fígado	20,9 ± 0,4	20,7 ± 0,8	19,5 ± 0,4	19,9 ± 1,8	NS	NS	NS
Vesícula biliar	1,0 ± 0,3	0,8 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,1	*	NS	NS

Notas: I – Animais intactos; IRA – Animais com anastomose íleo-rectal; Efeitos: R – Regime, A – Anastomose, R*A – Interação regime*anastomose; Significância: *** – P≤0,001, ** – P≤0,01, * – P≤0,05, NS – Não significativo (P>0,05);

⁽¹⁾ Valores referentes ao período de colheitas; ⁽²⁾ Calculada como a diferença entre a ingestão e a excreção (fezes e urina) por dia e kg PV.

Quadro XIV. Efeito do regime Ervilha em alguns parâmetros plasmáticos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal

	Regime Caseína		Regime Ervilha		Análise de variância		
	I	IRA	I	IRA	R	A	R*A
Micro-hematócrito	0,39 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,39 ± 0,01	NS	NS	NS
Proteína total	69,67 ± 2,50	64,60 ± 3,68	66,17 ± 6,40	62,50 ± 4,00	NS	NS	NS
Ureia	4,54 ± 0,35	2,59 ± 0,31	3,02 ± 0,36	2,46 ± 0,56	0,061	**	NS
Glucose	7,41 ± 0,34	6,24 ± 0,31	6,72 ± 0,96	6,19 ± 1,00	NS	NS	NS
Colesterol livre	0,78 ± 0,06	0,64 ± 0,06	0,58 ± 0,07	0,61 ± 0,06	NS	NS	NS
Colesterol total	4,31 ± 0,27	3,72 ± 0,34	3,09 ± 0,14	3,13 ± 0,10	***	NS	NS
Colesterol das LDL	2,76 ± 0,30	1,92 ± 0,32	1,79 ± 0,13	1,78 ± 0,11	*	0,077	NS
Colesterol das HDL	1,33 ± 0,08	1,34 ± 0,17	1,03 ± 0,08	1,27 ± 0,08	NS	NS	NS
LDL : HDL ⁽¹⁾	2,07 ± 0,21	1,61 ± 0,48	1,81 ± 0,25	1,43 ± 0,12	NS	NS	NS
Triacilgliceróis	0,60 ± 0,10	0,62 ± 0,06	0,47 ± 0,05	0,60 ± 0,02	NS	NS	NS
Fosfolípidos	1,89 ± 0,17	1,81 ± 0,23	1,60 ± 0,06	1,85 ± 0,07	NS	NS	NS
Creatinina	90,33 ± 5,48	87,69 ± 6,28	102,25 ± 8,65	95,33 ± 7,99	NS	NS	NS
Bilirrubina total	2,25 ± 0,31	1,97 ± 0,25	2,40 ± 0,63	2,00 ± 0,31	NS	NS	NS

Notas: I – Animais intactos; IRA – Animais com anastomose íleo-rectal; Efeitos: R – Regime, A – Anastomose, R*A – Interação regime*anastomose; Significância: *** – P≤0,001, ** – P≤0,01, * – P≤0,05, NS – Não significativo (P>0,05);

⁽¹⁾ Relação entre o colesterol das LDL e o colesterol das HDL.

2.3. Parâmetros hepáticos

O colesterol esterificado foi o único lípido hepático afectado pelos tratamentos experimentais, tendo apresentado um valor cerca de 50% inferior ($P \leq 0,001$) nos suínos consumindo o regime E (Quadro XV). Quando comparados com os animais consumindo o regime C, os do regime E exibiram actividades específicas e totais da HMG CoA reductase 3 e 4,7 vezes superiores ($P \leq 0,001$ e $P \leq 0,05$, respectivamente). As actividades específica e total da CYP7A1 não foram afectadas pelos regimes alimentares nem pela cirurgia, mas as da CYP27A1 apresentaram tendência para ser menores ($P = 0,072$ e $P = 0,063$ respectivamente) nos animais com IRA que nos intactos. Por fim, os receptores de LDL apresentaram-se em número superior ($P \leq 0,01$) nos animais consumindo o regime E (Quadro XV).

2.4. Parâmetros biliares

O consumo do regime E originou um aumento ($P \leq 0,001$) nos níveis de colesterol livre e total da bÍlis vesicular, sem alterar os de fosfolípidos (Quadro XVI). A concentração em ácidos biliares foi também superior ($P \leq 0,05$) nestes animais em relação aos consumindo o regime C (+38%). Os índices litogénicos não foram afectados pelos regimes e o processo cirúrgico não afectou nenhum dos parâmetros biliares (Quadro XVI).

A via de síntese dos ácidos biliares predominante foi a do ácido quenodesoxicólico, a qual representou 99% da síntese total de ácidos biliares. No entanto, a composição em ácidos biliares da bÍlis vesicular foi afectada pelos regimes alimentares e pela cirurgia (Quadro XVII). A concentração em ácidos biliares primários na bÍlis dos suínos consumindo o regime E aumentou ($P \leq 0,001$) em relação aos consumindo o regime C, tendo este efeito sido mais visível ($P \leq 0,01$) no ácido hiocólico, o ácido biliar maioritário. Nos animais sujeitos à IRA notou-se também uma importante redução ($P \leq 0,01$) na concentração em ácidos biliares secundários (fundamentalmente no ácido hiodesoxicólico), facto que se repercutiu num aumento ($P \leq 0,001$) da relação entre os ácidos biliares primários e secundários destes animais quando comparada com a dos intactos (Quadro XVII). Os regimes alimentares e o processo cirúrgico não afectaram a proporção de ácidos biliares hidrófobos da bÍlis vesicular, que foi de 35, 32, 34 e 32%, respectivamente para os animais intactos e com IRA consumindo o regime C e para os animais intactos e com IRA consumindo o regime E.



Quadro XV. Efeitos do regime Ervilha nos parâmetros hepáticos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal

	Regime Caseína		Regime Ervilha			Análise de variância		
	I		IRA			R A R*A		
	IRA		I	IRA		R	A	R*A
	mg·g⁻¹							
Colesterol livre	4,16 ± 0,25	4,06 ± 0,14	4,36 ± 0,14	4,43 ± 0,10	NS	NS	NS	NS
Colesterol esterificado	1,09 ± 0,08	1,00 ± 0,03	0,55 ± 0,09	0,53 ± 0,11	***	NS	NS	NS
Colesterol total	5,25 ± 0,27	5,06 ± 0,15	4,91 ± 0,18	4,96 ± 0,12	NS	NS	NS	NS
Triacilgliceróis	11,16 ± 1,22	9,91 ± 0,73	8,62 ± 0,51	9,72 ± 0,75	NS	NS	NS	NS
Fosfolípidos	22,23 ± 0,70	20,90 ± 0,25	21,08 ± 0,57	21,70 ± 0,44	NS	NS	NS	NS
	pmol·(min·mg proteína)⁻¹							
	pmol·(min·órgão)⁻¹							
HMG CoA reductase ⁽¹⁾	1,90 ± 0,36	1,62 ± 0,42	6,32 ± 1,31	4,38 ± 0,80	***	NS	NS	NS
	10 537 ± 1 282	10 117 ± 2 970	54 902 ± 23 525	41 810 ± 12 777	*	NS	NS	NS
CYP7A1 ⁽²⁾	19,23 ± 5,62	17,20 ± 4,42	21,70 ± 6,36	17,72 ± 0,95	NS	NS	NS	NS
	116 305 ± 42 137	105 673 ± 46 608	167 213 ± 58 858	84 759 ± 8 367	NS	NS	NS	NS
CYP27A1 ⁽³⁾	52,48 ± 8,71	33,32 ± 7,40	61,08 ± 2,31	50,04 ± 9,56	NS	0,072	NS	NS
	327 765 ± 52 427	189 666 ± 44 615	372 271 ± 86 260	254 554 ± 53 206	NS	0,063	NS	NS
	Unidades arbitrárias·g⁻¹ proteína							
	Unidades arbitrárias·órgão⁻¹							
Receptores de LDL	1,66 ± 0,28	2,49 ± 0,47	6,27 ± 1,12	4,65 ± 1,41	**	NS	NS	NS
	10 828 ± 2 220	11 287 ± 1 165	32 974 ± 6 294	18 229 ± 3 556	**	NS	NS	NS

Notas: I – Animais intactos; IRA – Animais com anastomose íleo-rectal; Efeitos: R – Regime, A – Anastomose, R*A – Interação regime*anastomose;

Significância: *** – P≤0,001, ** – P≤0,01, * – P≤0,05, NS – Não significativo (P>0,05);

⁽¹⁾ 3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductase (EC 1.1.1.34); ⁽²⁾ Colesterol 7α-hidroxiase (EC 1.14.13.17); ⁽³⁾ Esterol 27-hidroxiase (EC 1.14.13.15).

Quadro XVI. Efeitos do regime Ervilha nos lípidos, ácidos biliares e índices litogénicos da biliar vesicular de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal

	Regime Caseína		Regime Ervilha		Análise de variância			
	I	IRA	I	IRA	R	A	R*A	
	mmol·L ⁻¹							
Colesterol livre	3,69 ± 0,46	4,65 ± 1,15	7,38 ± 0,58	7,32 ± 0,20	***	NS	NS	NS
Colesterol total	3,99 ± 0,50	5,05 ± 1,22	7,72 ± 0,58	7,61 ± 0,23	***	NS	NS	NS
Fosfolípidos	10,19 ± 1,74	9,72 ± 1,29	10,66 ± 2,39	10,12 ± 2,62	NS	NS	NS	NS
Ácidos biliares	193,35 ± 20,35	142,39 ± 10,99	240,94 ± 37,67	223,99 ± 11,58	*	NS	NS	NS
	Índices							
Índice litogénico ⁽¹⁾	0,34 ± 0,08	0,44 ± 0,08	0,52 ± 0,08	0,52 ± 0,05	NS	NS	NS	NS
Índice litogénico ⁽²⁾	0,56 ± 0,13	0,78 ± 0,16	0,82 ± 0,12	0,80 ± 0,04	NS	NS	NS	NS

Notas: I – Animais intactos; IRA – Animais com anastomose íleo-rectal; Efeitos: R – Regime, A – Anastomose, R*A – Interação regime*anastomose;

Significância: *** – P≤0,001, * – P≤0,05, NS – Não significativo (P>0,05);

⁽¹⁾ Calculado segundo o processo proposto por Thomas e Hofmann (1973); ⁽²⁾ Calculado de acordo com Carey (1978).

Quadro XVII. Efeitos do regime Ervilha na composição em ácidos biliares da biliar vesicular de suínos intactos e com anastomose ileo-rectal

	Regime Caseína		Regime Ervilha		Análise de variância		
	I	IRA	I	IRA	R	A	R*A ⁽¹⁾
	mmol·L ⁻¹						
Ácidos biliares primários	109,53 ± 12,73	127,81 ± 8,39	144,52 ± 15,83	205,61 ± 10,14	***	**	NS
Ácido cólico	0,92 ± 0,70	0,24 ± 0,17	0,72 ± 0,39	0,43 ± 0,21	NS	NS	NS
Ácido quenodesoxicólico	42,90 ± 7,87	33,60 ± 10,31	58,47 ± 13,02	57,43 ± 6,10	0,085	NS	NS
Ácido hiocólico	65,71 ± 12,99	93,97 ± 9,95	85,33 ± 14,62	147,75 ± 9,61	**	**	NS
Ácidos biliares secundários	83,82 ± 23,26	14,58 ± 3,02	96,42 ± 33,13	18,38 ± 1,50	NS	**	NS
Ácido desoxicólico	1,29 ± 0,50	0,88 ± 0,14	1,74 ± 0,50	1,36 ± 0,33	NS	NS	NS
Ácido litocólico	10,38 ± 4,70	7,52 ± 2,64	6,46 ± 1,14	6,73 ± 0,76	NS	NS	NS
Ácido hiodesoxicólico	58,19 ± 16,97	2,00 ± 0,50	73,98 ± 31,83	4,14 ± 0,86	NS	**	NS
Ácido 3α-hidroxi-6-oxo-5β-colanólico	3,37 ± 2,56	0,00 ± 0,00	3,23 ± 1,75	0,00 ± 0,00	NS	*	NS
Ácido 7-oxo-litocólico	4,94 ± 1,42 ^a	1,13 ± 0,39 ^b	0,89 ± 0,49 ^b	2,51 ± 0,56 ^{ab}	NS	NS	*
Outras cetonas	5,65 ± 1,56	3,05 ± 0,53	10,12 ± 3,05	3,64 ± 0,49	NS	*	NS
	Relação						
Ácidos biliares primários: secundários ⁽²⁾	2,14 ± 0,90	9,90 ± 1,63	3,16 ± 1,18	11,32 ± 0,38	NS	***	NS

Notas: I – Animais intactos; IRA – Animais com anastomose ileo-rectal; Efeitos: R – Regime, A – Anastomose, R*A – Interação regime*anastomose;

Significância: *** – P<0,001, ** – P<0,01, * – P<0,05, NS – Não significativo (P>0,05);

⁽¹⁾ Quando significativa, médias com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (P<0,05) pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer; ⁽²⁾ Relação entre os ácidos biliares primários e secundários da biliar vesicular.

2.5. Excreção de esteróis neutros e ácidos

O regime alimentar e o processo cirúrgico não afectaram significativamente a excreção diária de esteróis neutros e de colesterol dos suínos. No entanto, o processo cirúrgico originou um decréscimo importante ($P \leq 0,001$) na transformação microbiana do colesterol, essencialmente através da redução da sua transformação em coprostanol ($P \leq 0,01$) e epicoprostanol ($P \leq 0,05$) (Quadro XVIII). Tal redução ($P \leq 0,001$) foi também identificada na transformação microbiana do β -sitosterol em copro- β -sitosterol, que foi de 32, 0,7, 24 e 0% para os animais intactos e com IRA consumindo o regime C e os animais intactos e com IRA consumindo o regime E, respectivamente.

A excreção diária de ácidos biliares foi respectivamente 2,4 e 3,5 vezes mais elevada ($P \leq 0,01$) nos animais intactos e com IRA consumindo o regime E que nos animais intactos e com IRA consumindo o regime C. No entanto, o processo cirúrgico diminuiu drasticamente ($P \leq 0,01$) a excreção dos ácidos biliares, a qual representou só cerca de 32% da observada nos animais intactos (Quadro XVIII). A excreção de ácidos biliares primários foi cerca de 6 vezes superior nos suínos consumindo o regime E que nos consumindo o regime C, principalmente devido a uma excreção mais elevada ($P \leq 0,01$) de ácido hiocólico. A maioria dos ácidos biliares excretados foram, no entanto, secundários. Estes representaram 75 e 90% dos ácidos biliares totais nos animais consumindo o regime E e o regime C, respectivamente. O processo cirúrgico diminuiu ($P \leq 0,001$) de um modo significativo a transformação microbiana dos ácidos biliares. O ácido hiodesoxicólico, o ácido biliar secundário predominante, foi excretado em menores quantidades pelos suínos com IRA que pelos intactos, representando respectivamente 20 e 59% dos ácidos biliares totais. Como resultado, a relação entre os ácidos biliares primários e secundários aumentou ($P \leq 0,001$) nos animais anastomizados (Quadro XVIII).

Por fim, a excreção diária total de esteróis neutros e ácidos foi cerca de 1,5 vezes superior ($P \leq 0,05$) nos suínos consumindo o regime E, não tendo sido afectada pelo processo cirúrgico (Quadro XVIII).

Quadro XVIII. Efeitos do regime Ervilha na excreção dos esteróis neutros e ácidos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal

	Regime Caseína		Regime Ervilha		Análise de variância		
	I	IRA	I	IRA	R	A	R*A
Esteróis neutros							
			mg·(d·kg PV) ⁻¹				
Colesterol	56,1 ± 9,4	69,7 ± 3,7	73,1 ± 11,9	69,3 ± 6,3	NS	NS	NS
Esteróis microbianos	47,1 ± 7,9	68,6 ± 4,1	64,7 ± 10,3	68,4 ± 6,1	NS	NS	NS
Coprostanol	9,0 ± 1,5	1,1 ± 0,4	8,4 ± 3,4	0,9 ± 0,2	NS	**	NS
Epicoprostanol	6,9 ± 2,4	0,5 ± 0,5	7,4 ± 3,3	0,0 ± 0,0	NS	**	NS
Colestanol	1,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,0 ± 0,0	NS	*	NS
Ácidos biliares	0,8 ± 0,3	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,3	NS	NS	NS
Ácidos biliares primários	28,1 ± 9,0	6,8 ± 1,1	66,9 ± 12,7	23,9 ± 9,1	**	**	NS
Ácido quenodesoxicólico	1,2 ± 0,2	2,6 ± 0,5	9,4 ± 3,9	13,1 ± 5,1	**	NS	NS
Ácido hiocólico	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2	2,3 ± 0,8	2,0 ± 0,9	*	NS	NS
Ácidos biliares secundários	0,6 ± 0,1	2,0 ± 0,3	7,1 ± 2,9	11,1 ± 4,8	**	NS	NS
Ácido litocólico	26,9 ± 8,9	4,2 ± 1,2	57,5 ± 14,0	10,8 ± 4,5	0,064	**	NS
Ácido hiodesoxicólico	6,1 ± 3,6	0,4 ± 0,1	10,4 ± 4,5	1,1 ± 0,7	NS	*	NS
Ácido 3α-hidroxi-6-oxo-5β-colanólico	17,4 ± 6,4	1,8 ± 0,6	39,1 ± 11,4	4,5 ± 1,9	NS	**	NS
Ácido 7-oxo-litocólico	1,2 ± 0,4	0,6 ± 0,1	3,1 ± 1,0	0,8 ± 0,4	NS	*	NS
Outras cetonas	1,7 ± 1,0	1,0 ± 0,4	3,6 ± 0,8	3,7 ± 2,8	NS	NS	NS
	0,5 ± 0,3	0,4 ± 0,1	1,3 ± 0,4	0,7 ± 0,2	0,065	NS	NS
			Relação				
Ácidos biliares primários : secundários ⁽¹⁾	0,10 ± 0,06	0,88 ± 0,29	0,25 ± 0,12	1,23 ± 0,41	NS	**	NS
Esteróis neutros e ácidos totais			mg·(d·kg PV) ⁻¹				
	84,2 ± 17,2	76,5 ± 3,2	140,0 ± 20,9	93,2 ± 15,6	*	NS	NS

Notas: I – Animais intactos; IRA – Animais com anastomose íleo-rectal; Efeitos: R – Regime, A – Anastomose, R*A – Interação regime*anastomose;

Significância: ** – P ≤ 0,01, * – P ≤ 0,05, NS – Não significativo (P > 0,05);

⁽¹⁾ Relação entre os ácidos biliares primários e secundários excretados.

3. EFEITOS DO CONSUMO DO REGIME TREMOÇO NOS DIFERENTES PARÂMETROS ANALISADOS EM SUÍNOS INTACTOS E COM ANASTOMOSE ÍLEO-RECTAL

Um dos animais anastomizados consumindo o regime C morreu antes de completar o período experimental, pelo que este grupo ficou reduzido a cinco unidades experimentais.

3.1. Parâmetros zootécnicos e peso dos órgãos

O desempenho zootécnico dos suínos não foi afectado pelos tratamentos experimentais (Quadro XIX), apesar da ingestão voluntária ter sido superior ($P \leq 0,05$) nos suínos consumindo o regime T que nos consumindo o regime C. A ingestão diária de NDF também foi superior ($P \leq 0,001$) nos animais consumindo o regime T, provavelmente influenciada pelo maior conteúdo em NDF deste regime (ver Quadro VI). A ingestão de colesterol e os restantes parâmetros não foram afectados pelos regimes consumidos. Nenhum dos dados fisiológicos foi significativamente afectado pela cirurgia (Quadro XIX).

O peso fresco dos fígados dos suínos consumindo o regime T foi inferior ($P \leq 0,05$) ao dos suínos consumindo o regime C, mas o das vesículas biliares e seus conteúdos não foi afectado pelos regimes consumidos nem pela cirurgia (Quadro XIX).

3.2. Parâmetros plasmáticos

Os tratamentos experimentais não afectaram significativamente os valores de micro-hematócrito, bem como as concentrações plasmáticas de proteína total, glucose, creatinina e bilirrubina total. Os níveis de ureia foram, no entanto, mais baixos ($P \leq 0,05$) nos animais com IRA que nos intactos (Quadro XX).

A colesterolémia foi afectada pelo regime alimentar, tendo sido menor ($P \leq 0,01$) nos animais consumindo o regime T que nos consumindo o regime C, devido a uma concentração inferior ($P \leq 0,01$) de colesterol das LDL. Como resultado, a relação entre o colesterol transportado pelas LDL e pelas HDL foi menor ($P \leq 0,05$) nos suínos consumindo o regime T que nos consumindo o regime C. Por fim, notou-se uma tendência para a diminuição ($P = 0,068$) do colesterol das LDL nos animais com IRA quando comparados com os intactos (Quadro XX).

Quadro XIX. Efeitos do regime Tremoço em alguns parâmetros zootécnicos e no peso dos órgãos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal

	Regime Caseína		Regime Tremoço		Análise de variância		
	I	IRA	I	IRA	R	A	R*A
Peso final	41,8 ± 3,4	38,0 ± 3,0	43,7 ± 3,0	42,3 ± 1,1	NS	NS	NS
Ganho médio diário ⁽¹⁾	537,3 ± 127,7	390,7 ± 76,8	606,5 ± 111,5	458,8 ± 98,7	NS	NS	NS
Ingestão voluntária ⁽¹⁾	37,0 ± 3,1	37,9 ± 1,8	43,6 ± 2,6	42,2 ± 1,6	*	NS	NS
Ingestão de NDF ⁽¹⁾	3,23 ± 0,20	3,00 ± 0,27	4,60 ± 0,30	4,45 ± 0,35	****	NS	NS
Ingestão de colesterol ⁽¹⁾	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	NS	NS	NS
Retenção de azoto ⁽¹⁾⁽²⁾	0,71 ± 0,06	0,62 ± 0,07	0,76 ± 0,04	0,74 ± 0,03	NS	NS	NS
Energia metabolizável ⁽¹⁾⁽²⁾	0,67 ± 0,03	0,63 ± 0,04	0,66 ± 0,03	0,63 ± 0,02	NS	NS	NS
Fígado	21,7 ± 0,6	21,5 ± 1,0	19,6 ± 1,3	18,5 ± 0,9	*	NS	NS
Vesícula biliar	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	NS	NS	NS

Notas: I – Animais intactos; IRA – Animais com anastomose íleo-rectal; Efeitos: R – Regime, A – Anastomose, R*A – Interação regime*anastomose; Significância: **** – P≤0,001, * – P≤0,05, NS – Não significativo (P>0,05);

⁽¹⁾ Valores referentes ao período de colheitas; ⁽²⁾ Calculada como a diferença entre a ingestão e a excreção (fezes e urina) por dia e kg PV.

Quadro XX. Efeito do regime Tremeço em alguns parâmetros plasmáticos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal

	Regime Caseína		Regime Tremeço		Análise de variância		
	I	IRA	I	IRA	R	A	R*A
Micro-hematócrito	0,40 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,40 ± 0,01	NS	NS	NS
Proteína total	68,50 ± 2,81	64,50 ± 3,42	65,33 ± 6,15	74,33 ± 2,33	NS	NS	NS
Ureia	4,26 ± 0,47	2,66 ± 0,28	3,81 ± 0,46	3,26 ± 0,52	NS	*	NS
Glucose	6,93 ± 0,66	6,26 ± 0,25	5,99 ± 0,58	6,87 ± 1,06	NS	NS	NS
Colesterol livre	0,73 ± 0,06	0,64 ± 0,05	0,70 ± 0,10	0,72 ± 0,09	NS	NS	NS
Colesterol total	4,52 ± 0,22	3,74 ± 0,27	3,20 ± 0,38	3,10 ± 0,36	**	NS	NS
Colesterol das LDL	2,69 ± 0,16	1,95 ± 0,28	1,67 ± 0,20	1,62 ± 0,14	**	0,068	NS
Colesterol das HDL	1,36 ± 0,09	1,33 ± 0,14	1,18 ± 0,16	1,22 ± 0,20	NS	NS	NS
LDL : HDL ⁽¹⁾	2,01 ± 0,14	1,63 ± 0,29	1,45 ± 0,08	1,42 ± 0,14	*	NS	NS
Triacilgliceróis	0,65 ± 0,04	0,62 ± 0,05	0,63 ± 0,12	0,77 ± 0,11	NS	NS	NS
Fosfolípidos	1,86 ± 0,19	1,80 ± 0,19	1,80 ± 0,18	1,77 ± 0,16	NS	NS	NS
Creatinina	93,52 ± 6,24	87,10 ± 8,36	96,50 ± 9,40	103,13 ± 7,18	NS	NS	NS
Bilirrubina total	2,21 ± 0,33	1,96 ± 0,21	1,91 ± 0,28	2,28 ± 0,49	NS	NS	NS

Notas: I – Animais intactos; IRA – Animais com anastomose íleo-rectal; Efeitos: R – Regime, A – Anastomose, R*A – Interação regime*anastomose;

Significância: ** – P≤0,01, * – P≤0,05, NS – Não significativo (P>0,05);

⁽¹⁾ Relação entre o colesterol das LDL e o colesterol das HDL.

3.3. Parâmetros hepáticos

Os fígados dos suínos consumindo o regime T, quando comparados com os dos consumindo o regime C, tenderam a apresentar concentrações menores de colesterol livre ($P=0,074$) e concentrações de colesterol esterificado e total respectivamente 2,3 e 1,2 vezes menores ($P\leq 0,001$). Os triacilgliceróis e fosfolípidos não foram afectados pelo regime e a cirurgia não afectou nenhum dos lípidos hepáticos (Quadro XXI). As actividades específica e total da HMG CoA reductase foram respectivamente 16 e 20 vezes superiores ($P\leq 0,001$) nos suínos consumindo o regime T que nos consumindo o regime C. As actividades das enzimas intervenientes na síntese dos ácidos biliares não foram afectadas pelos regimes experimentais, tendo-se no entanto notado uma diminuição ($P\leq 0,05$) na actividade total da CYP27A1 nos animais com IRA em relação aos intactos (Quadro XXI). Por fim, os receptores de LDL apresentaram valores cerca de 2 vezes mais elevados nos animais consumindo o regime T ($P\leq 0,001$) (Quadro XXI).

3.4. Parâmetros biliares

Os tratamentos experimentais não produziram efeitos no colesterol livre, colesterol total e fosfolípidos da bÍlis vesicular (Quadro XXII). No entanto, a concentração em ácidos biliares tendeu a ser superior ($P=0,074$) nos animais consumindo o regime T em relação à dos consumindo o regime C e a ser menor ($P=0,076$) nos animais com IRA que nos intactos. Por fim, o índice litogénico calculado segundo Carey (1978) foi inferior ($P\leq 0,05$) nos grupos consumindo o regime T (Quadro XXII).

A concentração em ácidos biliares primários foi afectada pelo regime, tendo sido superior ($P\leq 0,05$) nos suínos consumindo o regime T que nos consumindo o regime C, principalmente devido à variação (+53%) no ácido hiocólico (Quadro XXIII). A concentração destes ácidos não foi afectada pela cirurgia, mas esta levou a uma redução de 4,3 vezes ($P\leq 0,001$) na concentração em ácidos biliares secundários. Tal efeito notou-se essencialmente ao nível do ácido hiodesoxicólico, 15,9 vezes inferior nos animais com IRA que nos intactos. A relação entre ácidos biliares primários e secundários foi assim marcadamente superior ($P\leq 0,01$) nos animais sujeitos à cirurgia (Quadro XXIII). Os regimes alimentares e a cirurgia não afectaram a proporção de ácidos biliares hidrófobos (quenodesoxicólico, desoxicólico, litocólico, 3α -hidroxi-6-oxo- 5β -colanóico, 7-oxo-litocólico e outras cetonas) da bÍlis vesicular, que foi de 36, 32, 31 e 26%, respectivamente para os animais intactos e com IRA consumindo os regimes C e para os animais intactos e com IRA consumindo o regime T.

Quadro XXI. Efeitos do regime Tremeço nos parâmetros hepáticos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal

	Regime Caseína			Regime Tremeço			Análise de variância		
	I	IRA	I	I	IRA	R	A	R*A	
	mg·g ⁻¹								
Colesterol livre	4,13 ± 0,22	4,06 ± 0,10	3,69 ± 0,20	3,75 ± 0,24	0,074	NS	NS	NS	
Colesterol esterificado	1,16 ± 0,07	1,07 ± 0,09	0,47 ± 0,08	0,51 ± 0,02	***	NS	NS	NS	
Colesterol total	5,29 ± 0,25	5,13 ± 0,14	4,16 ± 0,20	4,26 ± 0,24	***	NS	NS	NS	
Triacilgliceróis	10,75 ± 1,58	9,96 ± 0,60	11,35 ± 1,08	10,79 ± 1,92	NS	NS	NS	NS	
Fosfolípidos	20,99 ± 0,70	20,78 ± 0,24	20,28 ± 0,37	20,83 ± 0,69	NS	NS	NS	NS	
				pmol·(min·mg proteína) ⁻¹					
				pmol·(min·órgão) ⁻¹					
HMG CoA reductase ⁽¹⁾	2,05 ± 0,37	1,80 ± 0,39	40,74 ± 10,30	20,55 ± 4,93	***	NS	NS	NS	
	10 736 ± 1 336	11 422 ± 2 645	278 890 ± 61 656	176 149 ± 47 378	***	NS	NS	NS	
CYP7A1 ⁽²⁾	21,50 ± 4,87	20,48 ± 4,88	19,82 ± 0,50	18,50 ± 1,73	NS	NS	NS	NS	
	126 085 ± 34 948	115 789 ± 39 376	146 755 ± 27 192	116 101 ± 16 830	NS	NS	NS	NS	
CYP27A1 ⁽³⁾	59,68 ± 7,40	33,12 ± 7,08	45,10 ± 11,66	39,36 ± 5,46	NS	0,062	NS	NS	
	285 436 ± 53 312	195 098 ± 39 812	292 795 ± 41 923	192 932 ± 37 202	NS	*	NS	NS	
				Unidades arbitrárias·g ⁻¹ proteína					
				Unidades arbitrárias·órgão ⁻¹					
Receptores de LDL	1,98 ± 0,23	2,45 ± 0,38	4,26 ± 0,49	5,38 ± 0,78	***	NS	NS	NS	
	10 968 ± 2 284	11 631 ± 1 011	20 458 ± 2 815	22 839 ± 3 534	***	NS	NS	NS	

Notas: I – Animais intactos; IRA – Animais com anastomose íleo-rectal; Efeitos: R – Regime, A – Anastomose, R*A – Interação regime*anastomose;

Significância: *** – P≤0,001, * – P≤0,05, NS – Não significativo (P>0,05);

⁽¹⁾ 3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductase (EC 1.1.1.34); ⁽²⁾ Colesterol 7 α -hidroxilase (EC 1.14.13.17); ⁽³⁾ Esterol 27-hidroxilase (EC 1.14.13.15).

Quadro XXII. Efeitos do regime Tremeço nos lípidos, ácidos biliares e índices litogénicos da biliar vesicular de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal

	Regime Caseína		Regime Tremeço		Análise de variância			
	I	IRA	I	IRA	R	A	R*A	R*A
	mmol.L ⁻¹							
Colesterol livre	3,66 ± 0,69	4,64 ± 1,15	2,55 ± 0,25	3,35 ± 0,46	NS	NS	NS	NS
Colesterol total	4,01 ± 0,78	5,04 ± 1,22	3,06 ± 0,29	3,73 ± 0,55	NS	NS	NS	NS
Fosfolípidos	10,07 ± 2,55	9,73 ± 1,29	8,81 ± 1,40	6,02 ± 1,07	NS	NS	NS	NS
Ácidos biliares	189,37 ± 22,56	143,80 ± 9,08	224,59 ± 27,63	189,64 ± 21,91	0,074	0,076	0,074	0,076
	Índices							
Índice litogénico ⁽¹⁾	0,32 ± 0,06	0,40 ± 0,08	0,21 ± 0,02	0,30 ± 0,05	0,084	NS	NS	NS
Índice litogénico ⁽²⁾	0,52 ± 0,10	0,71 ± 0,15	0,33 ± 0,03	0,46 ± 0,08	*	NS	NS	NS

Notas: I – Animais intactos; IRA – Animais com anastomose íleo-rectal; Efeitos: R – Regime, A – Anastomose, R*A – Interação regime*anastomose;

Significância: * – P ≤ 0,05, NS – Não significativo (P > 0,05);

⁽¹⁾ Calculado segundo o processo proposto por Thomas e Hofmann (1973); ⁽²⁾ Calculado de acordo com Carey (1978).

Quadro XXIII. Efeitos do regime Tremoeço na composição em ácidos biliares da bñlis vesicular de suinos intactos e com anastomose íleo-rectal

	Regime Caseína		Regime Tremoeço		Análise de variância			
	I	IRA	I	IRA	R	A	R*A	
	mmol.L ⁻¹							
Ácidos biliares primários	111,89 ± 25,03	129,90 ± 7,16	169,17 ± 28,52	172,77 ± 23,04	*	NS	NS	NS
Ácido cólico	0,44 ± 0,34	0,20 ± 0,15	1,40 ± 0,73	0,82 ± 0,24	NS	NS	NS	NS
Ácido quenodesoxicólico	38,00 ± 7,98	34,66 ± 8,48	48,14 ± 7,92	33,87 ± 4,04	NS	NS	NS	NS
Ácido hiocólico	73,45 ± 30,45	95,04 ± 8,19	119,63 ± 25,25	138,08 ± 21,65	0,059	NS	NS	NS
Ácidos biliares secundários	77,48 ± 19,34	13,90 ± 2,56	55,42 ± 11,47	16,87 ± 2,58	NS	***	NS	NS
Ácido desoxicólico	1,59 ± 0,36	0,93 ± 0,12	1,09 ± 0,11	0,71 ± 0,17	0,083	*	NS	NS
Ácido litocólico	8,91 ± 3,72	7,04 ± 2,21	6,29 ± 0,97	5,49 ± 0,42	NS	NS	NS	NS
Ácido hiodesoxicólico	50,45 ± 15,39	1,86 ± 0,44	34,80 ± 10,16	3,51 ± 0,81	NS	***	NS	NS
Ácido 3α-hidroxi-6-oxo-5β-colanólico	2,84 ± 2,07	0,00 ± 0,00	3,57 ± 3,02	0,00 ± 0,00	NS	NS	NS	NS
Ácido 7-oxo-litocólico	6,51 ± 0,46	1,08 ± 0,32	4,75 ± 1,14	2,64 ± 0,96	NS	***	NS	NS
Outras cetonas	7,18 ± 1,96	2,99 ± 0,43	4,92 ± 0,77	4,52 ± 0,95	NS	*	NS	NS
	Relação							
Ácidos biliares primários: secundários ⁽¹⁾	2,16 ± 0,93	10,69 ± 1,55	4,20 ± 1,28	12,70 ± 3,77	NS	NS	**	NS

Notas: I – Animais intactos; IRA – Animais com anastomose íleo-rectal; Efeitos: R – Regime, A – Anastomose, R*A – Interação regime*anastomose;

Significância: *** – P ≤ 0,001, ** – P ≤ 0,01, * – P ≤ 0,05, NS – Não significativo (P > 0,05);

⁽¹⁾ Relação entre os ácidos biliares primários e secundários da bñlis vesicular.

3.5. Excreção de esteróis neutros e ácidos

Os animais consumindo o regime T apresentaram valores mais elevados de excreção diária de esteróis neutros e de colesterol ($P \leq 0,001$ e $P \leq 0,01$, respectivamente) que os consumindo o regime C (Quadro XXIV). O principal esterol excretado, o colesterol, viu a sua transformação microbiana praticamente anulada ($P \leq 0,01$) nos animais com IRA, quando comparada com a verificada nos animais intactos. Efeitos idênticos ($P \leq 0,01$) foram observados na transformação microbiana do β -sitosterol em copro- β -sitosterol, que atingiu nos animais intactos e com IRA consumindo o regime C e nos animais intactos e com IRA consumindo o regime T, respectivamente os 27, 0,7, 28 e 0%.

A excreção diária de ácidos biliares não foi afectada pelos regimes consumidos mas foi drasticamente reduzida ($P \leq 0,01$) pela IRA, tendo representado só 33% do valor verificado nos animais intactos (Quadro XXIV). Apesar dos animais consumindo o regime T excretarem mais ácido quenodesoxicólico que os consumindo o regime C ($P \leq 0,05$), a excreção de ácidos biliares primários não foi afectada pelo consumo dos diferentes regimes experimentais. Os metabolitos microbianos dos ácidos biliares constituíram o grosso da massa de ácidos biliares excretados, representando 85 e 87% dos ácidos biliares totais dos animais consumindo o regime T e o regime C, respectivamente. A excreção destes metabolitos foi drasticamente reduzida pelo processo cirúrgico, representando os ácidos biliares secundários cerca de 61% dos ácidos biliares totais dos animais com IRA, por comparação com os 94% detectados nos intactos. Este efeito notou-se essencialmente na excreção dos ácidos litocólico e hiodesoxicólico (o ácido biliar secundário predominante), respectivamente 5,4 e 5,7 vezes menor nos animais sujeitos ao processo cirúrgico. Reflectindo estas alterações, a relação entre os ácidos biliares primários e secundários excretados foi superior ($P \leq 0,01$) nos animais com IRA.

A excreção diária total de esteróis neutros e ácidos foi cerca de 1,6 vezes superior ($P \leq 0,01$) nos animais ingerindo o regime T que nos ingerindo o regime C, tendo também tendido a ser menor ($P = 0,083$) nos animais com IRA que nos intactos.

Quadro XXIV. Efeitos do regime Tremeço na excreção dos esteróis neutros e ácidos de suínos intactos e com anastomose íleo-rectal

	Regime Caseína		Regime Tremeço		Análise de variância		
	I	IRA	I	IRA	R	A	R*A
Esteróis neutros							
	mg·(d·kg PV)⁻¹						
Colesterol	59,6 ± 8,9	64,0 ± 3,2	100,6 ± 10,3	99,5 ± 12,1	***	NS	NS
Esteróis microbianos	52,1 ± 9,7	61,7 ± 3,3	85,9 ± 11,2	99,5 ± 12,1	**	NS	NS
Coprostanol	7,5 ± 2,2	2,3 ± 0,4	14,7 ± 5,4	0,0 ± 0,0	NS	**	NS
Epicoprostanol	6,1 ± 1,9	1,6 ± 0,6	14,4 ± 5,2	0,0 ± 0,0	NS	**	NS
Colestanol	1,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	NS	NS	NS
Ácidos biliares	0,4 ± 0,2	0,7 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,075	NS	NS
Ácidos biliares primários	30,1 ± 8,3	9,0 ± 1,4	38,1 ± 8,6	13,2 ± 3,8	NS	**	NS
Ácido quenodesoxicólico	0,7 ± 0,2	4,2 ± 1,3	3,1 ± 0,9	4,5 ± 1,2	NS	*	NS
Ácido hiocólico	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,4	2,1 ± 0,6	1,1 ± 0,4	*	NS	NS
Ácidos biliares secundários	0,3 ± 0,1	3,3 ± 0,8	1,0 ± 0,3	3,4 ± 1,1	NS	**	NS
Ácido litocólico	29,4 ± 8,1	4,8 ± 0,7	35,0 ± 7,7	8,7 ± 3,3	NS	***	NS
Ácido hiodesoxicólico	9,4 ± 3,4	0,5 ± 0,1	5,1 ± 1,1	2,2 ± 0,9	NS	**	NS
Ácido 3α-hidroxi-6-oxo-5β-colanólico	16,5 ± 5,8	1,3 ± 0,4	22,0 ± 5,4	5,5 ± 2,4	NS	**	NS
Ácido 7-oxo-litocólico	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,5 ± 0,3	0,4 ± 0,2	NS	*	NS
Outras cetonas	2,0 ± 1,1	1,7 ± 0,9	5,5 ± 2,2	0,5 ± 0,2	NS	0,070	NS
	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,1 ± 0,1	NS	*	NS
Ácidos biliares primários : secundários ⁽¹⁾	0,02 ± 0,01	0,97 ± 0,39	0,08 ± 0,01	0,90 ± 0,32	NS	**	NS
	Relação						
Esteróis neutros e ácidos totais	89,7 ± 11,9	73,0 ± 8,0	138,7 ± 9,4	112,7 ± 14,0	**	0,083	NS

Notas: I – Animais intactos; IRA – Animais com anastomose íleo-rectal; Efeitos: R – Regime, A – Anastomose, R*A – Interação regime*anastomose;

Significância: *** – P<0,001, ** – P<0,01, * – P<0,05, NS – Não significativo (P>0,05);

⁽¹⁾ Relação entre os ácidos biliares primários e secundários excretados.

V. DISCUSSÃO

O conjunto destes trabalhos experimentais pretendeu examinar o efeito do consumo de três espécies de leguminosas, bem como o da ausência funcional do segmento ceco-cólon, no metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos de suínos em crescimento tornados hipercolesterolémicos pelo regime alimentar.

1. EFEITOS DO CONSUMO DO REGIME SOJA NO METABOLISMO DO COLESTEROL E DOS ESTERÓIS NEUTROS E ÁCIDOS DE SUÍNOS INTACTOS E COM ANASTOMOSE ÍLEO-RECTAL (ENSAIO SOJA)

Durante o período experimental, os dados fisiológicos (GMD, ingestão voluntária, retenção de azoto, energia metabolisável (EM)) e o peso fresco relativo dos órgãos não foram afectados pelo processo cirúrgico. No entanto, o GMD dos animais consumindo o regime SE foi menor que o dos consumindo o regime C. Tal facto poderá estar relacionado com a presença de factores antitripsínicos na leguminosa (cuja actividade determinada foi de $7,2 \text{ mg TIA}\cdot\text{g}^{-1}$) e com o conteúdo mais elevado em NDF do regime SE, o qual foi negativamente correlacionado com a eficiência de utilização da EM como energia limpa pelos suínos (Noblet *et al.*, 1989). Os animais consumindo o regime SE apresentaram também fígados mais leves que os consumindo o regime C. Tal facto pode ter resultado de alterações na composição tissular hepática, nomeadamente devido a um menor conteúdo lipídico, como já referido por Rubio *et al.* (1999).

Os valores observados para os parâmetros plasmáticos não lipídicos apresentaram-se dentro dos limites fisiológicos para suínos em crescimento (Swenson, 1993). Destes, só a urémia foi afectada pelos tratamentos, apresentando valores mais elevados nos animais consumindo o regime SE que nos consumindo o regime C e valores mais baixos nos animais sujeitos à IRA que nos animais intactos. O aumento da urémia nos animais consumindo o regime à base da leguminosa é difícil de interpretar. Tal efeito pode estar relacionado com um maior catabolismo hepático dos aminoácidos da proteína de soja, como sugerido pelo aumento da excreção de N na urina destes animais (dados não apresentados), e já verificado por Deutz *et al.* (1998) em suínos consumindo regimes à base de caseína e de proteína de soja. No entanto, este catabolismo deveria ter também afectado os valores de retenção de N nos suínos ingerindo o regime SE, facto que

inesperadamente não se verificou. Por fim, a redução da urémia pelo processo cirúrgico está de acordo com o facto do ceco-cólon ser um local de produção e absorção de amónia, a qual é transformada em ureia pelo fígado antes de retornar ao ceco-cólon ou ser excretada pela urina (Conway, 1994).

A colesterolémia nos suínos consumindo o regime C foi 50% superior à detectada em machos em crescimento Duroc x (Large White x Landrace) consumindo um regime comercial sem adição de colesterol ($2,68 \pm 0,10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). No entanto, ela foi similar à registada por Férézou *et al.* (1997) em suínos em crescimento Large White ingerindo um regime à base de caseína enriquecido com $3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de colesterol. O regime alimentar e o procedimento cirúrgico não influenciaram o nível plasmático e lipoproteico de colesterol, bem como dos outros lípidos determinados, mas modificaram o metabolismo hepático do esterol e dos ácidos biliares e afectaram significativamente a acção da microflora intestinal.

De entre os processos de entrada (“input”) de colesterol no organismo (ingestão + biossíntese de colesterol), a ingestão calculada de colesterol alimentar (colesterol absorvido e não absorvido) foi idêntica nos quatro tratamentos experimentais. Por seu lado, a biossíntese de colesterol, quando determinada através da actividade hepática da HMG CoA reductase, não foi modificada pelos regimes nem pelo processo cirúrgico. Esta actividade enzimática foi semelhante à observada em suínos consumindo um regime à base de caseína enriquecido em colesterol, mas inferior à obtida noutros consumindo o mesmo regime sem adição de colesterol (Férézou *et al.*, 1997). Assim, e apesar da biossíntese tissular total de colesterol não ter sido determinada neste trabalho, pode-se supor que a entrada de colesterol no organismo dos suínos dos quatro grupos experimentais foi provavelmente semelhante.

Dos dois processos que originam a eliminação (“output”) de colesterol do organismo (excreção diária de esteróis neutros e ácidos), a excreção de esteróis neutros (colesterol e seus derivados microbianos) aumentou em cerca de 48% nos animais consumindo o regime SE quando comparada com a dos consumindo o regime C. Este aumento sugere uma menor absorção intestinal de colesterol, a qual poderia estar relacionada com a presença de fitosteróis (Ikeda *et al.*, 1988a; Pakarinen *et al.*, 1996; Carr *et al.*, 2002) (1,8 vezes mais elevada no regime SE que no C) e elevados conteúdos intestinais em componentes não digeridos da soja como fibras (Potter, 1995; Kreuzer *et al.*, 2002) e péptidos hidrófobos (Sugano *et al.*, 1990), cuja capacidade para interferir na absorção intestinal dos esteróis neutros e ácidos é conhecida. Esta redução na absorção intestinal pode também ter influenciado o processo de armazenamento de colesterol no fígado, reduzindo a quantidade de ésteres de colesterol detectados nos suínos consumindo o regime SE a metade da observada nos consumindo o regime C. A ausência do segmento

ceco-cólon não contribuiu significativamente para o aumento da excreção de colesterol, o que está de acordo com o facto da absorção intestinal deste esterol ocorrer principalmente no intestino delgado (Swell *et al.*, 1955; McIntyre *et al.*, 1971; Schiff *et al.*, 1972; Aigueperse, 1979). Quanto à excreção diária dos ácidos biliares, esta não foi alterada pelo consumo do regime SE. Tal excreção foi no entanto reduzida nos animais sujeitos à IRA consumindo o regime C mas não nos ingerindo o regime SE, provavelmente devido a mecanismos semelhantes aos detectados na redução da absorção intestinal dos esteróis neutros. Quando o metabolismo do colesterol atinge um estado de equilíbrio, a excreção de ácidos biliares é compensada pela sua síntese hepática (Lindstedt, 1957). Tal não se verificou neste ensaio, onde a síntese hepática de ácidos biliares estimada pelas actividades das enzimas-chave CYP7A1 e CYP27A1, não foi afectada pelos tratamentos experimentais. A discrepância observada entre excreção e síntese de ácidos biliares pode assim espelhar um estado de desequilíbrio nos nossos suínos, resultante das quantidades apreciáveis de colesterol que os mamíferos em crescimento utilizam na síntese de membranas celulares (Spady e Dietschy, 1983; McWhinney *et al.*, 1996).

Em termos de balanço dos esteróis, a diferença entre a entrada e eliminação destes compostos pode representar a quantidade de colesterol depositada diariamente nos tecidos (Marsh *et al.*, 1972). No entanto, quando calculada nos quatro grupos experimentais, esta diferença foi elevada e provavelmente sobrestimada, devido a assunções teóricas no cálculo de cada termo do balanço. A única determinação da concentração em colesterol nos tecidos feita neste ensaio foi a do fígado, um órgão onde tal concentração pode variar de maneira importante sem se detectarem variações nos outros tecidos (Marsh *et al.*, 1972). Assim, e apesar da concentração em colesterol no fígado ter sido em média 2 vezes superior à observada em fígados de suínos consumindo um regime livre de colesterol (Férézou *et al.*, 1997), novas determinações são necessárias para confirmar a deposição de colesterol nos tecidos extra-hepáticos dos suínos. Por fim, a excreção diária total de esteróis neutros e ácidos não foi significativamente diferente entre os quatro grupos experimentais. Segundo valores anteriormente obtidos em suínos (Férézou *et al.*, 1997), é necessário aumentar em cerca de 2 vezes a excreção diária de esteróis totais para se obter um decréscimo de 50% na colesterolémia. Assim sendo, a fraca variação entre a entrada e a eliminação de colesterol do organismo dos suínos verificada neste ensaio poderia explicar a ausência de efeitos na colesterolémia do regime SE e do processo cirúrgico.

A acção da flora microbiana na composição dos esteróis neutros e ácidos foi muito influenciada pelo regime SE e pelo processo cirúrgico. Nos animais intactos e de acordo com o determinado nas fezes, a transformação microbiana do colesterol e do β -sitosterol

foi fraca (26 e 5% dos esteróis neutros totais e 33 e 16% do β -sitosterol total, respectivamente nos suínos intactos consumindo o regime C e o regime SE). Tal fenómeno está muito provavelmente relacionado com a ingestão de elevados níveis de colesterol alimentar, não totalmente solubilizado pelos ácidos biliares de modo a ser degradado pela microflora intestinal (Marsh *et al.*, 1972) e foi também notado por Férézou *et al.* (1997). A transformação microbiana de colesterol em coprostanol foi quase totalmente impedida pelo regime SE e pelo processo cirúrgico. Esta inibição não foi anteriormente observada em animais consumindo proteína de soja não extrudida (Beynen *et al.*, 1990; Morita *et al.*, 1997), mas foi-o em ratos, hamsters e suínos consumindo hidratos de carbono de fraca digestibilidade (β -ciclodextrina, goma de guar, inulina, amido modificado ("amylomaize starch")) (Riottot *et al.*, 1993; Levrat *et al.*, 1994; Khallou *et al.*, 1995). Em contraste com o verificado para o colesterol, a transformação microbiana dos ácidos biliares nos suínos intactos consumindo o regime C foi quase completa (95%), tendo os ácidos biliares secundários representado 36% do total dos ácidos da bÍlis vesicular. A transformação microbiana dos ácidos biliares nestes animais foi superior à detectada nos animais sujeitos à IRA consumindo o mesmo regime. Tal facto poderia explicar a fraca excreção diária de ácidos biliares observada nestes últimos e anteriormente referida, já que na porção distal do intestino delgado a afinidade do IBAT/ASBT é maior para os ácidos biliares conjugados que para os livres (Love e Dawson, 1998; Shneider, 2001). Tal como o observado na transformação do colesterol em esteróis microbianos e provavelmente pelas mesmas razões, o consumo do regime SE limitou a transformação microbiana dos ácidos biliares, tendo os ácidos biliares secundários representado só 49% da excreção diária de ácidos biliares. Curiosamente, o processo cirúrgico reduziu mas não impediu a transformação dos ácidos biliares como o fez em relação à do colesterol. Assim, os ácidos biliares secundários representaram 50 e 33% da excreção dos ácidos biliares e 9,6 e 7,2% dos ácidos biliares da bÍlis em suínos sujeitos à IRA consumindo os regimes C e SE, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos em suínos sujeitos à IRA consumindo feijão (Costa *et al.*, 1994) e em humanos sujeitos a anastomoses íleo-anais (Hakala *et al.*, 1997). A excreção destes metabolitos dos ácidos biliares nos suínos sujeitos à IRA, sugere que a parte distal do intestino delgado destes animais continha uma população microbiana metabolicamente activa e mais eficiente a desconjugar (*Lactobacillus* spp.) e desidroxilar (*Bacteroides* spp.) ácidos biliares (Hoffmann, 1988) do que a reduzir a ligação dupla no núcleo esterol do colesterol (*Eubacterium* spp.) (Sadzikowski *et al.*, 1977). O consumo do regime SE também diminuiu a concentração em ácidos biliares hidrófobos da bÍlis, facto que não foi verificado nos animais sujeitos à IRA. Esta diminuição poderia estar também relacionada com a ausência de variação na síntese hepática dos esteróis neutros e ácidos, uma vez

que são os ácidos biliares hidrófobos que estão envolvidos na sua modulação (Kwekkeboom *et al.*, 1990b; Pandak *et al.*, 1994). Por fim e tal como o processo cirúrgico, o consumo do regime SE contribuiu para um aumento marcado da relação entre ácidos biliares primários e secundários na bilis e nas fezes. Tal aumento sugere que este regime, contendo 25% de soja extrudida, desempenhou um papel específico na inibição da transformação microbiana dos ácidos biliares. Para obter níveis semelhantes de inibição em ratos consumindo amido resistente e amido de batata, Andrieux *et al.* (1989) tiveram de incorporar nos regimes 58 e 32% destes hidratos de carbono de fraca digestibilidade. A diminuição da transformação microbiana de esteróis pelo regime alimentar é um tópico muito interessante, uma vez que tais moléculas estão envolvidas em patologias do cólon, particularmente cancros (Nagengast *et al.*, 1995).

A ausência de um efeito hipocolesterolémico por parte da soja foi inesperado. São vários os estudos que demonstram que o consumo de soja na forma de farinha, de isolados proteicos ou de leite, diminui a colesterolemia em humanos (Carroll e Kurowska, 1995; Potter, 1995) e animais hiperlipidémicos (Terpstra *et al.*, 1991; Carroll e Kurowska, 1995). No entanto, tal efeito da soja parece estar ligado aos seus componentes, uma vez que a farinha de soja (com a fibra e proteína na sua forma natural) não apresenta o mesmo efeito hipocolesterolémico que isolados proteicos de soja suplementados com fibra dos cotilédones desta leguminosa (Potter, 1995). Além disso, componentes bioactivos da soja como os fitosteróis ou as isoflavonas (Potter, 1995; Lichtenstein, 1998) parecem também desempenhar um papel na obtenção de tal efeito. Assim, produtos de soja obtidos por extracção com água e etanol podem perder a maioria dos seus componentes não proteicos (Anderson e Wolf, 1995), o que explicaria a inoperância demonstrada por isolados proteicos extra-puros de soja (Madani *et al.*, 1998 e 2000) e extraídos com etanol (Lucas *et al.*, 2001) em modular a colesterolemia em ratos e hamsters. Os tratamentos térmicos e de pressão utilizados na extrusão da soja, ao modificarem as propriedades físico-químicas do alimento (Harper, 1978; Friedman e Brandon, 2001), poderiam assim estar na base da falta de efeito hipocolesterolémico detectada neste ensaio.

2. EFEITOS DO CONSUMO DO REGIME ERVILHA NO METABOLISMO DO COLESTEROL E DOS ESTERÓIS NEUTROS E ÁCIDOS DE SUÍNOS INTACTOS E COM ANASTOMOSE ÍLEO-RECTAL (ENSAIO ERVILHA)

Os animais permaneceram de boa saúde ao longo do período experimental, mas os regimes alimentares e o processo cirúrgico influenciaram os dados fisiológicos obtidos. O GMD foi maior nos suínos consumindo o regime E que nos consumindo o regime C, possivelmente devido aos níveis mais elevados de ingestão voluntária e retenção de azoto observados nos primeiros. O processo cirúrgico originou crescimentos menores dos animais. Este GMD inferior em relação ao dos animais intactos foi provavelmente devido a uma ingestão voluntária ligeiramente menor, bem como a valores inferiores ($P \leq 0,01$) de digestibilidade da energia verificados nos animais sujeitos à IRA (dados previamente publicados por Salgado *et al.*, 2002). Por fim, o peso das vesículas biliares foi cerca de 1,7 vezes superior nos animais consumindo o regime E que nos consumindo o regime C, muito provavelmente devido à maior concentração em colesterol e ácidos biliares detectada na bÍlis dos suínos consumindo o regime à base da leguminosa.

Os parâmetros plasmáticos não lipídicos foram semelhantes em todos os tratamentos experimentais, com excepção da ureia. Tal como no Ensaio Soja, a urémia foi significativamente reduzida pelo processo cirúrgico, confirmando o ceco-cólon como um local de produção e absorção de amónia (Conway, 1994).

A colesterolémia nos suínos consumindo o regime C foi 52% superior à observada em machos em crescimento do mesmo cruzamento consumindo um regime comercial sem adição de colesterol ($2,64 \pm 0,10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), mas foi idêntica à observada em suínos em crescimento consumindo um regime à base de caseína enriquecido em colesterol (Férézou *et al.*, 1997). Quando comparado ao do regime C, o consumo do regime E reduziu o nível de colesterol plasmático dos suínos (-22%) através de uma diminuição do colesterol transportado pelas LDL (-24%). Resultados semelhantes foram obtidos com o consumo de grãos de ervilha em regimes sem (Jacques *et al.*, 1986) e com a adição de colesterol por ratos (Jacques *et al.*, 1986; Wang e McIntosh, 1996; Alonso *et al.*, 2001) e suínos (Kingman *et al.*, 1993), ou com o consumo de fibra de ervilha por humanos normocolesterolémicos (Dubois *et al.*, 1993). Quando se verifica, a redução do colesterol das LDL pode resultar de uma diminuição na síntese destas lipoproteínas (via conversão de VLDL em LDL ou por síntese hepática de LDL) e/ou de um catabolismo acrescido das LDL (Huff e Telford, 1985; Kingman, 1991; Huff *et al.*, 2002). Este último processo esteve provavelmente envolvido na modulação do efeito hipocolesterolémico verificado, uma vez

que a quantidade de receptores hepáticos de LDL foi 2,6 vezes mais elevada nos suínos consumindo o regime E que nos consumindo o regime C.

A ingestão de colesterol alimentar foi idêntica nos quatro tratamentos experimentais. Por seu lado, a biossíntese de colesterol nos suínos consumindo o regime C, expressa pela actividade da HMG CoA reductase, foi baixa. Tal observação está de acordo com o efeito inibidor na actividade desta enzima obtido com o aporte alimentar de colesterol (Rogers *et al.*, 1981; Férézou *et al.*, 1997). No entanto, nos suínos consumindo o regime E, a actividade da HMG CoA reductase foi 3 vezes superior à verificada nos animais consumindo o regime C.

A excreção diária de esteróis neutros não foi estatisticamente diferente nos suínos consumindo os dois regimes experimentais. Mais uma vez, a ausência do segmento ceco-cólon não afectou a excreção de colesterol, confirmando que a absorção intestinal deste esterol ocorre principalmente no intestino delgado (Swell *et al.*, 1955; McIntyre *et al.*, 1971; Schiff *et al.*, 1972; Aigueperse, 1979). No entanto, a excreção diária de ácidos biliares foi 2,6 vezes maior nos suínos consumindo o regime E do que nos consumindo o regime C. Este aumento na excreção pode ter sido modulado por componentes não digeridos pertencentes à fracção solúvel de PNA da ervilha, capazes de sequestrar ácidos biliares em géis ou via ligações químicas (Vahouny *et al.*, 1980; Soni *et al.*, 1982; Anderson *et al.*, 1994). Tal sugestão está de acordo com o nível de ingestão de hemiceluloses⁽²⁾, 1,5 vezes superior nos suínos consumindo o regime E. Outros componentes bioactivos da ervilha como o seu grande conteúdo em amido resistente (Canibe e Knudsen, 1997; Guillon e Champ, 2002) e as saponinas (Oakenfull, 1981; Price *et al.*, 1986; Guillon e Champ, 2002), podem também ter modulado o aumento da excreção diária de ácidos biliares. A perda fecal de ácidos biliares foi sugerida há muito tempo como sendo equilibrada pela síntese de novos ácidos a partir do colesterol (Lindstedt, 1957). Tal sugestão parece estar de acordo com o menor armazenamento hepático deste esterol e uma estimulação das actividades da HMG CoA reductase e da síntese de receptores hepáticos de LDL observadas nos suínos consumindo o regime E. Apesar disto, o aumento da excreção de ácidos biliares nos suínos consumindo o regime E não esteve associado a um aumento da síntese hepática de ácidos biliares, quando esta foi estimada pelas actividades das CYP7A1 e CYP27A1. No entanto, não nos podemos esquecer que a actividade da 6 α -hidroxilase (CYP4A21), uma das enzimas-chave da síntese hepática de ácidos biliares no suíno, não foi quantificada neste trabalho. Esta enzima é responsável pela 6 α -hidroxilação do ácido quenodesoxicólico em hiocólico (Lundell *et al.*, 2001) e a sua actividade poderia ter-se apresentado aumentada nos

⁽²⁾ Valor calculado como a diferença entre a ingestão de NDF e a de ADF.

animais consumindo o regime E, como o sugerem os valores 1,5 vezes superiores de ácido hiocólico detectado na bÍlis destes animais e a excreção fecal 7 vezes superior deste ácido. Esta discrepância entre excreção e síntese de ácidos biliares poderá assim ser um artifício resultante da ausência de medição da actividade da CYP4A21. Por outro lado, a ausência funcional do segmento ceco-cólon, local de absorção importante de ácidos biliares livres (Schiff et al. 1972), deveria ter originado um aumento da excreção diária de ácidos biliares nos suínos sujeitos à IRA. No entanto, estes animais excretaram inesperadamente menos ácidos biliares que os intactos. Esta menor excreção de ácidos biliares poderia ter sido originada por um aumento da sua absorção intestinal ou por um decréscimo da sua síntese hepática. Não se confirmando esta última hipótese pelos dados das actividades das CYP7A1 e CYP27A1, idênticas nos animais sujeitos à IRA e nos intactos, é aceitável sugerir que o processo cirúrgico influenciou a reabsorção dos ácidos biliares. Tal influência parece ter sido modulada por alterações morfométricas na mucosa intestinal, como previamente referido por Laplace (1975) e Fuller (1991). Na realidade, os suínos sujeitos à IRA apresentaram uma maior área absorptiva na porção média-distal do intestino delgado do que os intactos (dados previamente publicados por Salgado *et al.*, 2002), local onde a reabsorção dos ácidos biliares é muito importante (Schiff *et al.*, 1972; Juste *et al.*, 1988). Esta reabsorção pode ter sido facilitada pela composição em ácidos biliares da bÍlis vesicular dos suínos sujeitos à IRA, cerca de 1,6 vezes mais rica em ácidos biliares trihidroxilados activamente reabsorvidos no intestino (Schiff *et al.*, 1972; Hofmann, 1988) e pelo menor impacto da microflora intestinal nos ácidos biliares, reduzindo a sua desconjugação e desidroxilação e facilitando assim a acção do IBAT/ASBT cuja afinidade é maior para os ácidos conjugados que para os livres (Love e Dawson, 1998; Shneider, 2001). Em consonância com a sugestão de uma reabsorção intestinal de ácidos biliares superior, a actividade total da CYP27A1 tendeu a ser menor nos animais sujeitos à IRA que nos intactos.

Como anteriormente referido, a diferença entre a entrada e eliminação de esteróis do organismo pode representar a quantidade de colesterol depositada diariamente nos tecidos (Marsh *et al.*, 1972). Levando em conta o valor calculado de ingestão diária de colesterol e os valores determinados da excreção diária total de esteróis neutros e ácidos, a taxa de biossíntese total de colesterol dos suínos utilizados neste ensaio foi mais elevada nos animais consumindo o regime E que nos consumindo o regime C. Apesar de sofrerem das mesmas limitações apontadas anteriormente, estes cálculos estão no entanto de acordo com a excreção diária de esteróis ácidos e a actividade da HMG CoA reductase hepática mais elevadas observadas nos suínos consumindo o regime à base da leguminosa. Por fim, a excreção diária total de esteróis neutros e ácidos foi cerca de 1,5 vezes mais elevada nos suínos consumindo o regime E que nos

consumindo o regime C. Este aumento na excreção diária de esteróis poderia explicar o efeito hipocolesterolémico verificado com o consumo do regime E. Na realidade, segundo valores anteriormente determinados em suínos por Férézou *et al.* (1997), para se obterem variações significativas na colesterolémia são necessários aumentos proporcionalmente mais elevados na excreção diária total dos esteróis neutros e ácidos.

A influência do regime E no metabolismo do colesterol não se confinou ao aumento da excreção diária de esteróis ácidos. De facto, os grupos consumindo o regime E apresentaram uma concentração em ácidos biliares na bÍlis cerca de 1,4 vezes superior à detectada nos grupos consumindo o regime C. Levando em consideração que os suínos foram privados de alimento cerca de 10 h antes de serem abatidos, as suas vesÍculas biliares deveriam conter a quase totalidade do “pool” dos ácidos biliares, como já observado em hamsters em jejum (Miettinen, 1973). Assim, quando calculado o “pool” vesicular dos ácidos biliares ao abate⁽³⁾, este foi 2,5 vezes maior nos suínos consumindo o regime E que nos consumindo o regime C (7 200 vs. 2 900 mg, respectivamente). Este aumento, também observado em humanos ingerindo um regime à base de leguminosas (Nervi *et al.*, 1989), terá provavelmente resultado de um aumento da absorção intestinal dos ácidos biliares nos suínos dos grupos consumindo o regime E. Assim, os grãos de ervilha foram responsáveis por um aumento da excreção diária dos ácidos biliares mas também, paradoxalmente, por um aumento da sua absorção diária. Tal paradoxo é explicado pelo facto de, nos grãos de ervilha, os componentes como os PNA serem componentes menores quando comparados com o seu conteúdo em proteína e amido resistente (Guillon e Champ, 2002). O amido resistente, tal como anteriormente observado em ratos consumindo um amido modificado resistente à digestão (Riottot e Sacquet, 1985; Meslin *et al.*, 1992), pode ter estimulado fortemente a absorção activa de ácidos biliares conjugados no íleo terminal dos suínos consumindo o regime E. Por outro lado, e tal como o sugerido para os animais sujeitos à IRA, o efeito deste componente pode ter sido facilitado pelo “pool” de ácidos biliares mais rico em ácidos trihidroxilados (hiocólico) observado nos suínos consumindo o regime E, ácidos estes sujeitos a uma reabsorção intestinal activa mais eficiente (Hofmann, 1988). O fraco impacto deste “pool” acrescido de ácidos biliares particularmente hidrófilos na síntese hepática dos esteróis ácidos, poderia estar relacionada com o facto desta ser modulada essencialmente pelos ácidos biliares hidrófobos (Kwekkeboom *et al.*, 1990b; Pandak *et al.*, 1994). A concentração em colesterol na bÍlis dos suínos consumindo o regime E foi também cerca

⁽³⁾ O “pool” vesicular dos ácidos biliares (e o do colesterol) ao abate foi calculado como o produto entre a sua concentração biliar ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e a sua massa molecular (M) ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), o qual por sua vez foi multiplicado pelo peso da bÍlis (teoricamente assumido como representando 95% do peso total da vesÍcula e seu conteúdo nos animais em jejum).

de 1,7 vezes superior à detectada nos animais consumindo o regime C. Esta concentração mais elevada sugere um aumento da secreção biliar deste esterol, como já anteriormente observado em humanos consumindo regimes à base de legumes (Nervi *et al.*, 1989; Duane, 1997). Segundo Thewles *et al.* (1993), as saponinas resultantes da hidrólise microbiana intestinal das saponinas como por exemplo a diosgenina, seriam as responsáveis por tal aumento na secreção biliar de colesterol. Este efeito levaria à diminuição dos níveis hepatocelulares de colesterol e à estimulação da síntese de receptores de LDL, contribuindo assim para a redução do colesterol plasmático transportado por esta fracção lipoproteica (Duane, 1997).

A acção da flora intestinal na composição dos esteróis neutros e ácidos parece ter sido mais influenciada pelo processo cirúrgico que pelos regimes experimentais. Ambos os regimes induziram transformações microbianas do colesterol e do β -sitosterol idênticas. Nos suínos intactos consumindo o regime C e o regime E, a fraca transformação microbiana destes esteróis (16 e 11% dos esteróis neutros totais e 32 e 24% do β -sitosterol total, respectivamente), foi provavelmente devida à mesma incapacidade da microflora transformar o elevado conteúdo em colesterol alimentar presente no lúmen intestinal observada por Marsh *et al.* (1972), Férézou *et al.* (1997) e no Ensaio Soja. Por seu lado, a ausência do segmento ceco-cólon levou à anulação quase total da transformação microbiana do colesterol e do β -sitosterol. Contrariamente ao observado com o colesterol, a transformação microbiana dos ácidos biliares foi muito eficiente nos suínos intactos consumindo o regime C (96%) e o regime E (86%). O processo cirúrgico reduziu esta transformação, não aos níveis verificados na transformação microbiana do colesterol, mas ainda assim a níveis importantes. Na realidade, os ácidos biliares secundários nos suínos sujeitos à IRA consumindo o regime C e o regime E representaram respectivamente 62 e 45% da excreção diária total de ácidos biliares e 10 e 7% dos ácidos biliares totais da bília vesicular. Estes resultados estão de acordo com os referidos por Costa *et al.* (1994) e Hakala *et al.* (1997) e com os obtidos no Ensaio Soja, sugerindo mais uma vez que a porção distal do intestino delgado destes animais estava colonizada por uma população microbiana mais eficiente a desconjugar e desidroxilar ácidos biliares do que a reduzir a molécula de colesterol.

3. EFEITOS DO CONSUMO DO REGIME TREMOÇO NO METABOLISMO DO COLESTEROL E DOS ESTERÓIS NEUTROS E ÁCIDOS DE SUÍNOS INTACTOS E COM ANASTOMOSE ÍLEO-RECTAL (ENSAIO TREMOÇO)

Durante o período experimental, os animais permaneceram em bom estado de saúde, não tendo o seu peso final e o GMD sido influenciados pelos tratamentos experimentais. A ingestão voluntária, mais elevada nos suínos consumindo o regime T que nos consumindo o regime C, não foi afectada pela concentração em alcalóides totais das sementes de tremoço utilizadas ($0,3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), inferior ao valor mínimo referido por Petterson (1998) como causando inapetência em suínos. Finalmente, os fígados obtidos nos suínos consumindo o regime T, mais leves que os dos consumindo o regime C, podem ter resultado de alterações na composição tissular hepática, como já referido por Rubio *et al.* (1999) e verificado no Ensaio Soja.

Tal como nos Ensaio Soja e Ervilha, o único parâmetro plasmático não lipídico afectado neste ensaio foi a concentração em ureia, significativamente reduzida pelo processo cirúrgico. Este facto volta a apontar o ceco-cólon como um local de produção e absorção de amónia (Conway, 1994).

Os suínos utilizados nestes Ensaio foram tornados hipercolesterolémicos pelo consumo do regime C, rico em colesterol. Confirmando tal facto, os animais que consumiram este regime apresentaram uma colesterolémia 56% mais elevada que a observada em machos em crescimento do mesmo cruzamento consumindo um regime comercial sem adição de colesterol ($2,64 \pm 0,10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e idêntica à observada em suínos consumindo um regime também à base de caseína e enriquecido em colesterol (Férézou *et al.*, 1997). Quando comparado com o do regime C, o consumo do regime T reduziu o nível de colesterol plasmático dos suínos (-24%), devido a uma diminuição substancial do colesterol transportado pelas LDL (-29%) e sem afectar a concentração do colesterol das HDL. Este efeito hipocolesterolémico foi também observado em ratos (Rahman *et al.*, 1996) e aves (Rubio *et al.*, 2003) normocolesterolémicas consumindo regimes à base de grãos de *L. angustifolius*, bem como em humanos consumindo produtos alimentares incorporando fibra da casca de *L. albus* (Bunger *et al.*, 2000). Tal como o observado no Ensaio Ervilha, a redução do colesterol das LDL provocada pelo consumo do regime T foi provavelmente modulado por um catabolismo acrescido das LDL, visto a quantidade de receptores hepáticos de LDL nestes animais ter sido cerca de 2,2 vezes superior à verificada nos suínos consumindo o regime C. Por fim, e em consonância com o acentuado decréscimo na quantidade de colesterol transportado

pelas LDL, a relação colesterol das LDL:colesterol das HDL também foi significativamente menor nos suínos consumindo o regime T que nos consumindo o regime C.

A ingestão de colesterol alimentar foi idêntica nos animais sujeitos aos diversos tratamentos experimentais. Quando expressa pela actividade da HMG CoA reductase, a biossíntese de colesterol nos suínos consumindo o regime C foi baixa e idêntica à observada em suínos consumindo um regime à base de caseína enriquecido em colesterol (Férezou *et al.*, 1997). No entanto, o consumo do regime T aumentou de forma marcada a biossíntese deste esterol, tendo a actividade da HMG CoA reductase hepática dos animais consumindo tal regime sido 16 vezes superior à verificada nos animais consumindo o regime C. Sendo conhecido o efeito retro-inibidor da absorção do colesterol alimentar na actividade da HMG CoA reductase (Rogers *et al.*, 1981; Férezou *et al.*, 1997) os suínos consumindo o regime T, enriquecido em colesterol, deveriam ter apresentado níveis de biossíntese endógena de colesterol baixos. A ausência de tal efeito retro-inibidor na biossíntese do colesterol sugere assim que a absorção intestinal deste esterol se deu a níveis menos elevados nestes suínos que nos consumindo o regime C.

Estando de acordo com tal sugestão, a excreção diária de esteróis neutros (essencialmente na forma de colesterol) foi 1,6 vezes mais elevada nos grupos experimentais consumindo o regime à base da leguminosa. Este efeito do regime foi provavelmente modulado pela ingestão de fitosteróis, 4,1 vezes mais elevada nos suínos consumindo o regime T que nos consumindo o regime C (1,72 vs. 0,42 g·d⁻¹, respectivamente). Vários estudos revistos por Wester (2000), Carr *et al.* (2002) e de Jong *et al.* (2003) demonstraram que a redução do colesterol plasmático e do colesterol das LDL em humanos e modelos animais consumindo fitosteróis se verificava a partir de 2 semanas de consumo e a doses relativamente baixas (1 a 1,5 g·d⁻¹, segundo dados revistos por Hicks e Moreau (2001)). Estes componentes bioactivos interferem com a absorção intestinal do colesterol endógeno e alimentar, de acordo com mecanismo(s) ainda não completamente elucidado(s) e que pode(m) basear-se: i) na substituição do colesterol pelos fitosteróis nas micelas mistas devido à sua hidrofobicidade mais elevada (Ikeda *et al.*, 1988a; Pakarinen *et al.*, 1996), geralmente considerado como o mecanismo mais importante (Carr *et al.*, 2002); ii) na modulação da expressão dos genes *ABCA1*, *ABCG5* e *ABCG8*, com efeitos na absorção intestinal do esterol ainda não quantificados (de Jong *et al.*, 2003; Turley e Dietschy, 2003); e/ou iii) na redução da taxa de esterificação intra-enterocitária do colesterol, diminuindo assim a quantidade deste esterol incorporado nos quilomicrons nascentes (Ikeda *et al.*, 1990). Esta inibição da absorção intestinal do colesterol, originando um menor transporte do esterol via circulação portal para o fígado, induz um aumento compensatório da síntese *de novo* e

da produção de receptores de LDL no fígado (Miettinen e Kesaniemi, 1989; Gyllin *et al.*, 1999; Moghadasian, 2000), tal como se verificou nos suínos consumindo o regime T. Apesar disso, o efeito líquido final implica uma redução no nível de colesterol plasmático (Gyllin *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2004), também observada neste estudo. Por outro lado, a actividade das enzimas-chave envolvidas na síntese hepática de ácidos biliares e a excreção fecal destes compostos não foram afectadas pelos regimes experimentais. Isto sugere que o regime T reduziu especificamente a absorção intestinal de colesterol, a qual foi suficiente para diminuir significativamente a colesterolémia. Este efeito também foi verificado em humanos sujeitos a colectomia (Miettinen *et al.*, 2000) e em hamsters (Lin *et al.*, 2004) consumindo fitosteróis e fitostanóis. A fracção solúvel dos PNA, presente em quantidades não negligenciáveis nos grãos de *L. angustifolius* (Edwards e van Barneveld, 1998), também tem sido relacionada com o aumento da excreção diária de colesterol e dos ácidos biliares por sequestração em géis (Vahouny *et al.*, 1980) bem como dos ácidos biliares por ligações químicas (Vahouny *et al.*, 1980; Soni *et al.*, 1982). Isolados proteicos de tremço branco (*L. albus*) demonstraram também capacidade de se ligar aos ácidos biliares *in vitro* (Yoshie-Stark e Wäsche, 2004). Estes componentes bioactivos poderiam pois ter desempenhado um papel na modulação da excreção diária de esteróis neutros nos animais consumindo o regime T. No entanto, o seu efeito através da complexação dos ácidos biliares esteve ausente neste estudo, onde a excreção diária dos ácidos biliares não foi afectada pelos regimes alimentares. Por fim, ao contrário do que seria de esperar em animais sem o segmento ceco-cólon, onde se dá uma importante absorção de ácidos biliares livres (Schiff *et al.* 1972), a excreção diária dos ácidos biliares foi 3,1 vezes inferior nos animais sujeitos à IRA que nos intactos. Tal como no Ensaio Ervilha, esta redução na excreção de ácidos biliares poderia ter sido originada por um aumento da sua absorção intestinal através de alterações morfométricas da mucosa intestinal induzidas pelo processo cirúrgico (Laplace, 1975; Fuller, 1991). De facto, os suínos sujeitos à IRA apresentaram uma maior área absorptiva na porção média-distal do intestino delgado que os intactos (dados previamente publicados por Salgado *et al.*, 2002), local onde a reabsorção dos ácidos biliares é muito importante (Schiff *et al.*, 1972; Juste *et al.*, 1988). Esta reabsorção pode ter sido facilitada por mecanismos em tudo idênticos aos sugeridos no Ensaio Ervilha: composição da bília vesicular dos suínos sujeitos à IRA cerca de 1,5 vezes mais rica em ácido hiocólico, um ácido biliar trihidroxilado activamente reabsorvido no intestino (Hofmann, 1988), e menor desconjugação dos ácidos biliares pela microflora intestinal, facilitando assim a acção do IBAT/ASBT (Love e Dawson, 1998; Shneider, 2001). Por outro lado, o conteúdo em ácidos biliares hidrófobos, 1,2 vezes mais elevado nos animais sujeitos à IRA que nos intactos, apesar de não ter atingido significado estatístico, pode ter modulado a menor

actividade da CYP27A1 observada nos primeiros. A redução da actividade desta enzima não foi no entanto acompanhada por uma redução semelhante da actividade da CYP7A1. A regulação transcricional desta última tem sido referida como mais influenciada pelos ácidos hidrófobos (ligandos dos receptores nucleares) que a da CYP27A1 nos ensaios realizados em roedores (Vlahčević *et al.*, 1996; Souidi *et al.*, 1999; Goodwin e Kliewer, 2002). Tal não parece ter sido o caso nos suínos sujeitos às nossas condições experimentais. De facto, tanto os dados do Ensaio Ervilha como os deste, apontam para um efeito mais marcado ao nível da actividade da CYP27A1 que da CYP7A1 suína. Nesta espécie animal, onde os processos de transcrição destas enzimas e a sua modulação não foram ainda totalmente esclarecidos, os dados obtidos parecem sugerir que a regulação da transcrição da CYP27A1 poderá não ser realizada da mesma maneira que nos roedores. Por outro lado, não é de excluir a intervenção de um composto que iniba especificamente a actividade da CYP27A1 ou dos seus factores de transcrição, que não esteja presente nos animais intactos e/ou tenha sido absorvido mais eficientemente nos animais sujeitos à IRA (via alterações morfométricas na mucosa intestinal).

Em termos de balanço dos esteróis e levando em conta o valor calculado de ingestão diária de colesterol e os valores determinados da excreção de esteróis, chega-se à conclusão de que a taxa de biossíntese total de colesterol dos suínos utilizados neste ensaio foi mais elevada nos animais consumindo o regime T que nos consumindo o regime C. Apesar de deverem ser considerados à luz das limitações já anteriormente enunciadas, estes resultados estão de acordo com a maior excreção de esteróis neutros e com as actividades mais elevada da HMG CoA reductase hepática observadas nos suínos consumindo o regime à base da leguminosa. A excreção diária total de esteróis neutros e ácidos, cerca de 1,6 vezes mais elevada nos suínos consumindo o regime T que nos consumindo o regime C, poderia assim explicar o efeito hipocolesterolémico obtido com o consumo do regime à base da leguminosa. Segundo Férézou *et al.* (1997), aumentos proporcionalmente mais elevados na excreção diária dos esteróis neutros e ácidos estão relacionados com reduções significativas na colesterolémia.

A concentração em lípidos e ácidos biliares da bÍlis vesicular não foi significativamente afectada por nenhum dos tratamentos. Este facto sugere que o efeito hipocolesterolémico observado nos suínos consumindo regime T não resultou de um aumento significativo da eliminação de colesterol (ou de ácidos biliares) via incorporação na bÍlis e aponta para uma eliminação deste esteroI sem a sua conversão prévia em ácidos biliares. No entanto, e apesar da concentração biliar em colesterol, fosfolípidos e ácidos biliares totais não ter sido afectada pelos regimes experimentais, o índice litogénico calculado segundo Carey (1978) foi 1,6 vezes inferior nos suínos consumindo o

regime T que nos consumindo o regime C. Tal diminuição poderá ter sido devida a diferenças qualitativas nos lípidos biliares e na sua hidrofobicidade (Juste *et al.*, 1997). De facto, os ácidos biliares hidrófilos como o hiocólico, inibem a cristalização do colesterol biliar (Juste *et al.*, 1995). Apesar de não muito importante numa espécie como a suína, naturalmente protegida contra a colelitíase por elevadas proporções de ácidos biliares hidrófilos na bília (Legrand-Defretin *et al.*, 1991), esta modulação pelo regime alimentar do índice litogénico é um tópico de interesse para outras espécies com uma bília mais hidrófoba, como o Homem.

A transformação microbiana do colesterol e β -sitosterol, quando determinada nas fezes, não foi afectada pelos regimes experimentais. Tal como nos Ensaios Soja e Ervilha, e provavelmente pelas mesmas razões, esta transformação foi pequena nos animais intactos (13 e 15% dos esteróis neutros totais e 27 e 28% do β -sitosterol total, respectivamente nos suínos intactos consumindo o regime C e o regime T) e foi quase por completo anulada pelo processo cirúrgico. A transformação microbiana dos ácidos biliares não absorvidos, contrariamente ao verificado para a dos esteróis neutros, foi muito eficiente nos suínos intactos consumindo os regimes C e T (98 e 92%, respectivamente). Nos animais sujeitos à IRA, a excreção diária de ácidos biliares secundários foi reduzida, mas não a níveis tão importantes como os verificados na transformação microbiana do colesterol. A excreção destes ácidos representou 53 e 66% do total de ácidos biliares excretados e 10 e 9% dos ácidos biliares da bília dos animais ingerindo os regimes C e T, respectivamente. Estes resultados, semelhantes aos verificados nos Ensaios Soja e Ervilha, tinham sido previamente observados por Costa *et al.* (1994) e Hakala *et al.* (1997). A excreção de ácidos biliares secundários nos animais sujeitos à IRA, quando comparada com a dos animais intactos, sugere assim uma colonização da porção distal do seu intestino delgado por uma população microbiana mais eficiente a desconjugar e desidroxilar ácidos biliares do que a reduzir o colesterol.

4. DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

Ao longo deste trabalho ficou evidente que o suíno é um bom modelo animal para o estudo da hiperlipémia do tipo II ou hipercolesterolemia, reproduzindo a sua principal causa – um nível elevado do colesterol transportado pela fracção lipoproteica LDL, induzido pelo consumo de um regime hipercolesterolémico.

A utilização de três espécies diferentes de leguminosas na alimentação de suínos em crescimento durante 3 semanas não foi unânime na diminuição dos níveis de colesterol

plasmático destes animais tornados hipercolesterolémicos pelo regime. De facto, notou-se uma ausência inesperada de tais efeitos no Ensaio Soja, onde a leguminosa consumida foi sujeita a tratamentos térmicos e de pressão com vista à eliminação de factores antitripsínicos. Por outro lado, quando presente, o efeito hipocolesterolémico resultou de uma redução específica no colesterol das LDL, resultante de um metabolismo acelerado destas lipoproteínas. Os mecanismos responsáveis por este efeito foram diferentes consoante a leguminosa consumida. Assim, no Ensaio Ervilha, a redução do colesterol plasmático nos suínos esteve associada a: i) uma (re)absorção intestinal de ácidos biliares mais baixa, modulada por componentes bioactivos da ervilha tais como os PNA solúveis, o amido resistente e as saponinas; e ii) um “pool” biliar acrescido em colesterol e ácidos biliares hidrófilos. No Ensaio Tremoço, o efeito hipocolesterolémico verificado foi relacionado com uma menor absorção intestinal de esteróis neutros, modulada pela acção dos fitosteróis presentes no regime T. A existência destes diferentes mecanismos hipocolesterolémicos é o resultado de uma composição muito complexa e rica em vários componentes bioactivos dos grãos de leguminosas.

Apesar dos diferentes mecanismos que intervieram na modulação do metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos, um esteve sempre associado ao efeito no colesterol plasmático dos regimes à base de leguminosas: a diminuição significativa na absorção diária dos esteróis totais. Assim, quando não se registou tal diminuição entre o regime C e o regime à base da leguminosa (Ensaio Soja), o colesterol plasmático não baixou. No entanto, quando tal diminuição foi observada (Ensaio Ervilha e Tremoço), independentemente da forma como foi obtido (diminuição da absorção de esteróis ácidos e neutros, respectivamente), o nível de colesterol plasmático dos suínos consumindo os regimes à base da leguminosa baixou. Tais observações indicam que uma menor absorção intestinal dos esteróis neutros e ácidos, resultando num aumento da excreção diária total de tais compostos, desempenhou o principal papel modulador do efeito hipocolesterolémico das leguminosas ou, senão o principal, pelo menos essencial à redução da colesterolémia.

Os resultados destes ensaios permitiram também obter dados que questionam a modulação do metabolismo do colesterol por certos componentes das leguminosas. A relação lisina:arginina foi considerada crítica na determinação do efeito hipocolesterolémico das leguminosas (Kritchevsky, 1979). No entanto, nas nossas condições experimentais, o regime S não apresentou o mesmo efeito hipocolesterolémico que o obtido com o regime T, apesar das suas relações lisina:arginina terem sido semelhantes (1,16 e 1,15, respectivamente). Por outro lado, o regime E, com a relação lisina:arginina mais elevada (1,23) deveria, à luz desta hipótese, ter sido o regime menos eficiente a baixar os níveis de colesterol plasmático, facto que não foi observado. Assim,

estes dados não parecem estar de acordo com a hipótese moduladora da relação lisina:arginina no metabolismo do colesterol. Por fim, a correlação positiva estabelecida entre a concentração em metionina e os efeitos hipercolesterolémicos (Morita *et al.*, 1997), também não foi verificada nestes ensaios. De facto, os regimes à base de leguminosas mais ricos neste aminoácido (regime E e regime T, respectivamente com 4,9 e 5,2 g·kg⁻¹) apresentaram um efeito hipocolesterolémico significativo em relação ao regime SE (3,5 g·kg⁻¹ de metionina) e ao regime C (com uma média de 5,5 g·kg⁻¹ nos três Ensaios). Estas observações confirmam as de Kim *et al.* (1978) em suínos e de Kern *et al.* (2002) em ratos, os quais também não validaram a correlação mencionada por Morita *et al.* (1997). No entanto e apesar de tal metodologia também ter sido aplicada pelos autores citados, não podemos deixar de referir que estas sugestões se baseiam em variações da composição em aminoácidos dos regimes alimentares e não no plasma, com todas as limitações inerentes ao facto (ver 6.2.3.).

Outra hipótese que pode ser posta em causa pelos presentes resultados envolve o efeito inibitório do ácido propiónico na biossíntese do colesterol (Thacker *et al.*, 1981; Chen *et al.*, 1984). Se este AGV, obtido pela fermentação intestinal da fracção solúvel dos PNA e absorvido no segmento ceco-cólon estivesse implicado na inibição da actividade da HMG CoA reductase hepática nesta espécie animal, a actividade desta enzima nos suínos sujeitos à IRA deveria ter sido superior à registada nos animais intactos. Tal facto não se verificou em nenhum dos Ensaios, pelo que se pode sugerir, de acordo com os resultados obtidos por Ahrens *et al.* (1986), Illman *et al.* (1988) e Beaulieu e McBurney (1992), que a modulação *in vivo* da biossíntese hepática do colesterol pelo ácido propiónico não se verifica na espécie suína.

A ausência de um efeito hipocolesterolémico nos animais sujeitos à IRA, independentemente dos regimes consumidos, indica que, nas nossas condições experimentais, o intestino grosso não desempenhou um papel determinante na regulação do metabolismo do colesterol. O facto desta porção do intestino intervir a um nível menos importante que o do intestino delgado nos processos absorptivos, justifica tal observação. A ausência do segmento ceco-cólon contribuiu no entanto para a redução da transformação microbiana dos esteróis neutros e ácidos em todos os Ensaios, mas só a soja extrudida foi capaz de reduzir a transformação microbiana dos esteróis ao mesmo tempo que contribuía significativamente para a redução da hidrofobicidade dos ácidos biliares da biliar vesicular. Esta observação pode ser importante para a prevenção de doenças intestinais. A adição de um factor dietético a um tratamento cirúrgico para reduzir mais eficientemente moléculas potencialmente deletérias como os esteróis citotóxicos, merece ser futuramente investigada. Por fim, é de referir que nos Ensaios Ervilha e Tremoço, o processo cirúrgico desencadeou um efeito de crescimento

compensatório no intestino delgado e reduziu a excreção diária de ácidos biliares, independentemente dos regimes consumidos. Esta circunstância, mesmo quando em conjunto com a redução na transformação microbiana dos esteróis neutros e ácidos detectada, não alterou as consequências induzidas pelo consumo dos regimes E e T na colesterolémia. No entanto, ela deverá ser levada em conta em futuras investigações, nomeadamente em humanos ou modelos animais cujo “pool” de ácidos biliares vesiculares seja mais hidrófobo que o dos suínos. A ausência de um papel determinante do intestino grosso no metabolismo do colesterol foi observada pela primeira vez, de forma sistemática e utilizando regimes experimentais com base em três leguminosas diferentes, no suíno, considerado como um bom modelo animal para humanos.

As análises realizadas neste trabalho proporcionaram uma visão englobante do metabolismo do colesterol e dos esteróis neutros e ácidos de suínos hipercolesterolémicos, assim como permitiram teorizar sobre o balanço dos esteróis neste modelo animal. No entanto, e considerando estudos futuros, não devemos deixar de recomendar a determinação dos níveis de SR-BI e de receptores nucleares e transportadores membranares recentemente implicados neste metabolismo (nomeadamente os ABCA1, ABCG5 e ABCG8) em tecidos-chave como o entérico e o hepático, bem como o doseamento do colesterol nos vários tecidos corporais.

Estudos futuros referentes aos componentes bioactivos dos grãos de leguminosas e à sua eficácia na redução do colesterol plasmático são também necessários para confirmar a sua importância relativa e os factores específicos envolvidos. Os fitosteróis, mas também os PNA solúveis e o amido resistente das leguminosas, são componentes particularmente promissores como moduladores do efeito hipocolesterolémico e portanto com um elevado potencial para serem incorporados em alimentos industrialmente transformados para consumo humano. À luz do que foi verificado no Ensaio Soja, serão também de avaliar as consequências nas potencialidades hipocolesterolémicas das leguminosas de vários tratamentos tecnológicos como a extrusão ou a conserva, comumente utilizados na Indústria Alimentar, nomeadamente em pratos pré-cozinhados para humanos (Belitz e Grosch, 1999). Por outro lado, o consumo de leguminosas hipocolesterolémicas por suínos poderá apresentar efeitos benéficos indirectos na Saúde Pública, uma vez que se estará a contribuir para a obtenção de carcaças, carne e produtos transformados menos ricos em colesterol para consumo humano. Por fim, se integrados no regime alimentar humano, os grãos de ervilha e de tremço de folhas estreitas apresentam um elevado potencial profiláctico (ou mesmo terapêutico) no combate à hiperlipidémia do tipo II ou hipercolesterolémia e portanto às doenças

cardiovasculares. De facto, Law *et al.* (1994) referem que um decréscimo de 10% no colesterol plasmático de humanos reduz o risco de doença cardiovascular entre 19 e 54%, em função da idade. O regime alimentar Mediterrânico, tradicionalmente constituído por quantidades elevadas de grãos, frutos, vegetais (incluindo leguminosas), peixe e azeite, para além de quantidades restritas de ácidos gordos saturados e *trans*, sai assim valorizado no que respeita aos efeitos protectores em relação a estas doenças.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Abadie, C.; M. Hug; C. Kubli; N. Gains (1994). Effect of cyclodextrins and undigested starch on the loss of chenodeoxycholate in the faeces. *Biochemical Journal*, **299**, 725 – 730.
- Acton, S.L.; K.F. Kozarsky; A. Rigotti (1999). The HDL receptor SR-BI: a new therapeutic target for atherosclerosis? *Molecular Medicine Today*, **5**, 518 – 524.
- Acton, S.; A. Rigotti; K.T. Landschultz; S. Xu; H.H. Hobbs; M. Krieger (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a HDL lipoprotein receptor. *Science*, **271**, 518 – 520.
- Acton, S.; P.E. Scherer; H.F. Lodish; M. Krieger (1994). Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **33**, 21003 – 21009.
- Agellon, L.B.; S.K. Cheema (1997). The 3'-untranslated region of the mouse cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA contains elements responsive to post-transcriptional regulation by bile acids. *Biochemical Journal*, **328**, 393 – 399.
- Ahlberg, J.; B. Angelin; I. Björkhem; K. Einarsson; J.A. Gustafsson; J. Rafter (1980). Effects of treatment with chenodeoxycholic acid on liver microsomal metabolism of steroids in man. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **95**, 188 – 194.
- Ahrens, F.; H. Hagemeister; M. Pfeuffer; C.A. Barth (1986). Effects of oral and intracecal pectin administration on blood lipids in minipigs. *Journal of Nutrition*, **116**, 70 – 76.
- Ahrens, F.; M. Pfeuffer; H. Hagemeister; C.A. Barth (1991). The hypocholesterolemic effect of guar gum depends on dietary sucrose. Studies in minipigs. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, **30**, 109 – 117.
- Aigueperse, J. (1979). *Le système cholestérol du porc*. Thèse d'Etat, Centre Orsay, Université Paris-Sud.
- Aigueperse, J.; F. Chevallier (1982). *In vivo* study of cholesterol turnover in tissues of adult sows. *Biochimie*, **64**, 185 – 193.
- Aigueperse, J.; J. Férézou; F. Chevallier (1983). Cholesterol turnover in swine plasma lipoproteins. *Biochimie*, **65**, 275 – 281.
- Aigueperse, J.; C. Lutton; F. Chevallier (1981). Identification and origins of neutral fecal sterols in adult Large White sows: occurrence of externally-secreted intestinal cholesterol. *Reproduction, Nutrition, Development*, **21**, 545 – 554.
- Allotta, E.C.; S. Samman; D.C. Roberts (1985). The importance of the non-protein components of the diet in the plasma cholesterol response of rabbits to casein. *British Journal of Nutrition*, **54**, 87 – 94.
- Alonso, R.; G. Grant; F. Marzo (2001). Thermal treatment improves nutritional quality of pea seeds (*Pisum sativum* L.) without reducing their hypocholesterolemic properties. *Nutrition Research*, **21**, 1067 – 1077.
- Altmann, S.W.; H.R. Davis Jr; X. Yao; M. Lavery; D.S. Compton; L.J. Zhu; J.H. Crona; M.A. Caplen; L.M. Hoos; G. Tetzloff; T. Priestley; D.A. Burnett; C.D. Strader; M.P. Graziano (2002). The identification of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) by expression cloning and its role in cholesterol absorption. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1580**, 77 – 93.
- Amdur, B.H.; H. Rilling; K. Bloch (1957). The enzymatic conversion of mevalonic acid to squalene. *Journal of the American Chemical Society*, **79**, 2646 – 2647.
- Ananthanarayanan, M.; N. Balasubramanian; M. Makishima; D.J. Mangelsdorf; F.J. Suchy (2001). Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 28857 – 28865.

- Andersen, J.M.; F.O. Nervi; J.M. Dietschy (1977). Rate constants for the uptake of cholesterol from various intestinal and serum lipoprotein fractions by the liver of the rat *in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **486**, 298 – 307.
- Anderson, J.W.; N.J. Gustafson; D.B. Spencer; J. Tietyen; C.A. Bryant (1990). Serum lipid response of hypercholesterolemic men to single and divided doses of canned beans. *American Journal of Clinical Nutrition*, **51**, 1013 – 1019.
- Anderson, J.W.; A.E. Jones; S. Riddell-Mason (1994). Ten different dietary fibers have significantly different effects on serum and liver lipids of cholesterol-fed rats. *Journal of Nutrition*, **124**, 78 – 83.
- Anderson, J.W.; A.W. Major (2002). Pulses and lipaemia, short- and long-term effect: potential in the prevention of cardiovascular disease. *British Journal of Nutrition*, **88**, s263 – s271.
- Anderson, J.W.; L. Story; B. Sieling; W.J. Chen (1984a). Hypocholesterolaemic effects of high-fibre diets rich in water-soluble plant fibres. *Journal of the Canadian Dietetic Association*, **45**, 140 – 148.
- Anderson, J.W.; L. Story; B. Sieling; W.J. Chen; M.S. Petro; J. Story (1984b). Hypocholesterolemic effects of oat-bran or bean intake for hypercholesterolemic men. *American Journal of Clinical Nutrition*, **40**, 1146 – 1155.
- Anderson, R.L.; W.J. Wolf (1995). Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *Journal of Nutrition*, **125**, 581S – 588S.
- Andrieux, C.; D. Gadelle; C. Leprince; E. Sacquet (1989). Effects of some poorly digestible carbohydrates on bile acid bacterial transformations in the rat. *British Journal of Nutrition*, **62**, 103 – 119.
- Angel, A; G.A. Bray (1979). Synthesis of fatty acids and cholesterol by liver, adipose tissue and intestinal mucosa from obese and control patients. *European Journal of Clinical Investigation*, **9**, 355 – 362.
- AOAC (2000). *Official methods of analysis of AOAC International*. (Editado por Horwitz, W.) Association of Official Analytical Chemists (17th Edition), Arlington, USA.
- AOCS (1983). Trypsin inhibitor activity. Official method Ba 12-75. In: *Official and tentative methods of the American Oil Chemists Society*. Washington, DC, USA.
- Armstrong, T.A.; J.W. Spears; T.E. Engle; M.T. See (2001). Effect of pharmacological concentrations of dietary copper on lipid and cholesterol metabolism in pigs. *Nutrition Research*, **21**, 1299 – 1308.
- Atger, V.M.; M. de la Llera-Moya; G.W. Stoudt; W.V. Rodriguez; M.C. Phillips; G.H. Rothblat (1997). Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. *Journal of Clinical Investigation*, **99**, 773 – 780.
- Attie, A.D.; R.C. Pittman; D. Steinberg (1982). Hepatic catabolism of low density lipoprotein: mechanisms and metabolic consequences. *Hepatology*, **2**, 269 – 281.
- Audas, O.; M. Soudi; F. Milliat; M. Combettes-Souverain; J. Férézou; C. Lutton (1999). Variations circadiennes de l'activité d'enzymes clé de la biosynthèse du cholestérol et des acides biliaires chez le Hamster. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **13**, 48s.
- Avigan, J.; D. Steinberg (1958). Effects of saturated and unsaturated fat on cholesterol metabolism in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **97**, 814 – 816.
- Axelson, M.; J. Shoda; J. Sjovall; A. Toll A; K. Wikvall (1992). Cholesterol is converted to 7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid in liver mitochondria. Evidence for a mitochondrial sterol 7 α -hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 1701 – 1704.
- Azuma, J.; N. Kashimura; T. Komano (1975). Studies on pig serum lipoproteins. I. Separation and properties of low-density lipoproteins. *Journal of Biochemistry*, **77**, 1185 – 1192.

- Bachorik, P.S.; F.A. Franklin Jr.; D.G. Virgil; P.O. Kwiterovich Jr. (1982). High-affinity uptake and degradation of apolipoprotein E free high-density lipoprotein and low-density lipoprotein in cultured porcine hepatocytes. *Biochemistry*, **21**, 5675 – 5684.
- Bachorik, P.S.; F.A. Franklin Jr.; D.G. Virgil; P.O. Kwiterovich Jr. (1985). Reversible high affinity uptake of apo E-free high density lipoproteins in cultured pig hepatocytes. *Arteriosclerosis*, **5**, 142 – 152.
- Bachorik, P.S.; J.N. Livingston; J. Cooke; P.O. Kwiterovich Jr. (1976). The binding of low density lipoprotein by liver membranes in the pig. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **69**, 927 – 935.
- Bailey, J.M.; J. Butler (1973). Cholesterol uptake from doubly-labeled α lipoproteins by cells in tissue culture. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **159**, 580 – 581.
- Balasubramaniam, S.; K.A. Mitropoulos; S. Venkatesan (1978). Rat-liver acyl- CoA:cholesterol acyltransferase. *European Journal of Biochemistry*, **90**, 377 – 383.
- Balasubramaniam, S.; L.A. Simons; S. Chang; J.B. Hickie (1985). Reduction in plasma cholesterol and increase in biliary cholesterol by a diet rich in *n*-3 fatty acids in the rat. *Journal of Lipid Research*, **26**, 684 – 689.
- Balmir, F.; R. Staack; E. Jeffrey; M.D. Jimenez; L. Wang; S.M. Potter (1996). An extract of soy flour influences serum cholesterol and thyroid hormones in rats and hamsters. *Journal of Nutrition*, **126**, 3046 – 3053.
- Bamberger, M.; J.M. Glick; G.H. Rothblat (1983). Hepatic lipase stimulates the uptake of high density lipoprotein cholesterol by hepatoma cells. *Journal of Lipid Research*, **24**, 869 – 876.
- Bannon, C.D.; J.D. Craske; A.E. Hilliker (1985). Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. IV. Fats with fatty acids containing four or more carbon atoms. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **62**, 1501 – 1507.
- Barker, W.C.; M.O. Dayhoff (1977). Evolution of lipoproteins deduced from protein sequence data. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, **57**, 309 – 315.
- Barter, P.J.; Y.C. Ha; G.D. Calvert (1981). Studies of esterified cholesterol in sub-fractions of plasma high density lipoproteins. *Atherosclerosis*, **38**, 165 – 175.
- Beaulieu, K.E.; M.I. McBurney (1992). Changes in pig serum lipids, nutrient digestibility and sterol excretion during cecal infusion of propionate. *Journal of Nutrition*, **122**, 241 – 245.
- Behr, W.T.; G.D. Baker; W.L. Anthony (1960). Effects of bile acids on fecal excretion of end products of cholesterol metabolism. *American Journal of Physiology*, **199**, 736 – 740.
- Belitz, H.-D.; W. Grosch (1999). *Food chemistry*. Springer (2nd Edition), Berlin.
- Bell, F.P. (1975). Cholesterol exchange between microsomal, mitochondrial and erythrocyte membranes and its enhancement by cytosol. *Biochimica et Biophysica Acta*, **398**, 18 – 27.
- Bell, F.P. (1978). Lipid exchange and transfer between biological lipid-protein structures. *Progress in Lipid Research*, **17**, 207 – 243.
- Bell, F.P.; J.B. Somer; I.H. Craig; C.J. Schwartz (1972). Membrane-lipid exchange: exchange of cholesterol between porcine serum lipoproteins and erythrocytes. *Pathology*, **4**, 205 – 214.
- Belleville, J. (2002). Hypocholesterolemic effect of soy protein. *Nutrition*, **18**, 684 – 686.
- Berge, K.E.; H. Tian; G.A. Graf; L. Yu; N.V. Grishin; J. Schultz; P. Kwiterovich; B. Shan; R. Barnes; H.H. Hobbs (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*, **290**, 1771 – 1775.
- Bergman, T.; H. Postlind (1991). Characterization of mitochondrial cytochromes P-450 from pig kidney and liver catalysing 26-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃ and C₂₇ steroids. *Biochemical Journal*, **276**, 427 – 432.
- Bergström, S. (1952). The formation of bile acids from cholesterol in the rat. *Kungliga Fysiografiska Sällskapetets Förhandlingar*, **22**, 1 – 15.

- Berlin, E.; M.A. Khan; G.R. Henderson; P.G. Kliman (1985). Influence of age and sex on composition and lipid fluidity in miniature swine plasma lipoproteins. *Atherosclerosis*, **54**, 187 – 203.
- Beynen, A.C.; C.E. West; C.J.K. Spaaij; J. Huisman; P.V. Leeuwen; J.B. Schutte; W.H.L. Hackeng (1990). Cholesterol metabolism, digestion rates and postprandial changes in serum of swine fed purified diets containing either casein or soybean protein. *Journal of Nutrition*, **120**, 422 – 430.
- Bingwen, L.; W. Zhaofeng; L. Wanzhen; Z. Rongjue (1981). Effects of bean meal on serum cholesterol and triglycerides. *Chinese Medical Journal*, **94**, 455 – 458.
- Birk, Y.; I. Peri (1980). Saponins. In: *Toxic constituents of plant foodstuffs*. (Editado por Leiner, I.E.) Academic Press (2nd Edition), London, 161 – 182.
- Björkhem, I.; H. Danielsson; J. Gustafsson (1973). On the effect of thyroid hormone on 26-hydroxylation of C₂₇-steroids in rat liver. *FEBS Letters*, **31**, 20 – 22.
- Björkhem, I.; U. Diczfalusy; D. Lutjohann (1999). Removal of cholesterol from extrahepatic sources by oxidative mechanisms. *Current Opinion in Lipidology*, **10**, 161 – 165.
- Blackburn, N.A.; J.S. Redfern; H. Jarjis; A.M. Holgate; I. Hanning; J.H. Scarpello; I.T. Johnson; N.W. Read (1984). The mechanism of action of guar gum in improving glucose tolerance in man. *Clinical Science*, **66**, 329 – 336.
- Blanchette-Mackie, E.J. (2000). Intracellular cholesterol trafficking: role of the NPC1 protein. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1486**, 171 – 183.
- Bloch, K. (1954). Biological synthesis of cholesterol. In: *Harvey lectures*, Volume 48. Academic Press, New York, 68 – 88.
- Bloch, K.; B.N. Berg; D. Rittenberg (1943). The biological conversion of cholesterol to cholic acid. *Journal of Biological Chemistry*, **149**, 511 – 517.
- Bloch, K.; D. Rittenberg (1942). On the utilization of acetic acid for cholesterol formation. *Journal of Biological Chemistry*, **145**, 625 – 636.
- Boberg, J.; I.B. Gustafsson; B. Karlstrom; H. Lithell; B. Vessby; I. Werner (1981). Treatment of hyperlipoproteinemia with 'type-specific' diets under metabolic ward conditions. Effects on serum lipoproteins and serum lipid esters. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **25**, 320 – 333.
- Bojesen, E. (1982). Diversity of cholesterol exchange explained by dissolution into water. *Nature*, **299**, 276 – 278.
- Borensztajn, J. (1979). Lipoprotein lipase. In: *Biochemistry of atherosclerosis*. (Editado por Scanu, A.M.) M. Dekker, Inc., New York, 231 – 245.
- Borja, C.R.; C.R. Treadwell; G.V. Vahouny (1964). Role of bile and pancreatic juice in cholesterol absorption and esterification. *American Journal of Physiology*, **206**, 223 – 228.
- Borst, P.; R.O. Elferink (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual Review of Biochemistry*, **71**, 537 – 592.
- Borst, P.; N. Zelcer; A. van Helvoort (2000). ABC transporters in lipid transport. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1486**, 128 – 144.
- Brendel, C.; J.C. Fruchart; J. Auwerx; K. Schoonjans (1999). Régulation transcriptionnelle du métabolisme du cholestérol. *Médecine et Sciences*, **15**, 56 – 62.
- Brown, D.A.; E. London (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **14**, 111 – 136.
- Brown, M.S.; J.L. Goldstein (1976). Receptor mediated control of cholesterol metabolism. *Science*, **191**, 150 – 154.
- Brown, M.S.; J.L. Goldstein (1983). Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry*, **52**, 223 – 261.

- Brown, M.S.; J.L. Goldstein (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **96**, 11041 – 11048.
- Brown, M.S.; P.T. Kovanen; J.L. Goldstein (1979). Receptor-mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. *Recent Progress in Hormone Research*, **35**, 215 – 257.
- Bruckdorfer, K.R.; J.M. Graham (1976). The exchange of cholesterol and phospholipids between cell membranes and lipoproteins. In: *Biological membranes*. (Editado por Chapman, D.) Academic Press, London, 103 – 152.
- Bruckert, E. (1997). *Atlas de l'athérosclérose*. Actualités-Innovations-Médecine, SARL, Nanterre, France.
- Bucher, N.L.; P. Overath; F. Lynen (1960). β -Hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A reductase, cleavage and condensing enzymes in relation to cholesterol formation in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, **40**, 491 – 501.
- Buhman, K.F.; M. Accad; R.V. Farese Jr. (2000). Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1529**, 142 – 154.
- Bunger, A.; D. Soto; E. Wittig; L. Cariaga; N. Hernández (2000). Development of food products containing lupin fiber and their effects in elderly people. In: *Lupin, an ancient crop for the new millennium: Proceedings of the 9th International Lupin Conference*. (Editado por Van Santen, E.; M. Wink; S. Weissmann; P. Romer) International Lupin Association, Canterbury, New Zealand, 438 – 439.
- Burkitt, D.P. (1971). Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer*, **28**, 3 – 13.
- Bush, R.S.; L.P. Milligan (1971). Study of mechanism of inhibition of ketogenesis by propionate in bovine liver. *Canadian Journal of Animal Science*, **51**, 121 – 127.
- Calvert, G.D.; P.J. Scott (1975). Properties of two pig low density lipoproteins prepared by zonal ultracentrifugation. *Atherosclerosis*, **22**, 583 – 599.
- Calvert, G.D.; P.J. Scott; D.N. Sharpe (1975). The plasma and tissue turnover and distribution of two radio-iodine-labelled pig plasma low density lipoproteins. *Atherosclerosis*, **22**, 601 – 628.
- Calvo, D.; D. Gómez-Coronado; M.A. Lasunción; M.A. Vega (1997). CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **17**, 2341 – 2349.
- Canibe, N.; K.E.B. Knudsen (1997). Digestibility of dried and toasted peas in pigs. 1. Ileal and total tract digestibilities of carbohydrates. *Animal Feed Science and Technology*, **64**, 293 – 310.
- Carew, T.E.; R.P. Saik; K.H. Johansen; C.A. Dennis; D. Steinberg (1976). Low density and high density lipoprotein turnover following portacaval shunt in swine. *Journal of Lipid Research*, **17**, 441 – 450.
- Carey, M.C. (1978). Critical tables for calculating the cholesterol saturation of native bile. *Journal of Lipid Research*, **19**, 945 – 956.
- Carr, T.P.; R.M. Cornelison; B.J. Illston; C.L. Stuefer-Powell; D.D. Gallaher (2002). Plant sterols alter bile acid metabolism and reduce cholesterol absorption in hamsters fed a beef-based diet. *Nutrition Research*, **22**, 745 – 754.
- Carroll, K.K.; R.M. Hamilton; G.K. MacLeod (1973). Plasma cholesterol levels in suckling and weaned calves, lambs, pigs, and colts. *Lipids*, **8**, 635 – 640.
- Carroll, K.K.; E.M. Kurowska (1995). Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. *Journal of Nutrition*, **125**, 594S – 597S.
- Cases, S.; S. Novak; Y.W. Zheng; H.M. Myers; S.R. Lear; E. Sande; C.B. Welch; A.J. Lusis; T.A. Spencer; B.R. Krause; S.K. Erickson; R.V. Farese Jr. (1998). ACAT-2, a second mammalian

- acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. Its cloning, expression, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 26755 – 26764.
- Catala, I.; C. Juste; N. Boehler; J. Férézou; M. Andre; M. Riottot; C. Lutton; H. Lafont; F. Bornet; T. Corring (2000). Cholesterol crystallization in gall-bladder bile of pigs given cholesterol- β -cyclodextrin-enriched diets with either casein or soyabean concentrate as protein sources. *British Journal of Nutrition*, **83**, 411 – 420.
- Chajek, T.; C.J. Fielding (1978). Isolation and characterization of a human serum cholesteryl ester transfer protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **75**, 3445 – 3449.
- Champ, M.M. (2002) Non-nutrient bioactive substances of pulses. *British Journal of Nutrition*, **88**, s307 – s319.
- Chang, T.Y.; G.M. Doolittle (1983). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. In: *The Enzymes*, volume 16. (Editado por Boyer, P.D.) Academic Press (3rd edition), 523 – 539.
- Chapman, M.J. (1980). Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects. *Journal of Lipid Research*, **21**, 789 – 853.
- Chapman, M.J. (1982). Les lipoprotéines et le foie. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, **6**, 482 – 499.
- Chapman, M.J. (1986). Comparative analysis of mammalian plasma lipoproteins. *Methods in Enzymology*, **128**, 70 – 143.
- Chapman, M.J.; P. Forgez (1985). Lipid transport systems: some recent aspects in swine, cattle and trout during development. *Reproduction, Nutrition, Development*, **25**, 217 – 226.
- Chapman, M.J.; S. Goldstein (1976). Comparison of the serum low density lipoprotein and of its apoprotein in the pig, rhesus monkey and baboon with that in man. *Atherosclerosis*, **25**, 267 – 291.
- Chaykin, S.; J. Law; A.H. Phillips; T.T. Tchen; K. Bloch (1958). Phosphorylated intermediates in the synthesis of squalene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **44**, 998 – 1004.
- Chen, W.J.; J.W. Anderson (1979). Effects of guar gum and wheat bran on lipid metabolism of rats. *Journal of Nutrition*, **109**, 1028 – 1034.
- Chen, W.J.; J.W. Anderson; D. Jennings (1984). Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **175**, 215 – 218.
- Chevallier, F. (1967). Dynamics of cholesterol in rats, studied by the isotopic equilibrium method. *Advances in Lipid Research*, **5**, 209 – 239.
- Chevallier, F. (1977). Rat cholesterol as a dynamic system. *Exposés Annuels de Biochimie Médicale*, **33**, 87 – 113.
- Chevallier, F. (1978). Le système cholestérol. *Médecine et Chirurgie Digestives*, **7**, 93 – 100.
- Chevallier, F.; J.R. Branco (1963). Synthèse du cholestérol hépatique à partir d'acétate- $1-^{14}\text{C}$ chez des rats normaux et porteurs de fistule biliaire: origine du cholestérol biliaire. *Revue Française d'Etudes Cliniques et Biologiques*, **8**, 903 – 909.
- Chevallier, F.; J. Férézou; J. Rautureau (1980). Fluctuations in blood cholesterol level: a rational analysis. *Medical Hypotheses*, **6**, 853 – 862.
- Chevallier, F.; C. Lutton (1968). Corrélations quantitatives entre le cholestérol et les lipides contenus dans les chylomicrons et la lymphe de rats présentant une fistule lymphatique. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, **50**, 107 – 117.
- Chevallier, F.; C. Lutton (1972). Mouvements de stérols dans le tube digestif du rat. Absorption du cholestérol de synthèse. *Biochimica et Biophysica Acta*, **274**, 382 – 411.
- Chevallier, F.; C. Lutton (1973). The intestine is the major site of cholesterol synthesis in the rat. *Nature: New Biology*, **242**, 61 – 62.

- Chevallier, F.; T. Magot (1975). Evidence of major role of the intestine in cholesterol synthesis in the adult male rat. *Experientia*, **31**, 627 – 629.
- Chevallier, F.; D. Mathé (1964). Destinée du cholestérol des chylomicrons chez le rat. III. Mouvements de cholestérol-4-¹⁴C entre les chylomicrons et la lymphe ou le sérum *in vivo*. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, **46**, 509 – 527.
- Chevallier, F.; D. Mathé; C. Lutton (1976). Lois des taux de cholestérol dans le plasma et le foie de rats adultes. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Série D*, **283**, 1759 – 1762.
- Chevallier, F.; J. Phillipot (1962). Destinée du cholestérol des chylomicrons chez le rat. II. Mouvements du cholestérol-4-¹⁴C de chylomicrons introduits *in vitro* dans du sérum. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, **44**, 809 – 822.
- Chevallier, F.; M. Vyas (1963). Les origines du cholestérol du chyle mises en évidence à l'aide de la méthode des indicateurs nucléaires. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, **45**, 253 – 276.
- Chiang, J.Y.; W.F. Miller; G.M. Lin (1990). Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase in the liver. Purification of cholesterol 7 α -hydroxylase and the immunochemical evidence for the induction of cholesterol 7 α -hydroxylase by cholestyramine and circadian rhythm. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 3889 – 3897.
- Chico, Y.; O. Fresnedo; M. Lacort; B. Ochoa (1994). Effect of estradiol and progesterone on cholesterol 7 α -hydroxylase activity in rats subjected to different feeding conditions. *Steroids*, **59**, 528 – 535.
- Childs, S.; V. Ling (1996). Duplication and evolution of the P-glycoprotein genes in pig. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1307**, 205 – 212.
- Childs, S.; R.L. Yeh; E. Georges; V. Ling (1995). Identification of a sister gene to P-glycoprotein. *Cancer Research*, **55**, 2029 – 2034.
- Chow, S.L.; D. Hollander (1978). Initial cholesterol uptake by everted sacs of rat small intestine: kinetic and thermodynamic aspects. *Lipids*, **13**, 239 – 245.
- Cittadini, D.; D. DeCristofaro; M. Dayjello; C. Pietropaolo (1964). *In vivo* effect of L-lysine on rat liver arginase. *Nature*, **203**, 643 – 644.
- Clegg, K.M. (1956). The application of anthrone reagent to the estimation of starch in cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **7**, 40 – 44.
- Combs, G.E.; R.G. Conness; T.H. Berry; H.D. Wallace (1967). Effect of raw and heated soybeans on gain, nutrient digestibility, plasma amino acids and other blood constituents of growing swine. *Journal of Animal Science*, **26**, 1067 – 1071.
- Connor, W.E.; S.L. Connor (1972). The key role of nutritional factors in the prevention of coronary heart disease. *Preventive Medicine*, **1**, 49 – 83.
- Connor, W.E.; D.T. Witiak; D.B. Stone; M.L. Armstrong (1969). Cholesterol balance and fecal neutral steroid and bile acid excretion in normal men fed dietary fats of different fatty acid composition. *Journal of Clinical Investigation*, **48**, 1363 – 1375.
- Conway, P.L. (1994). Function and regulation of the gastrointestinal microbiota of the pig. In: *Proceedings of the Vth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs Volume I*. (Editado por Souffrant, W.-B.; H. Hagemester) EAAP Publication n°80, 231 – 240.
- Cooper, S.T.; R.J. Aiello; W.J. Checovich; A.D. Attie (1992). Low density lipoprotein heterogeneity in spontaneously hypercholesterolemic pigs. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **113**, 133 – 140.
- Costa, N.M.; A.G. Low; A.F. Walker; R.W. Owen; H.N. Englyst (1994). Effect of baked beans (*Phaseolus vulgaris*) on steroid metabolism and non-starch polysaccharide output of hypercholesterolaemic pigs with or without an ileo-rectal anastomosis. *British Journal of Nutrition*, **71**, 871 – 876.

- Covarrubias, C.; V. Valdivieso; F. Nervi (1984). Epidemiology of gallstone disease in Chile. In: *Epidemiology and prevention of gallstone disease*. (Editado por Capocaccia, L.; G. Ricci; M. Angelico; A.F. Attili) MTP Press, Lancaster, 26 – 30.
- Crestani, M.; W.G. Karam; J.Y. Chiang (1994). Effects of bile acids and steroid/thyroid hormones on the expression of cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA and the CYP7 gene in HepG2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **28**, 546 – 553.
- Cummings, J.H. (1981). Short chain fatty acids in the human colon. *Gut*, **22**, 763 – 779.
- Daumerie, C.M.; L.A. Woollett; J.M. Dietschy (1992). Fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein receptor activity through redistribution of intracellular cholesterol pools. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **89**, 10797 – 10801.
- Davies, P.F.; R. Ross (1980). Growth-mediated, density-dependent inhibition of endocytosis in cultured arterial smooth muscle cells. *Experimental Cell Research*, **129**, 329 – 336.
- Davis, R.A.; S. Dueland; J.D. Trawick (1992). Bile acid synthesis and the enterohepatic circulation: processes regulating total-body cholesterol homeostasis. *Molecular Genetics and Coronary Artery Diseases*, **14**, 208 – 227.
- Davis, R.A.; F. Kern Jr. (1976). Effects of ethinyl estradiol and phenobarbital on bile acid synthesis and biliary bile acid and cholesterol excretion. *Gastroenterology*, **70**, 1130 – 1135.
- Davis, R.A.; M.M. McNeal; R.L. Moses (1982). Intrahepatic assembly of very low density lipoprotein. Competition by cholesterol esters for the hydrophobic core. *Journal of Biological Chemistry*, **257**, 2634 – 2640.
- Dawson, P.A.; L.L. Rudel (1999). Intestinal cholesterol absorption. *Current Opinion in Lipidology*, **10**, 315 – 320.
- de Crom, R.P.; R. van Haperen; R. Willemsen; A.W. van der Kamp (1992). High density lipoprotein-binding proteins in porcine liver. Isolation and histological localization. *Arteriosclerosis Thrombosis*, **12**, 325 – 331.
- de Grella, R.F.; R.D. Simoni (1982). Intracellular transport of cholesterol to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, **257**, 14256 – 14262.
- de Jong, A.; J. Plat; R.P. Mensink (2003). Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *Journal of Nutritional Biochemistry*, **14**, 362 – 369.
- Deutz, N.E.; M.J. Bruins; P.B. Soeters (1998). Infusion of soy and casein protein meals affects interorgan amino acid metabolism and urea kinetics differently in pigs. *Journal of Nutrition*, **128**, 2435 – 2445.
- Devi, K.S.; P.A. Kurup (1970). Effect of certain Indian pulses on the serum, liver and aortic lipid levels in rats fed a hypercholesterolaemic diet. *Atherosclerosis*, **11**, 479 – 484.
- Devlin, A.M.; S.M. Innis; R. Shukin; M.F. Rioux (1998). Early diet influences hepatic hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase and 7 α -hydroxylase mRNA but not low-density lipoprotein receptor mRNA during development. *Metabolism*, **47**, 20 – 26.
- Deykin, D.; D.S. Goodman (1962). Hydrolysis of long-chain fatty acid esters of cholesterol with rat liver enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, **237**, 3649 – 3656.
- Diersen-Schade, D.A., M.J. Richard; D.C. Beitz; N.L. Jacobson (1986). Plasma, tissue and fecal cholesterol of young pigs fed restricted or liberal amounts of beef, soy or conventional diets. *Journal of Nutrition*, **116**, 2086 – 2095.
- Dietschy, J.M.; W.G. Gamel (1971). Cholesterol synthesis in the intestine of man: regional differences and control mechanisms. *Journal of Clinical Investigation*, **50**, 872 – 880.
- Dietschy, J.M.; M.D. Siperstein (1965). Cholesterol synthesis by the gastrointestinal tract: localization and mechanisms of control. *Journal of Clinical Investigation*, **44**, 1311 – 1327.
- Dietschy, J.M.; S.D. Turley; D.K. Spady (1993). Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *Journal of Lipid Research*, **34**, 1637 – 1659.

- Dietschy, J.M.; J.D. Wilson (1970). Regulation of cholesterol metabolism. 3. *New England Journal of Medicine*, **282**, 1241 – 1249.
- Duane, W.C. (1997). Effects of legume consumption on serum cholesterol, biliary lipids, and sterol metabolism in humans. *Journal of Lipid Research*, **38**, 1120 – 1128.
- Dubois, C.; L. Cara; M. Armand; P. Borel; M. Senft; H. Portugal; A.M. Pauli; P.M. Bernard; H. Lafont; D. Lairon (1993). Effects of pea and soybean fibre on postprandial lipaemia and lipoproteins in healthy adults. *European Journal of Clinical Nutrition*, **47**, 508 – 520.
- Dubrac, S.; M. Parquet; Y. Blouquit; D. Gripois; M.F. Blouquit; M. Souidi; C. Lutton (2001). Insulin injections enhance cholesterol gallstone incidence by changing the biliary cholesterol saturation index and apo A-I concentration in hamsters fed a lithogenic diet. *Journal of Hepatology*, **35**, 550 – 557.
- Dubreuil, P.; H. Lapiere (1997). Biochemistry reference values for Quebec lactating dairy cows, nursing sows, growing pigs and calves. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **61**, 235 – 239.
- Dugan, R.E.; J.W. Porter (1972). Hog liver squalene synthetase: the partial purification of the particulate enzyme and kinetic analysis of the reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **152**, 28 – 35.
- Dupont, J.; S.Y. Oh; L. O'Deen; M.A. McClellan; W.V. Lumb; A.B. Butterfield; D.J. Clow (1974). Cholesterol and bile acid turnover in miniature swine. *Lipids*, **9**, 717 – 721.
- EC (1998). Commission directive 98/64/EC establishing Community methods of analysis for the determination of aminoacids, crude oils and fats, and olaquinox in feedingstuffs and amending Directive 71/393/EEC. *Official Journal of the European Communities*, **L257**, 14 – 28.
- Edwards, P.A. (1973). Effect of adrenalectomy and hypophysectomy on the circadian rhythm of β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A reductase activity in rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, **248**, 2912 – 2917.
- Edwards, P.A.; H. Muroya; R.G. Gould (1972). *In vivo* demonstration of the circadian rhythm of cholesterol biosynthesis in the liver and intestine of the rat. *Journal of Lipid Research*, **13**, 396 – 401.
- Edwards, A.C.; R.J. Van Barneveld (1998). Lupins for livestock and fish. In: *Lupins as crop plants: Biology, production, and utilization*. (Editado por Gladstones, J.S.; C.A. Atkins; J. Hamblin) CAB International, Wallingford, UK, 385 – 409.
- EEC (1971). Commission directive 71/250/EEC establishing Community methods of analysis for the official control of feedingstuffs. *Official Journal of the European Communities*, **L155**, 13 – 37.
- Einarsson, K.; J.E. Akerlund; E. Reihner; I. Björkhem (1992). 12α -Hydroxylase activity in human liver and its relation to cholesterol 7α -hydroxylase activity. *Journal of Lipid Research*, **33**, 1591 – 1595.
- Eisenberg, S. (1980). Plasma lipoprotein conversions: the origins of low-density and high-density lipoproteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **348**, 30 – 47.
- Eisenberg, S. (1983). Lipoproteins and lipoprotein metabolism. A dynamic evaluation of the plasma fat transport system. *Klinische Wochenschrift*, **61**, 119 – 132.
- Eldridge, A.C.; W.F. Kwolek (1983). Soyabean isoflavones: effect of environment and variety on composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **31**, 394 – 396.
- Elferink, R.O.; A.K. Groen (2000). Mechanisms of biliary lipid secretion and their role in lipid homeostasis. *Seminars in Liver Disease*, **20**, 293 – 305.
- Elliot, W.H.; P.M. Hyde (1971). Metabolic pathway of bile acid synthesis. *American Journal of Medicine*, **51**, 568 – 569.

- Englyst, H.N.; S.M. Kingman; J.H. Cummings (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*, **46**, S33 – S50.
- Esterman, A.L.; H. Baum; N.B. Javitt; G.J. Darlington (1983). 26-Hydroxycholesterol: regulation of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase activity in Chinese hamster ovary cell culture. *Journal of Lipid Research*, **24**, 1304 – 1309.
- Fadden, K.; M.J. Hill; E. Latymer; G. Low; R.W. Owen (1999). Steroid metabolism along the gastrointestinal tract of the cannulated pig. *European Journal of Cancer Prevention*, **8**, 35 – 40.
- Faidley, T.D.; C.M. Luhman; S.T. Galloway; M.K. Foley; D.C. Beitz (1999). Dietary beef tallow alters the fatty acid profiles of bile and liver membranes, but not secretion of cholesterol in bile. *Nutrition Research*, **19**, 1027 – 1039.
- Fausch, H.D.; R. Richmond; T.A. Anderson (1968). Influence of fasting on body composition and tissue cholesterol levels in swine. *Journal of Animal Science*, **27**, 1273 – 1275.
- Felts, J.M.; H. Itakura; R.T. Crane (1975). The mechanism of assimilation of constituents of chylomicrons, very low density lipoproteins and remnants - a new theory. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **66**, 1467 – 1475.
- Férézou, J.; P. Beau; M. Parquet; G. Champarnaud; C. Lutton; C. Matuchansky (1993). Cholesterol and bile acid metabolism after total small bowel resection and bile diversion in humans. *Gastroenterology*, **104**, 1786 – 1795.
- Férézou, J.; F. Chevallier (1986). Cholesterol biodynamics in rats and humans. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, **6**, 57 – 85.
- Férézou, J.; T. Coste; F. Chevallier (1981). Origins of neutral sterols in human feces studied by stable isotope labeling (D and ¹³C). Existence of an external secretion of cholesterol. *Digestion*, **21**, 232 – 243.
- Férézou, J.; J. Rautureau; T. Coste; E. Gouffier; F. Chevallier (1982). Cholesterol turnover in human plasma lipoproteins: studies with stable and radioactive isotopes. *Journal of American Clinical Nutrition*, **36**, 235 – 244.
- Férézou, J.; M. Riottot; C. Sérougne; C. Cohen-Solal; I. Catala; C. Alquier; M. Parquet; C. Juste; H. Lafont; D. Mathé; T. Corring; C. Lutton (1997). Hypocholesterolemic action of β -cyclodextrin and its effects on cholesterol metabolism in pigs fed a cholesterol-enriched diet. *Journal of Lipid Research*, **38**, 86 – 100.
- Fernandez, M.L. (1995). Distinct mechanisms of plasma LDL lowering by dietary fiber in the guinea pig: specific effects of pectin, guar gum, and psyllium. *Journal of Lipid Research*, **36**, 2394 – 2404.
- Fernandez, M.L. (2001). Soluble fiber and nondigestible carbohydrate effects on plasma lipids and cardiovascular risk. *Current Opinion in Lipidology*, **12**, 35 – 40.
- Fidge, N.H. (1973). The isolation and properties of pig plasma lipoproteins and partial characterisation of their apoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **295**, 258 – 273.
- Fidge, N.H.; P. Poulis (1974). Studies on the radioiodination of very low density lipoprotein obtained from different mammalian species. *Clinica Chimica Acta*, **52**, 15 – 26.
- Fidge, N.H.; P. Poulis (1978). Metabolic heterogeneity in the formation of low density lipoprotein from very low density lipoprotein in the rat: evidence for independent production of a low density lipoprotein subfraction. *Journal of Lipid Research*, **19**, 342 – 349.
- Fidge, N.H.; G.D. Smith (1975). Isolation and characterization of pig lipoprotein subfractions within the density range 1.006 – 1.090 g/ml. *Artery*, **1**, 406 – 427.
- Fielding, C.J.; P.E. Fielding (1982). Cholesterol transport between cells and body fluids. Role of plasma lipoproteins and the plasma cholesterol esterification system. *Medical Clinics of North America*, **66**, 363 – 373.

- Fielding, C.J.; P.E. Fielding (2001). Cellular cholesterol efflux. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1533**, 175 – 189.
- Fielding, C.J.; V.G. Shore; P.E. Fielding (1972). A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **46**, 1493 – 1498.
- Fielding, C.J.; I. Vlodaysky; P.E. Fielding; D. Gospodarowicz (1979). Characteristics of chylomicron binding and lipid uptake by endothelial cells in culture. *Journal of Biological Chemistry*, **254**, 8861 – 8868.
- Fielding, P.E.; C.J. Fielding (1995). Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry*, **34**, 14288 – 14292.
- Fillios, L.C.; L. Kaplan; R.S. Martin; F.J. Stare (1958). Some aspects of the gonadal regulation of cholesterol metabolism. *American Journal of Physiology*, **193**, 47 – 51.
- Finnigan, T.J. (1983). The effect of whole and air-classified legumes on serum lipids in hypercholesterolemic rabbits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **34**, 275 – 276.
- Floren, C.H.; A. Nilsson (1977). Degradation of chylomicron remnant cholesteryl ester by rat hepatocyte monolayers. Inhibition by chloroquine and colchicine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **74**, 520 – 528.
- Floren, C.H.; H. Nordgren; A. Nilsson (1977). Effects of chloroquine and colchicine on the degradation of chyle cholesteryl ester and phospholipids *in vivo*. *European Journal of Biochemistry*, **80**, 331 – 340.
- Folch, J.; M. Lees; G.H. Sloane-Staley (1957). A simple method for the isolation and quantification of total lipid from animal sources. *Journal of Biological Chemistry*, **226**, 497 – 509.
- Forsythe, W.A.; M.S. Green; J.J. Anderson (1986). Dietary protein effects on cholesterol and lipoprotein concentrations: a review. *Journal of the American College of Nutrition*, **5**, 533 - 549.
- Fournier, N.; M. de la Llera-Moya; B.F. Burkey; J.B. Swaney; J. Paterniti Jr.; N. Moatti; V. Atger; G.H. Rothblat (1996). Role of HDL phospholipid in efflux of cell cholesterol to whole serum: studies with human apoA-I transgenic rats. *Journal of Lipid Research*, **37**, 1704 – 1711.
- Friedman, M.; D. Brandon (2001). Nutritional and health benefits of soy proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 1069 – 1086.
- Frost, G.; A.A. Leeds; C.J. Doré; S. Madeiros; S. Brading; A. Dornhorst (1999). Glycaemic index as a determinant of serum HDL-cholesterol concentration. *The Lancet*, **353**, 1045 – 1048.
- Fuller, M.F. (1991). Methodologies for the measurement of digestion. In: *Digestive physiology in pigs. Proceedings of the Vth. International Symposium*. (Editado por Verstegen, M.W.A.; J. Huisman; L.A. den Hartog) EAAP Publication n°54, 273 – 288.
- Furster, C.; J. Zhang; A. Toll (1996). Purification of a 3β -hydroxy- Δ^5 -C₂₇-steroid dehydrogenase from pig liver microsomes active in major and alternative pathways of bile acid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 20903 – 20907.
- Gallo-Torres, H.E.; O.N. Miller; J.G. Hamilton (1971). Further studies on the role of bile salts in cholesterol esterification and absorption from the gut. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **143**, 22 – 36.
- Gardner, R.S.; P.A. Mayes (1978). Comparison of the metabolism of chylomicrons and chylomicron remnants by the perfused liver. *Biochemical Journal*, **170**, 47 – 55.
- Garner Jr., C.W.; L.C. Smith (1972). Porcine pancreatic lipase. A glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, **247**, 561 – 565.
- Gebhard, R.L.; W.F. Prigge (1992). Thyroid hormone differentially augments biliary sterol secretion in the rat. 2. The chronic bile fistula model. *Journal of Lipid Research*, **33**, 1467 – 1473.
- Gestetner, B.; Y. Assa; Y. Henis; Y. Tencer; M. Rotman; Y. Birk; A. Bondi (1972). Interaction of lucerne saponins with steroids. *Biochimica et Biophysica Acta*, **23**, 181 – 187.

- Gibbons, G.F.; K.A. Mitropoulos; N.B. Myant (1982). *Biochemistry of cholesterol*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Gidez, L.I.; P.S. Roheim; H.A. Eder (1965). Effect of diet on cholesterol ester composition of liver and of plasma lipoproteins in rat. *Journal of Lipid Research*, **6**, 377 – 382.
- Gillet, M.P.; A.B. Lima-Filho; D.N. Oliveira; J.L. Lima-Filho (1989). Relationship between lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid and lipoprotein levels in plasma of mammals susceptible or resistant to atherosclerosis. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, **32**, 645 – 659.
- Gillotte, K.L.; W.S. Davidson; S. Lund-Katz; G.H. Rothblat; M.C. Phillips (1998). Removal of cellular cholesterol by pre- β -HDL involves plasma membrane microsolubilization. *Journal of Lipid Research*, **39**, 1918 – 1928.
- Giraud-D'Hollander, F.; T. Magot; F. Chevallier (1976). *In vivo* study of free and esterified cholesterol turnover in various tissues of the rat. *Biochimie*, **58**, 855 – 862.
- Glangeaud, M.C.; S. Eisenberg; T. Olivecrona (1977). Very low density lipoprotein. Dissociation of apolipoprotein C during lipoprotein lipase induced lipolysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **486**, 23 – 35.
- Glass, C.; R.C. Pittman; D.B. Weinstein; D. Steinberg (1983). Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and gonad. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **80**, 5435 – 5439.
- Glencross, B.D. (2001). *Feeding lupins to fish: A review of the nutritional and biological value of lupins in aquaculture feeds*. Grains Research Council, North Beach, Australia.
- Glomset, J.A.; K.R. Norum (1973). The metabolic role of lecithin:cholesterol acyltransferase: perspectives from pathology. *Advances in Lipid Research*, **11**, 1 – 65.
- Goldberg, I.J. (1996). Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Journal of Lipid Research*, **37**, 693 – 707.
- Goldstein, J.L.; R.G. Anderson; M.S. Brown (1979). Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature*, **279**, 679 – 685.
- Goldstein, J.L.; M.S. Brown (1974). Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *Journal of Biological Chemistry*, **249**, 5153 – 5162.
- Goldstein, J.L.; M.S. Brown (1977). The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry*, **46**, 897 – 930.
- Goodman, D.S. (1964). The *in vivo* turnover of individual cholesterol esters in human plasma lipoproteins. *Journal of Clinical Investigation*, **43**, 2026 – 2036.
- Goodman, D.S. (1965). Cholesterol ester metabolism. *Physiological Reviews*, **45**, 747 – 839.
- Goodman, D.S.; T. Shiratori; D. Deykin (1964). The formation of cholesterol esters with rat liver enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, **239**, 1335 – 1345.
- Goodwin, B.; S.A. Kliewer (2002). Nuclear receptors: I. Nuclear receptors and bile acid homeostasis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, **282**, G926 – G931.
- Goodwin, T.W. (1965). *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. Academic Press, New York.
- Gopalan, R.; D. Gracias; M. Madhavan (1991). Serum lipid and lipoprotein fractions in bengal gram and biochanin A induced alterations in atherosclerosis. *Indian Heart Journal*, **43**, 185 – 189.
- Gordon, D.A.; J.R. Wetterau; R.E. Gregg (1995). Microsomal triglyceride transfer protein: a protein complex required for the assembly of lipoprotein particles. *Trends in Cell Biology*, **5**, 317 – 321.

- Gordon, T.; W.P. Castelli; M.C. Hjortland; W.B. Kannel; T.R. Dawber (1977). High density lipoproteins as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham study. *American Journal of Medicine*, **62**, 707 – 714.
- Gould, R.G.; E.A. Swyrd (1966). Sites of control of hepatic cholesterol biosynthesis. *Journal of Lipid Research*, **7**, 698 – 707.
- Grande, F.; J.T. Anderson; A. Keys (1974). Sucrose and various carbohydrate-containing foods and serum lipids in man. *American Journal of Clinical Nutrition*, **27**, 1043 – 1051.
- Green, P.H.; R.M. Glickman (1981). Intestinal lipoprotein metabolism. *Journal of Lipid Research*, **22**, 1153 – 1173.
- Green, S.A. (1988). A note on amino acid digestibility measured in pigs with pre- or post-valve ileo-rectal anastomoses, fed soyabean, pea and meat meals. *Animal Production*, **47**, 317 – 320.
- Greer, S.A.; V.W. Hays; V.C. Speer; J.T. McCall (1966). Effect of dietary fat, protein and cholesterol on atherosclerosis in swine. *Journal of Nutrition*, **90**, 183 – 190.
- Grundy, S.M.; E.H. Ahrens; T.A. Miettinen (1965). Quantitative isolation and gas liquid chromatography analysis of total fecal bile acids. *Journal of Lipid Research*, **6**, 397 – 410.
- Guillemin, R.; W.E. Dear; R.A. Liebelt (1959). Nycthemeral variations in plasma free corticosteroid levels of the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **101**, 394 – 395.
- Guillon, F.; M.M. Champ (2002). Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *British Journal of Nutrition*, **88**, s293 – s306.
- Gyllin, H.; P. Puska; E. Vartiainen; T.A. Miettinen (1999). Serum sterols during stanol ester feeding in a mildly hypercholesterolemic population. *Journal of Lipid Research*, **40**, 593 – 600.
- Ha, Y.C.; P.J. Barter (1982). Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, **71**, 265 – 269.
- Haberland, M.E.; J.A. Reynolds (1973). Self-association of cholesterol in aqueous solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **70**, 2313 – 2316.
- Hahn, P.; F.A. Smale (1982). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity in liver, brown fat, and small intestine of developing rats. *Canadian Journal of Biochemistry*, **60**, 507 – 511.
- Hakala, K.; M. Vuoristo; P. Luukkonen; H.J. Jarvinen; T.A. Miettinen (1997). Impaired absorption of cholesterol and bile acids in patients with an ileoanal anastomosis. *Gut*, **41**, 771 – 777.
- Hammad, S.M.; S. Stefansson; W.O. Twal; C.J. Drake; P. Fleming; A. Remaley; H.B. Brewer Jr.; W.S. Argraves (1999). Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **96**, 10158 – 10163.
- Harborne, J.B. (1971). Distribution of flavonoids in *Leguminosae*. In: *Chemotaxonomy of the Leguminosae*. (Editado por Harborne, J.B.; D. Boulter; B.L. Turner) Academic Press, New York, 31 – 71.
- Harper, J.M. (1978). Food extrusion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **11**, 155 – 215.
- Harris, K.B.; W.G. Pond; H.J. Mersmann; E.O. Smith; H.R. Cross; J.W. Savell (2003). Evaluation of fat sources on cholesterol and lipoproteins using pigs selected for high or low serum cholesterol. *Meat Science*, **66**, 55 – 61.
- Hashimoto, S.; A.M. Fogelman (1980). Smooth microsomes. A trap for cholesteryl ester formed in hepatic microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, **255**, 8678 – 8684.
- Hasler-Rapacz, J.; H. Ellegren; A.-K. Fridolfsson; B. Kirkpatrick; S. Kirk; L. Andersson; J. Rapacz (1998). Identification of a mutation in the low density lipoprotein receptor gene associated with recessive familial hypercholesterolemia in swine. *American Journal of Medical Genetics*, **76**, 379 – 386.

- Haslewood, G.A. (1978). *The biological importance of bile salts*. (Editado por Neuberger, A.; E.L. Tatum) North-Holland Pub. Co., Amsterdam.
- Hauser, H.; J.H. Dyer; A. Nandy; M.A. Vega; M. Werder; E. Bieliauskaite; F.E. Weber; S. Compassi; A. Gemperli; D. Boffelli; E. Wehrli; G. Schulthess; M.C. Phillips (1998). Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine. *Biochemistry*, **37**, 17843 – 17850.
- Havel, R.J. (1984). The formation of LDL: mechanisms and regulation. *Journal of Lipid Research*, **25**, 1570 – 1576.
- Havel, R.J.; H.A. Eder; J.H. Bragdon (1955). The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *Journal of Clinical Investigation*, **34**, 1345 – 1353.
- Havel, R.J.; J.P. Kane; M.L. Kashyap (1973). Interchange of apolipoproteins between chylomicrons and high density lipoproteins during alimentary lipemia in man. *Journal of Clinical Investigation*, **52**, 32 – 38.
- Havel, R.J.; L. Kotite; J.L. Vigne; J.P. Kane; P. Tun; N. Phillips; G.C. Chen (1980). Radioimmunoassay of human arginine-rich apolipoprotein, apoprotein E. Concentration in blood plasma and lipoproteins as affected by apoprotein E-3 deficiency. *Journal of Clinical Investigation*, **66**, 1351 – 1362.
- Hayes, K.C.; A. Pronczuk; V. Wijendran; M. Beer (2002). Free phytosterols effectively reduce plasma and liver cholesterol in gerbils fed cholesterol. *Journal of Nutrition*, **132**, 1983 – 1988.
- Heider, J.G.; C.E. Pickens; L.A. Kelly (1983). Role of acyl CoA:cholesterol acyltransferase in cholesterol absorption and its inhibition by 57-118 in the rabbit. *Journal of Lipid Research*, **24**, 1127 – 1134.
- Heinemann, T.; O. Leiss; K. von Bergmann (1986). Effect of low-dose sitostanol on serum cholesterol in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **61**, 219 – 223.
- Helgerud, P.; R. Haugen; K.R. Norum (1982). The effect of feeding and fasting on the activity of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in rat small intestine. *European Journal of Clinical Investigation*, **12**, 493 – 500.
- Hennig, U.; W.B. Souffrant; J.P. Laplace; C. Février; M. Anke (1997). Retention of minerals by pigs with four models of ileorectostomy compared with intact animals. In: *Digestive physiology in pigs. Proceedings of the VIIIth. International Symposium*. (Editado por Laplace, J.P.; C. Février; A. Barbeau) EAAP Publication n°88, 344 – 347.
- Hernandez, M.; J. Montenegro; M. Steiner; D. Kim; C. Sparrow; P.A. Detmers; S.D. Wright; Y.-S. Chao (2000). Intestinal absorption of cholesterol is mediated by a saturable, inhibitable transporter. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1486**, 232 – 242.
- Heuman, D.M.; Z.R. Vlahcécic; M.L. Bailey; P.B. Hylemon (1988). Regulation of bile acid synthesis. II. Effect of bile acid feeding on enzymes regulating hepatic cholesterol and bile acid synthesis in the rat. *Hepatology*, **8**, 892 – 897.
- Hicks, K.B.; R.A. Moreau (2001). Phytosterols and phytosterols: Functional food cholesterol busters. *Food Technology*, **55**, 63 – 67.
- Hillman, L.C.; S.G. Peters; C.A. Fisher; E.W. Pomare (1985). Effects of the fibre components pectin, cellulose, and lignin on serum cholesterol levels. *American Journal of Clinical Nutrition*, **42**, 207 – 213.
- Hillman, L.C.; S.G. Peters; C.A. Fisher; E.W. Pomare (1986). Effects of the fibre components pectin, cellulose, and lignin on bile salt metabolism and biliary lipid composition in man. *Gut*, **27**, 29 – 36.
- Hitz, J.; F. Devaux; F. Galli; G. Siest; J.R. Kiechel (1987). Valeurs de référence des constituants chimiques et des enzymes plasmatiques chez le miniporc. *Annales de Biologie Clinique*, **45**, 532 – 536.

- Ho, H.T.; D.N. Kim; K.T. Lee (1989). Intestinal apolipoprotein B-48 synthesis and lymphatic cholesterol transport are lower in swine fed high fat, high cholesterol diet with soy protein than with casein. *Atherosclerosis*, **77**, 15 – 23.
- Ho, K.J. (1975). Effect of cholesterol feeding on circadian rhythm of hepatic and intestinal cholesterol biosynthesis in hamsters. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **150**, 271 – 277.
- Hofmann, A.F. (1988). Bile acids. In: *The liver: Biology and pathobiology*. (Editado por Arias, I.M.; W.B. Jacoby; H. Popper; D. Schachter; D.A. Shafritz) Raven Press, N.Y., 553 – 572.
- Hsia, S.L. (1969). Taurochenodeoxycholic acid 6 β -hydroxylase system of rat liver. In: *Bile salt metabolism*. (Editado por Schiff, L.; J.B. Carey; J.M. Dietschy) Springfield, USA, 103 – 114.
- Huff, M.W.; K.K. Carroll (1980). Effects of dietary proteins and amino acid mixtures on plasma cholesterol levels in rabbits. *Journal of Nutrition*, **110**, 1676 – 1685.
- Huff, M.W.; R.M. Hamilton; K.K. Carroll (1977). Plasma cholesterol levels in rabbits fed low fat, cholesterol-free, semipurified diets: effects of dietary proteins, protein hydrolysates and amino acid mixtures. *Atherosclerosis*, **28**, 187 – 195.
- Huff, M.W.; D.E. Telford (1985). Direct synthesis of low-density lipoprotein apoprotein B in the miniature pig. *Metabolism*, **34**, 36 – 42.
- Huff, M.W.; D.E. Telford; P.H. Barrett; J.T. Billheimer; P.J. Gillies (1994). Inhibition of hepatic ACAT decreases ApoB secretion in miniature pigs fed a cholesterol-free diet. *Arteriosclerosis Thrombosis*, **14**, 1498 – 1508.
- Huff, M.W.; D.E. Telford; J.Y. Edwards; J.R. Burnett; P.H. Barrett; S.R. Rapp; N. Napawan; B.T. Keller (2002). Inhibition of the apical sodium-dependent bile acid transporter reduces LDL cholesterol and apoB by enhanced plasma clearance of LDL apoB. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **22**, 1884 – 1891.
- Hutagalung, R.I.; G.L. Cromwell; V.W. Hays; C.H. Chaney (1969). Effect of dietary fat, protein, cholesterol and ascorbic acid on performance, serum and tissue cholesterol levels and serum lipid levels of swine. *Journal of Animal Science*, **29**, 700 – 705.
- Ikeda, I.; M. Sugano; T.J. Scallen; V. Vahouny; L.L. Gallo (1990). Transfer of cholesterol and sitosterol from rat intestinal brush-border membranes to phospholipid liposomes. Effects of SCP2. *Agricultural and Biological Chemistry*, **54**, 2649 – 2653.
- Ikeda, I.; K. Tanaka; M. Sugano; V. Vahouny; L.L. Gallo (1988a). Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols. *Journal of Lipid Research*, **29**, 1573 – 1582.
- Ikeda, I.; K. Tanaka; M. Sugano; V. Vahouny; L.L. Gallo (1988b). Discrimination between cholesterol and sitosterol for absorption in rats. *Journal of Lipid Research*, **29**, 1583 – 1591.
- Illman, R.J.; D.L. Topping; G.H. McIntosh; R.P. Trimble; G.B. Storer; M.N. Taylor; B.Q. Cheng (1988). Hypocholesterolaemic effects of dietary propionate: studies in whole animals and perfused rat liver. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **32**, 97 – 107.
- Infante, R.; G. Alcindor; A. Raisonnier; D. Petit; J. Polonovski; J. Caroli (1969). Biosynthèse des lipoprotéines plasmatiques par le foie en régénération. *Biochimica et Biophysica Acta*, **187**, 335 – 344.
- IUBMB (1992). *Enzyme nomenclature recommendations*. International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Academic Press, Orlando, FL.
- IUPAC – IUBMB (1984). IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. *European Journal of Biochemistry*, **138**, 9 – 37.
- Jackson, R.L.; H.N. Baker; O.D. Taunton; L.C. Smith; C.W. Garner; A.M. Gotto Jr. (1973). A comparison of the major apolipoprotein from pig and human high density lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, **248**, 2639 – 2644.

- Jackson, R.L.; B.H. Chung; L.C. Smith; O.D. Taunton (1977). Physical, chemical and immunochemical characterization of a lipoprotein lipase activator protein from pig plasma very low density lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **490**, 385 – 394.
- Jackson, R.L.; O.D. Taunton; R. Segura; J.G. Gallagher; H.F. Hoff; A.M. Gotto Jr. (1976). Comparative studies on plasma low density lipoproteins from pig and man. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, **53**, 245 – 253.
- Jacques, H.; Y. Deshaies; L. Savoie (1986). Relationship between dietary proteins, their *in vitro* digestion products, and serum cholesterol in rats. *Atherosclerosis*, **61**, 89 – 98.
- Janado, M.; W.G. Martin; W.H. Cook (1966). Separation and properties of pig-serum lipoproteins. *Canadian Journal of Biochemistry*, **44**, 1201 – 1209.
- Jansen, H.; W.C. Hulsmann (1980). Heparin-releasable (liver) lipase(s) may play a role in the uptake of cholesterol by steroid-secreting tissues. *Trends in Biochemical Sciences*, **5**, 265 – 268.
- Janus, E.D.; A. Nicoll; R. Wooton; P.R. Turner; P.J. Magill; B. Lewis; (1980). Quantitative studies of very low density lipoprotein conversion to low density lipoprotein in normal controls and primary hyperlipidaemic states. *European Journal of Clinical Investigation*, **10**, 149 – 159.
- Jenkins, D.J.; C. Newton; A.R. Leeds; J.H. Cummings (1975). Effect of pectin, guar gum, and wheat fibre on serum-cholesterol. *The Lancet*, **1**, 1116 – 1117.
- Jenkins, D.J.; C.W. Kendall; D. Faulkner; E. Vidgen; E.A. Trautwein; T.L. Parker; A. Marchie; G. Koumbridis; K.G. Lapsley; R.G. Josse; L.A. Leiter; P.W. Connelly (2002). A dietary portfolio approach to cholesterol reduction: combined effects of plant sterols, vegetable proteins, and viscous fibers in hypercholesterolemia. *Metabolism*, **51**, 1596 – 1604.
- Jenkins, D.J.; C.W. Kendall; D.G. Popovich; E. Vidgen; C.C. Mehling; V. Vuksan; T.P. Ransom; A.V. Rao; R. Rosenberg-Zand; N. Tariq; P. Corey; P.J. Jones; M. Raeini; J.A. Story; E.J. Furumoto; D.R. Illingworth; A.S. Pappu; P.W. Connelly (2001). Effect of a very-high-fiber vegetable, fruit, and nut diet on serum lipids and colonic function. *Metabolism*, **50**, 494 – 503.
- Jenkins, D.J.; G.S. Wong; R. Patten; J. Bird; M. Hall; G.C. Buckley; V. McGuire; R. Reichert; J.A. Little (1983). Leguminous seeds in the dietary management of hyperlipidemia. *American Journal of Clinical Nutrition*, **38**, 567 – 573.
- Jersild, R.A. (1966). A radioautographic study of glyceride synthesis *in vivo* during intestinal absorption of fats and labelled glucose. *Journal of Cell Biology*, **31**, 413 – 427.
- Johansson, M.B.; B.W. Karlsson (1976). Lipoproteins in serum of rat, mouse, gerbil, rabbit, pig and man studied by electrophoretical and immunological methods. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B*, **54**, 495 – 500.
- Jones, P.J. (2002). Clinical nutrition: 7. Functional foods - more than just nutrition. *Canadian Medical Association Journal*, **166**, 1555 – 1563.
- Jurgens, M.H.; E.R. Peo (1970). Influence of dietary supplements of cholesterol and vitamin-D on certain components of blood and body of growing-finishing swine. *Journal of Animal Science*, **30**, 894 – 903.
- Juste, C.; I. Catala; R. Henry; C. Chabanet; A.M. Gueugneau; F. Béguet; B. Lyan; T. Corring (1995). Influence of bile salt molecular species on cholesterol crystallization from supersaturated model bile. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1254**, 89 – 97.
- Juste, C.; I. Catala; M. Riottot; M. André; M. Parquet; B. Lyan; F. Béguet; J. Férézou-Viala; C. Sérougne; N. Domingo; C. Lutton; H. Lafont; T. Corring (1997). Inducing cholesterol precipitation from pig bile with β -cyclodextrin and cholesterol dietary supplementation. *Journal of Hepatology*, **26**, 711 – 721.
- Juste, C.; V. Legrand-Defretin; T. Corring; A. Rerat (1988). Intestinal absorption of bile acids in the pig. Role of distal bowel. *Digestive Diseases and Sciences*, **33**, 67 – 73.

- Kahlon, T.S.; Q. Shao (2004). *In vitro* binding of bile acids by soy bean (*Glycine max*), black eye bean (*Vigna unguiculata*), garbanzo (*Cicer arietinum*) and lima bean (*Phaseolus lunatus*). *Food Chemistry*, **86**, 435 – 440.
- Kandutsch, A.A.; S.E. Saucier (1969). Prevention of cyclic and triton-induced increases in hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase and sterol synthesis by puromycin. *Journal of Biological Chemistry*, **244**, 2299 – 2305.
- Kang, S.; R.A. Davis (2000). Cholesterol and hepatic lipoprotein assembly and secretion. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1529**, 223 – 230.
- Kellogg, T.F. (1971). Microbiological aspect of enterohepatic sterol and bile acid metabolism. *Federation Proceedings*, **30**, 1808 – 1814.
- Kellogg, T.F.; R.W. Rogers; H.W. Miller (1977). Differences in tissue fatty acids and cholesterol of swine from different genetic backgrounds. *Journal of Animal Science*, **44**, 47 – 52.
- Kempen, H.J. (1980). Lipoprotein secretion by isolated rat hepatocytes: characterization of the lipid-carrying particles and modulation of their release. *Journal of Lipid Research*, **21**, 671 – 680.
- Kerckhoffs, D.A.J.M.; F. Brouns; G. Hornstra; R.P. Mensink (2002). Effects on the human serum lipoprotein profile of β -glucan, soy protein and isoflavones, plant sterols and stanols, garlic and tocotrienols. *Journal of Nutrition*, **132**, 2494 – 2505.
- Kern, M.; D. Ellison; Y. Marroquin; M. Ambrose; K. Mosier (2002). Effects of soy protein supplemented with methionine on blood lipids and adiposity of rats. *Nutrition*, **18**, 654 – 656.
- Keys, A. (1970). *Coronary heart disease in seven countries*. Monograph n°29. American Heart Association, New York.
- Khallou, J.; M. Riottot; M. Parquet; C. Verneau; C. Lutton (1995). Antilithiasic and hypocholesterolemic effects of diets containing autoclaved amylo maize starch in hamster. *Digestive Diseases and Sciences*, **40**, 2540 – 2548.
- Khan, A.R.; G.Y. Khan; A. Mitchel; M.A. Qadeer (1981). Effect of guar gum on blood lipids. *American Journal of Clinical Nutrition*, **34**, 2446 – 2449.
- Khosla, P.; K. Sundram (1996). Effects of dietary fatty acid composition on plasma cholesterol. *Progress in Lipid Research*, **35**, 93 – 132.
- Kies, C. (1985). Non-soluble dietary fiber effects on lipid absorption and blood serum lipid patterns. *Lipids*, **20**, 802 – 807.
- Kim, D.N.; K.T. Lee; J.M. Reiner; W.A. Thomas (1974). Restraint of cholesterol accumulation in tissue pools associated with drastic short-term lowering of serum cholesterol levels by clofibrate or cholestyramine in hypercholesterolemic swine. *Journal of Lipid Research*, **15**, 326 – 331.
- Kim, D.N.; K.T. Lee; J.M. Reiner; W.A. Thomas (1975). An evaluation of some of the potential immediate sources of cholesterol for bile acid synthesis in swine. *Experimental and Molecular Pathology*, **22**, 284 – 293.
- Kim, D.N.; K.T. Lee; J.M. Reiner; W.A. Thomas (1978). Effects of a soy protein product on serum and tissue cholesterol concentrations in swine fed high-fat, high-cholesterol diets. *Experimental and Molecular Pathology*, **29**, 385 – 399.
- Kim, D.N.; K.T. Lee; J.M. Reiner; W.A. Thomas (1980). Increased steroid excretion in swine fed high-fat, high-cholesterol diet with soy protein. *Experimental and Molecular Pathology*, **33**, 25 – 35.
- Kim, D.N.; K.T. Lee; J.M. Reiner; W.A. Thomas (1981). Lack of beneficial effects of wheat bran cereals on cholesterol balance in swine. *Experimental and Molecular Pathology*, **35**, 301 – 313.
- Kingman, S.M. (1991). The influence of legume seeds on human plasma lipid concentrations. *Nutrition Research and Reviews*, **4**, 97 – 123.

- Kingman, S.M.; A.F. Walker; A.G. Low; I.E. Sambrook; R.W. Owen; T.J. Cole (1993). Comparative effects of four legume species on plasma lipids and faecal steroid excretion in hypercholesterolaemic pigs. *British Journal of Nutrition*, **69**, 409 – 421.
- Kinowaki, M.; S.-I. Tanaka; Y. Maeda; S. Higashi; K.-I. Okuda; T. Setoguchi (2002). Half-life of cholesterol 7 α -hydroxylase activity and enzyme mass differ in animals and humans when determined by a monoclonal antibody against human cholesterol 7 α -hydroxylase. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **81**, 377 – 380.
- Knipping, G. (1986). Isolation and properties of porcine lecithin:cholesterol acyltransferase. *European Journal of Biochemistry*, **154**, 289 – 294.
- Knipping, G.; G.M. Kostner; A. Holasek (1975). Studies on the composition of pig serum lipoproteins. Isolation and characterization of different apoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **393**, 88 – 99.
- Kostner, G.M.; G. Knipping; J.E. Groener; R. Zechner; H. Dieplinger (1987). The role of LCAT and cholesteryl ester transfer proteins for the HDL and LDL structure and metabolism. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **210**, 79 – 86.
- Kovanen, P.T.; D.W. Bilheimer; J.L. Goldstein; J.J. Jaramillo; M.S. Brown (1981). Regulatory role of hepatic low density lipoprotein receptors *in vivo* in the dog. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **78**, 1194 – 1198.
- Kovanen, P.T.; M.S. Brown; J.L. Goldstein (1979). Increased binding of low density lipoprotein to liver membranes from rats treated with 17 α -ethinyl estradiol. *Journal of Biological Chemistry*, **254**, 11367 – 11373.
- Kovanen, P.T.; E.A. Nikkila (1976). Cholesterol exchange between fat cells, chylomicrons and plasma lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **441**, 357 – 369.
- Kramer, W.; F. Girbig; D. Corsiero; K. Burger; F. Fahrenholz; C. Jung; G. Muller (2003). Intestinal cholesterol absorption: identification of different binding proteins for cholesterol and cholesterol absorption inhibitors in the enterocyte brush border membrane. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1633**, 13 – 26.
- Kreuzer, M.; H. Hanneken; M. Wittmann; M.M. Gerdemann; A. Machmüller (2002). Effects of different fibre sources and fat addition on cholesterol and cholesterol-related lipids in blood serum, bile and body tissues of growing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **86**, 57 – 73.
- Krieger, M. (1999). Charting the fate of the "good cholesterol": Identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annual Review of Biochemistry*, **68**, 523 – 558.
- Kritchevsky, D. (1979). Vegetable protein and atherosclerosis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **56**, 135 – 146.
- Kritchevsky, D. (1987). Dietary fiber and lipid metabolism. *International Journal of Obesity*, **11**, 33 – 43.
- Kritchevsky, D.; J.A. Story (1974). Binding of bile salts *in vitro* by nonnutritive fiber. *Journal of Nutrition*, **104**, 458 – 462.
- Kullak-Ublick, G.A.; B. Stieger; B. Hagenbuch; P.J. Meier (2000). Hepatic transport of bile acids. *Seminars in Liver Disease*, **20**, 273 – 292.
- Kuroki, S.; T. Hoshita (1983). Effect of bile acid feeding on hepatic steroid 12 α -hydroxylase activity in hamsters. *Lipids*, **18**, 789 – 794.
- Kwekkeboom, J.; H.J. Kempen; E.M. van Voorthuizen; M. Griffioen; L.H. Cohen (1990a). Postnatal developmental profile of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, squalene synthetase and cholesterol 7 α -hydroxylase activities in the liver of domestic swine. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1042**, 146 – 149.
- Kwekkeboom, J.; H.M. Princen; E.M. van Voorthuizen; H.J. Kempen (1990b). Bile acids exert negative feedback control on bile acid synthesis in cultured pig hepatocytes by suppression of cholesterol 7 α -hydroxylase activity. *Hepatology*, **12**, 1209 – 1215.

- Kwiterovich, P.O. (1997). The effect of dietary fat, antioxidants, and pro-oxidants on blood lipids, lipoproteins, and atherosclerosis. *Journal of the American Dietetic Association*, **97**, s31 – s41.
- Labori, K.J.; K. Arnkvaern; B.A. Bjornbeth; C.M. Press; M.G. Raeder (2002). Cholestatic effect of large bilirubin loads and cholestasis protection conferred by cholic acid co-infusion: a molecular and ultrastructural study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **37**, 585 – 596.
- Lada, A.T.; L.L. Rudel (2003). Dietary monounsaturated versus polyunsaturated fatty acids: which is really better for protection from coronary heart disease? *Current Opinion in Lipidology*, **14**, 41 – 46.
- Lange, Y.; A.L. Molinaro; T.R. Chauncey; T.L. Steck (1983). On the mechanism of transfer of cholesterol between human erythrocytes and plasma. *Journal of Biological Chemistry*, **258**, 6920 – 6926.
- Laplace, J.P. (1975). Somatic and visceral growth, and adiposity in the pig after partial small bowel resection. I. Variations according to the kinds of operations, to the specific location along the intestinal tract and to the sex of the animals. *Annales de Recherches Veterinaires*, **6**, 265 – 288.
- Law, M.R.; N.J. Wald; S.G. Thompson (1994). By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic disease? *British Medical Journal*, **308**, 367 – 372.
- Lee, C.; K.O. Martin; N.B. Javitt (1996). Bile acid synthesis: 7 α -hydroxylation of intermediates in the sterol 27-hydroxylase metabolic pathway. *Journal of Lipid Research*, **37**, 1356 – 1362.
- Lees, A.M.; H.Y. Mok; R.S. Lees; M.A. McCluskey; S.M. Grundy (1977). Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. *Atherosclerosis*, **28**, 325 – 338.
- Legrand-Defretin, V.; C. Juste; T. Corring; A. Rerat (1986). Enterohepatic circulation of bile acids in pigs: diurnal pattern and effect of a reentrant biliary fistula. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology*, **13**, G295 – G301.
- Legrand-Defretin, V.; C. Juste; R. Henry; T. Corring (1991). Ion-pair high performance liquid chromatography of bile salt conjugates: application to pig bile. *Lipids*, **26**, 578 – 583.
- Levrat, M.A.; M.L. Favier; C. Moundras; C. Remesy; C. Demigné; C. Morand (1994). Role of dietary propionic acid and bile acid excretion in the hypocholesterolemic effect of oligosaccharides in rats. *Journal of Nutrition*, **124**, 531 – 538.
- Li, H.; G. Xu; Q. Shang; L. Pan; S. Shefer; A.K. Batta; J. Bollineni; G.S. Tint; B.T. Keller; G. Salen (2004). Inhibition of ileal bile acid transport lowers plasma cholesterol levels by inactivating hepatic farnesoid X receptor and stimulating cholesterol 7 α -hydroxylase. *Metabolism*, **53**, 927 – 932.
- Li, J.R.; D.N. Kim (1979). The effect of bile acids on "solubilized" cholesterol 7 α -hydroxylase activity in swine. *Steroids*, **33**, 317 – 326.
- Li, J.R.; D.N. Kim; K.T. Lee; J.M. Reiner; W.A. Thomas (1980). Effect of clofibrate, cholestyramine, cholesterol and feeding pattern on the diurnal variation of cholesterol 7 α -hydroxylation in swine. *Experimental and Molecular Pathology*, **32**, 52 – 60.
- Lichtenstein, A.H. (1998). Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. *Journal of Nutrition*, **128**, 1589 – 1592.
- Lin, Y.; G.W. Meijer; M.A. Vermeer; E.A. Trautwein (2004). Soy protein enhances the cholesterol-lowering effect of plant sterol esters in cholesterol-fed hamsters. *Journal of Nutrition*, **134**, 143 – 148.
- Lindstedt, S. (1957). The turnover of bile acids in the rat. *Acta Physiologica Scandinavica*, **38**, 121 – 128.

- Ling, W.H.; P.J.H. Jones (1995). Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sciences*, **57**, 195 – 206.
- Lingaas, F.; E. Brun; G. Havre; A. Froslic; T. Aarskaug; O. Vangen (1992). Biochemical blood parameters in pigs. 1. Repeatability and effects of breed, litter number and sampling time. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, **109**, 221 – 230.
- Liscum, L.; N.J. Munn (1999). Intracellular cholesterol transport. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1438**, 19 – 37.
- Lo, G.S.; A.P. Goldberg; A. Lim; J.J. Grundhauser; C. Anderson; G. Schonfeld (1986). Soy fiber improves lipid and carbohydrate metabolism in primary hyperlipidemic subjects. *Atherosclerosis*, **62**, 239 – 248.
- Lovati, M.R.; C. Manzoni; A. Corsini; A. Granata; R. Frattini; R. Fumagalli; C.R. Sirtori (1992). Low density lipoprotein receptor activity is modulated by soybean globulins in cell culture. *Journal of Nutrition*, **122**, 1971 – 1978.
- Love, M.W.; P.A. Dawson (1998). New insights into bile acid transport. *Current Opinion in Lipidology*, **9**, 225 – 229.
- Lowry, O.H.; N.J. Rosebrough; A.L. Farr; R.J. Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **192**, 265 – 275.
- Lu, K.; M. Lee; S. Patel (2001). Dietary cholesterol absorption; more than just bile. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **12**, 314 – 320.
- Lu, S.; M. Huffman; Y. Yao; C.M. Mansbach 2nd; X. Cheng; S. Meng; D.D. Black (2002). Regulation of MTP expression in developing swine. *Journal of Lipid Research*, **43**, 1303 – 1311.
- Lucas, E.A.; D.A. Khalil; B.P. Daggy; B.H. Arjmandi (2001). Ethanol-extracted soy protein isolate does not modulate serum cholesterol in golden Syrian hamsters: a model of postmenopausal hypercholesterolemia. *Journal of Nutrition*, **131**, 211 – 214.
- Lund, E.; O Andersson; J. Zhang; A. Babiker; G. Ahlborg; U. Diczfalusy; K. Einarsson; J. Sjøvall; I. Björkhem (1996). Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of intracellular cholesterol in humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **16**, 208 – 212.
- Lundell, K.; R. Hansson; K. Wikvall (2001). Cloning and expression of a pig liver taurochenodeoxycholic acid 6 α -hydroxylase (CYP4A21). A novel member of the CYP4A subfamily. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 9606 – 9612.
- Lutton, C. (1976). The role of the digestive tract in cholesterol metabolism. *Digestion*, **14**, 342 – 356.
- Lutton, C. (1990). Dynamique du cholestérol et des acides biliaries. Aspects comparatifs. *Reproduction, Nutrition, Development*, **30**, 145 – 160.
- Lutton, C.; E. Brot-Laroche (1979). Biliary cholesterol absorption in normal and L-thyroxin-fed rats. *Lipids*, **14**, 441 – 446.
- Lutton, C.; F. Chevallier (1972a). Vitesses des processus de renouvellement du cholestérol contenu dans son espace de transfert, chez le rat. IV. Influence de l'âge, du poids, du sexe, de la gestation et de la lactation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **280**, 116 – 130.
- Lutton, C.; F. Chevallier (1972b). Analyse des stérols des contenus digestifs et des fèces du rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, **260**, 133 – 145.
- Lutton, C.; D. Mathé; F. Chevallier (1973). Vitesses des processus de renouvellement du cholestérol contenu dans son espace de transfert, chez le rat. VI. Influence de la ligature du cholédoque et de l'ingestion d'acides biliaries ou de cholestyramine. *Biochimica et Biophysica Acta*, **306**, 483 – 496.
- Lynen, F. (1953). Functional group of coenzyme A and its metabolic relations, especially in the fatty acid cycle. *Federation Proceedings*, **12**, 683 – 691.
- Lynen, F.; U. Henning; C. Bublitz; B. Sorbo; L. Kroplinrueff (1958). Der chemische mechanismus der acetessigsäurebildung in der leber. *Biochemische Zeitschrift*, **330**, 269 – 295.

- Macarulla, M.T.; C. Medina; M.A. de Diego; M. Chavarri; M.A. Zulet; J.A. Martinez; C. Noel-Suberville; P. Higuere; M.P. Portilo (2001). Effects of the whole seed and a protein isolate of faba bean (*Vicia faba*) on the cholesterol metabolism of hypercholesterolaemic rats. *British Journal of Nutrition*, **85**, 607 – 614.
- Madani, S.; S. Lopez; J.P. Blond; J. Prost; J. Belleville (1998). Highly purified soybean protein is not hypocholesterolemic in rats but stimulates cholesterol synthesis and excretion and reduces polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *Journal of Nutrition*, **128**, 1084 – 1091.
- Madani, S.; J. Prost; J. Belleville (2000). Dietary protein level and origin (casein and highly purified soybean protein) affect hepatic storage, plasma lipids transport, and antioxidative defense status in the rat. *Nutrition*, **16**, 368 – 375.
- Mahadevappa, V.G.; P.L. Raina (1983). Hypocholesterolemic effect of cowpea in rats on atherogenic diet. *Indian Journal of Medical Research*, **78**, 819 – 823.
- Mahley, R.W. (1978). Alteration in plasma lipoprotein induced by cholesterol feeding in animal including man. In: *Disturbances in lipid and lipoprotein metabolism*. (Editado por Dietschy, J.M.; A.M. Gotto; J.A. Ontko) Clinical Physiology Series, Bethesda, 181 – 197.
- Mahley, R.W.; D.Y. Hui; T.L. Innerarity; K.H. Weisgraber (1981). Two independent lipoprotein receptors on hepatic membranes of dog, swine, and man. Apo-B/E and apo-E receptors. *Journal of Clinical Investigation*, **68**, 1197 – 1206.
- Mahley, R.W.; T.L. Innerarity (1983). Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **737**, 197 – 222.
- Makishima, M.; A.Y. Okamoto; J.J. Repa; H. Tu; R.M. Learned; A. Luk; M.V. Hull; K.D. Lustig; D.J. Mangelsdorf; B. Shan (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*, **284**, 1362 – 1365.
- Malinow, M.R.; P. McLaughlin; C. Stafford (1980). Alfalfa seeds: effects on cholesterol metabolism. *Experientia*, **36**, 562 – 564.
- Marlett, J.A.; K.B. Hosig; N.W. Vollendorf; F.L. Shinnick; V.S. Haack; J.A. Story (1994). Mechanism of serum cholesterol reduction by oat bran. *Hepatology*, **20**, 1450 – 1457.
- Marsh, A.; D.N. Kim; K.T. Lee; J.M. Reiner; W.A. Thomas (1972). Cholesterol turnover, synthesis and retention in hypercholesterolemic growing swine. *Journal of Lipid Research*, **13**, 600 – 615.
- Martin, K.O.; K. Budai; N.B. Javitt (1993). Cholesterol and 27-hydroxycholesterol 7 α -hydroxylation: evidence for two different enzymes. *Journal of Lipid Research*, **34**, 581 – 588.
- Martincic, T.; A. Svetina; E. Fulgosi (1984). The levels of nonesterified fatty acids, total lipids and cholesterol in the serum of swine: the influence of age, diet, and body weight. *Veterinarski Arhiv*, **54**, 133 – 142.
- Martinez, L.O., V. Georgeaud; C. Rolland; X. Collet; F. Terce; B. Perret; R. Barbaras (2000). Characterization of two high-density lipoprotein binding sites on porcine hepatocyte plasma membranes: contribution of scavenger receptor class B type I (SR-BI) to the low-affinity component. *Biochemistry*, **39**, 1076 – 1082.
- Mathé, D.; K.M. Botham; G.S. Boyd (1984). Cholesterol ester turnover in isolated liver cells. Effects of cholesterol feeding. *Biochimica et Biophysica Acta*, **793**, 435 – 440.
- Mathé, D.; F. Chevallier (1977). Effects of long-term feeding of hydoxycholeic acid on cholesterol metabolism in the rat. *Nutrition Reports International*, **15**, 571 – 576.
- Mathé, D.; F. Chevallier (1979). Effect of level of dietary cholesterol on the dynamic equilibrium of cholesterol in rats. *Journal of Nutrition*, **109**, 2076 – 2084.
- Mathé, D.; F. Chevallier (1980). Factors determining to biotransformation of cholesterol to bile acids in the rat: development of a new model. *Digestion*, **20**, 121 – 136.
- Mathé, D.; F. D'Hollander; F. Chevallier (1972). *In vivo* studies of the possible role of cholesteryl esters as precursors of bile acids. *Biochimie*, **54**, 1479 – 1481.

- Mathé, D.; C. Lutton (1984). Le cholestérol. Aspects dynamiques et métaboliques. *Journal de Physiologie*, **79**, 41 – 97.
- Mathé, D.; C. Lutton; J. Rautureau; T. Coste; E. Gouffier; J.C. Sulpice; F. Chevallier (1977). Effects of dietary fiber and salt mixtures on the cholesterol metabolism of rats. *Journal of Nutrition*, **107**, 466 – 474.
- Mathur, K.S.; D.N. Gupta; R.D. Sharma (1965). Effect of Bengal gram, Kabuli gram, green gram and Bajra on serum and tissue lipids in rabbits fed on hypercholesterolaemic diet. *Journal of the Association of Physicians of India*, **13**, 923 – 928.
- Mathur, K.S.; M.A. Khan; R.D. Sharma (1968). Hypocholesterolaemic effect of Bengal gram: a long-term study in man. *British Medical Journal*, **1**, 30 – 31.
- Mathur, K.S.; R.D. Sharma; S.S. Singhal (1964). Effect of Bengal gram on experimentally induced high levels of cholesterol in tissues and serum in albino rats. *Journal of Nutrition*, **84**, 201 – 204.
- Matsumoto, A.; A. Mitchell; H. Kurata; L. Pyle; K. Kondo; H. Itakura; N. Fidge (1997). Cloning and characterization of HB₂, a candidate high density lipoprotein receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 16778 – 16782.
- Mayes, P.A.; D.L. Topping (1974). Regulation of hepatic lipogenesis by plasma free fatty acids: simultaneous studies on lipoprotein secretion, cholesterol synthesis, ketogenesis and gluconeogenesis. *Biochemical Journal*, **140**, 111 – 114.
- Mazer, N.A.; M.C. Carey (1984). Mathematical model of biliary lipid secretion: a quantitative analysis of physiological and biochemical data from man and other species. *Journal of Lipid Research*, **25**, 932 – 953.
- McIntyre, N.; K. Kirsch; J.C. Orr; K.J. Isselbacher (1971). Sterols in the small intestine of the rat, guinea pig and rabbit. *Journal of Lipid Research*, **12**, 336 – 346.
- McKee, T.; J.R. McKee (1999). *Biochemistry*. Wm. C. Brown/McGraw-Hill Publishers (2nd Edition), USA.
- McWhinney, V.J.; W.G. Pond; H.J. Mersmann (1996). Ontogeny and dietary modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activities in neonatal pigs. *Journal of Animal Science*, **74**, 2203 – 2210.
- Mellenthin, O.; R. Galensa (1999). Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis and HPLC: detection of soy, lupin, and pea protein in meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 594 – 602.
- Mendez, A.J. (1997). Cholesterol efflux mediated by apolipoproteins is an active cellular process distinct from efflux mediated by passive diffusion. *Journal of Lipid Research*, **38**, 1807 – 1821.
- Mersmann, H.J.; M.C. Arakelian; L.J. Brown (1979). Plasma lipids in neonatal and growing swine. *Journal of Animal Science*, **48**, 554 – 558.
- Meslin, J.C.; C. Andrieux; M. Riottot (1992). Intestinal mucosal morphometry and ileal epithelial renewal in conventional and germ-free rats fed an amylo maize starch diet. *Reproduction, Nutrition and Development*, **32**, 73 – 81.
- Miettinen, T.A. (1973). Clinical implications of bile acid metabolism in man. In: *The bile acids. Vol. 2: Physiology and metabolism*. (Editado por Nair, P.P.; D. Kritchevsky) Plenum Press, N.Y., 191 – 247.
- Miettinen, T.A.; H. Gylling (1999). Regulation of cholesterol metabolism by dietary plant sterols. *Current Opinion in Lipidology*, **10**, 9 – 14.
- Miettinen, T.A.; A. Kesaniemi (1989). Cholesterol absorption: regulation of cholesterol synthesis and elimination and within-population variations of serum cholesterol levels. *American Journal of Clinical Nutrition*, **49**, 629 – 635.

- Miettinen, T.A.; M. Vuoristo; M. Nissinen; H.J. Jarvinen; H. Gylling (2000). Serum, biliary, and fecal cholesterol and plant sterols in colectomized patients before and during consumption of stanol ester margarine. *American Journal of Clinical Nutrition*, **71**, 1095 – 1102.
- Miller, N.E.; B. Lewis (1981). *Lipoproteins, atherosclerosis and coronary heart disease*. Elsevier, Amsterdam.
- Mills, G.L.; C.E. Tylaur (1971). The distribution and composition of serum lipoproteins in eighteen animals. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B*, **40**, 489 – 501.
- Mitropoulos, K.A.; S. Balasubramaniam (1976). The role of glucocorticoids in the regulation of the diurnal rhythm of hepatic β -hydroxy- β -methylglutaryl-coenzyme A reductase and cholesterol 7α -hydroxylase. *Biochemical Journal*, **160**, 49 – 55.
- Mitropoulos, K.A.; S. Balasubramaniam; N.B. Myant (1973). The effect of interruption of the enterohepatic circulation of bile acids and of cholesterol feeding on cholesterol 7α -hydroxylase in relation to the diurnal rhythm in its activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, **326**, 428 – 438.
- Mitropoulos, K.A.; S. Venkatesan; B.E. Reeves; S. Balasubramaniam (1981). Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and of acyl-CoA-cholesterol acyltransferase by the transfer of non-esterified cholesterol to rat liver microsomal vesicles. *Biochemical Journal*, **194**, 265 – 271.
- Moghadasian, M.H. (2000). Pharmacological properties of plant sterols. *In vivo* and *in vitro* observations. *Life Sciences*, **67**, 605 – 615.
- Molgaard, J.; H. von Schenck; A.G. Olsson (1987). Alfalfa seeds lower low density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B concentrations in patients with type II hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis*, **65**, 173 – 179.
- Momsen, W.E.; H.L. Brockman (1977). Purification and characterization of cholesterol esterase from porcine pancreas. *Biochimica et Biophysica Acta*, **486**, 103 – 113.
- Morehouse, L.A.; F.-W. Bangerter; M.P. DeNinno; P.B. Inskeep; P.A. McCarthy; J.L. Pettini; Y.E. Savoy; E.D. Sugarman; R.W. Wilkins; T.C. Wilson; H.A. Woody; L.M. Zaccaro; C.E. Chandler (1999). Comparison of synthetic saponin cholesterol absorption inhibitors in rabbits: evidence for a non-stoichiometric, intestinal mechanism of action. *Journal of Lipid Research*, **40**, 464 – 474.
- Morita, T.; A. Oh-Hashi; K. Takei; M. Ikai; S. Kasaok; S. Kiriyaama (1997). Cholesterol-lowering effects of soybean, potato and rice proteins depend on their low methionine contents in rats fed a cholesterol-free purified diet. *Journal of Nutrition*, **127**, 470 – 477.
- Morre, D.J. (1981). An alternative pathway for secretion of lipoprotein particles in rat liver. *European Journal of Cell Biology*, **26**, 21 – 25.
- Mukherjee, S.; G. Kunitake; R.B. Alfin-Slater (1958). The esterification of cholesterol with palmitic acid by rat liver homogenates. *Journal of Biological Chemistry*, **230**, 91 – 96.
- Murata, M.; J. Peranen; R. Schreiner; F. Wieland; T.V. Kurzchalia; K. Simons; (1995). VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **92**, 10339 – 10343.
- Murthy, S.K.; J. Ganguly; J.S.K. David (1963). Some observations on the mechanism of absorption of cholesterol in rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, **70**, 490 – 492.
- Myant, N.B. (1982). Cholesterol transport through the plasma. *Clinical Science*, **62**, 261 – 271.
- Myant, N.B.; K.A. Mitropoulos (1977). Cholesterol 7α -hydroxylase. *Journal of Lipid Research*, **18**, 135 – 153.
- Nagata, Y.; N. Ishiwaki; M. Sugano (1982). Studies on the mechanism of anti-hypercholesterolemic action of soy protein and soy protein-type amino acid mixtures in relation to the casein counterparts in rats. *Journal of Nutrition*, **112**, 1614 – 1625.

- Nagengast, F.M.; M.J. Grubben; I.P. Van Munster (1995). Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. *European Journal of Cancer*, **31**, 1067 – 1070.
- Nakamura, M.; Y. Tanigichi; M. Yamamoto; K. Hino; M. Manabe (1997). Homogenous assay of serum LDL-cholesterol on an automatic analyzer. *Clinical Chemistry*, **43 (suppl. 6)**, 718.
- Nakaya, N.; B.H. Chung; J.R. Patsch; O.D. Taunton (1977). Synthesis and release of low density lipoproteins by the isolated perfused pig liver. *Journal of Biological Chemistry*, **252**, 7530 – 7533.
- Nervi, F.O.; C. Covarrubias; P. Bravo; N. Velasco; N. Ulloa; F. Cruz; M. Fava; C. Severin; R. Del Pozo; C. Antezana (1989). Influence of legume intake on biliary lipids and cholesterol saturation in young Chilean men. Identification of a dietary risk factor for cholesterol gallstone formation in a highly prevalent area. *Gastroenterology*, **96**, 825 – 830.
- Nervi, F.O.; H.J. Weis; J.M. Dietschy (1975). The kinetic characteristics of inhibition of hepatic cholesterologenesis by lipoproteins of intestinal origin. *Journal of Biological Chemistry*, **250**, 4145 – 4151.
- Ness, G.C.; C.M. Chambers (2000). Feedback and hormonal regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: The concept of cholesterol buffering capacity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **224**, 8 – 19.
- Newman, H.A.; F.A. Kummerov; H.H. Scott (1957). Dietary saponin, a factor which may reduce liver and serum cholesterol levels. *Poultry Science*, **37**, 42 – 45.
- Nguyen, L.B.; S. Shefer; G. Salen; J.Y. Chiang; M. Patel (1996). Cholesterol 7 α -hydroxylase activities from human and rat liver are modulated *in vitro* post-translationally by phosphorylation/dephosphorylation. *Hepatology*, **24**, 1468 – 1474.
- Nishina, P.M.; R.A. Freedland (1990). Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. *Journal of Nutrition*, **120**, 668 – 673.
- Noblet, J.; H. Fortune; S. Dubois; Y. Henry (1989). *Nouvelles bases d'estimation des teneurs en énergie digestible métabolisable et nette des aliments pour le porc*. INRA, Paris.
- Norlin, M. (2002). Expression of key enzymes in bile acid biosynthesis during development: CYP7B1-mediated activities show tissue-specific differences. *Journal of Lipid Research*, **43**, 721 – 731.
- Normann, P.T.; K.R. Norum (1976). Newly synthesized hepatic cholesterol as precursor for cholesterol and bile acids in rat bile. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **11**, 427 – 432.
- Norum, K.R.; A.C. Lilljeqvist; P. Helgerud; E.R. Normann; A. Mo; B. Selbekk (1979). Esterification of cholesterol in human small intestine: the importance of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. *European Journal of Clinical Investigation*, **9**, 55 – 62.
- Oakenfull, D.G. (1981). Saponins in food: a review. *Food Chemistry*, **7**, 19 – 40.
- Oakenfull, D.G.; D.E. Fenwick (1978). Adsorption of bile salts from aqueous solution by plant fibre and cholestyramine. *British Journal of Nutrition*, **40**, 299 – 309.
- Oakenfull, D.G.; D.L. Topping; R.L. Illman; D.E. Fenwick (1984). Prevention of dietary hypercholesterolaemia in the rat by soya bean and quillaja saponins. *Nutrition Reports International*, **29**, 1039 – 1046.
- Ohashi, M.; B.R. Carr; E.R. Simpson (1982). Lipoprotein-binding sites in human corpus luteum membrane fractions. *Endocrinology*, **110**, 1477 – 1482.
- Okuda, K.I. (1994). Liver mitochondrial P450 involved in cholesterol catabolism and vitamin D activation. *Journal of Lipid Research*, **35**, 361 – 372.
- Olson, R.E.; J.R. Jablonski; E. Taylor (1958). The effect of dietary protein, fat, and choline upon the serum lipids and lipoproteins of the rat. *American Journal of Clinical Nutrition*, **6**, 111 – 118.
- Orzechowski, A.; P. Ostaszewski; M. Jank; S.J. Berwid (2002). Bioactive substances of plant origin in food - impact on genomics. *Reproduction, Nutrition and Development*, **42**, 461 – 477.

- Pakarinen, M.; T.A. Miettinen; J. Lauronen; P. Kuusamaki; P. Raivio; T. Kivisto; J. Halttunen (1996). Adaptation of cholesterol absorption after proximal resection of porcine small intestine. *Journal of Lipid Research*, **37**, 1766 – 1775.
- Pandak, W.M.; D.M. Heuman; Z.R. Vlahcćevic (1998). Species differences in the response of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A) and sterol 27-hydroxylase (CYP27) to excess cholesterol. *Hepatology*, **28**, 379A.
- Pandak, W.M.; Z.R. Vlahcćevic; D.M. Heuman; K.S. Redford; J.Y. Chiang; P.B. Hylemon (1994). Effects of different bile salts on steady-state mRNA levels and transcriptional activity of cholesterol 7 α -hydroxylase. *Hepatology*, **19**, 941 – 947.
- Panini, S.R.; A. Gupta; R.C. Sexton; E.J. Parish; H. Rudney (1987). Regulation of sterol biosynthesis and of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity in cultured cells by progesterone. *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 11435 – 11440.
- Panzenboeck, U.; Z. Balazs; A. Sovic; A. Hrzenjak; S. Levak-Frank; A. Wintersperger; E. Malle; W. Sattler (2002). ABCA1 and scavenger receptor class B, type I, are modulators of reverse sterol transport at an *in vitro* blood-brain barrier constituted of porcine brain capillary endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 42781 – 42789.
- Papahadjopoulos, D.; M. Cowden; H. Kimelberg (1973). Role of cholesterol in membranes. Effects on phospholipid-protein interactions, membrane permeability and enzymatic activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, **330**, 8 – 26.
- Pattnaik, N.M.; A. Montes; L.B. Hughes; D.B. Zilversmit (1978). Cholesteryl ester exchange protein in human plasma. Isolation and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*, **530**, 428 – 438.
- Paul, A.; L. Calleja; L. Joven; E. Vilella; N. Ferre; J. Camps; J. Girona; J. Osada (2001). Supplementation with vitamin E and/or zinc does not attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice fed a high-fat, high-cholesterol diet. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, **71**, 45 – 52.
- Pavelka, M.; A. Gangl (1983). Effects of colchicine on the intestinal transport of endogenous lipid. Ultrastructural, biochemical, and radiochemical studies in fasting rats. *Gastroenterology*, **84**, 544 – 555.
- Peng, S.K.; K.J. Ho; B. Mikkelsen; C.B. Taylor (1973). Studies on cholesterol metabolism in rats by application of D₂O and mass spectrometry. *Atherosclerosis*, **18**, 197 – 213.
- Perrodin, M.; C. Lutton (1985). *In vivo* cholesterol synthesis by the rat digestive tract. 1. A topological study. *Reproduction, Nutrition, Development*, **25**, 647 – 657.
- Petterson, D.S. (1998). Composition and food uses of lupins. In: *Lupins as crop plants: Biology, production and utilization*. (Editado por Gladstones, J.S.; C.A. Atkins; J. Hamblin) CAB International, Wallingford, UK, 353 – 384.
- Pfeuffer, M.; F. Ahrens; H. Hagemester; C.A. Barth (1988). Influence of casein versus soy protein isolate on lipid metabolism of minipigs. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **32**, 83 – 89.
- Philipp, B.W.; D.J. Shapiro (1979). Improved method for the assay and activation of hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase. *Journal of Lipid Research*, **20**, 588 – 593.
- Phillips, M.C.; W.J. Johnson; G.H. Rothblat (1987). Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer. *Biochimica et Biophysica Acta*, **906**, 223 – 276.
- Phillips, M.C.; L.R. McLean; G.W. Stoudt; G.H. Rothblat (1980). Mechanism of cholesterol efflux from cells. *Atherosclerosis*, **36**, 409 – 422.
- Pittman, R.C.; A.D. Attie; T.E. Carew; D. Steinberg (1979). Tissue sites of degradation of low density lipoprotein: application of a method for determining the fate of plasma proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **76**, 5345 – 5349.
- Pond, W.G.; H.J. Mersmann; L.D. Young (1986). Heritability of plasma cholesterol and triglyceride concentrations in swine. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **182**, 221 – 224.

- Potter, S.M. (1995). Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *Journal of Nutrition*, **125**, 606S – 611S.
- Potter, S.M. (1998). Soy protein and cardiovascular disease: the impact of bioactive components in soy. *Nutrition Reviews*, **56**, 231 – 235.
- Potter, S.M.; R. Jimenez-Flores; J.A. Pollack; T.A. Lone; M.D. Berber-Jimenez (1993). Protein-saponin interaction and its influence on blood lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**, 1287 – 1291.
- Price, K.R.; C.L. Curl; G.R. Fenwick (1986). The saponin content and sapogenol composition of the seed of 13 varieties of legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **37**, 1185 – 1191.
- Princen, H.M.; S.M. Post; Y. Twisk (1997). Regulation of bile acid biosynthesis. *Current Pharmaceutical Design*, **3**, 59 – 84.
- Pussinen, P.; M. Jauhianinen; J. Metso; J. Tynnela; C. Ehnholm (1995). Pig plasma phospholipid transfer protein facilitates HDL interconversion. *Journal of Lipid Research*, **36**, 975 – 985.
- Quemener, B. (1988). Improvements in the high-pressure liquid-chromatographic determination of amino-sugars and α -galactosides in faba bean, lupine, and pea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **36**, 754 – 759.
- Rachmilewitz, D.; P. Sharon; S. Eisenberg (1980). Lipoprotein synthesis and secretion by cultured human intestinal mucosa. *European Journal of Clinical Investigation*, **10**, 125 – 131.
- Rachmilewitz, D.; O. Stein; P.S. Roheim; Y. Stein (1972). Metabolism of iodinated high density lipoproteins in the rat. II. Autoradiographic localization in the liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, **270**, 414 – 425.
- Rahman, M.H.; A. Hossain; A. Siddiqua; I. Hossain (1996). Hemato-biochemical parameters in rats fed *Lupinus angustifolius* L (sweet lupin) seed protein and fiber fractions. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, **20**, 99 – 111.
- Ramesha, C.S.; R. Paul; J. Ganguly (1980). Effect of dietary unsaturated oils on the biosynthesis of cholesterol, and on biliary and fecal excretion of cholesterol and bile acids in rats. *Journal of Nutrition*, **110**, 2149 – 2158.
- Reddy, B.S.; K. Watanabe; A. Sheinfil (1980). Effect of dietary wheat bran, alfalfa, pectin and carrageenan on plasma cholesterol and fecal bile acid and neutral sterol excretion in rats. *Journal of Nutrition*, **110**, 1247 – 1254.
- Redgrave, T.G.; D.M. Small (1979). Quantitation of the transfer of surface phospholipid of chylomicrons to the high density lipoprotein fraction during the catabolism of chylomicrons in the rat. *Journal of Clinical Investigation*, **64**, 162 – 171.
- Reed, B.C.; H.C. Rilling (1975). Crystallization and partial characterization of prenyltransferase from avian liver. *Biochemistry*, **14**, 50 – 54.
- Reichen, J. (1999). The role of the sinusoidal endothelium in liver function. *News in Physiological Sciences*, **14**, 117 – 121.
- Repa, J.J.; K.E. Berge; C. Pomajzl; J.A. Richardson; H. Hobbs; D.J. Mangelsdorf (2002). Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors α and β . *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 18793 – 18800.
- Repa, J.J.; D.J. Mangelsdorf (1999). Nuclear receptor regulation of cholesterol and bile acid metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, **10**, 557 – 563.
- Repa, J.J.; S.D. Turley; J.A. Lobaccaro; J. Medina; L. Li; K. Lustig; B. Shan; R.A. Heyman; J.M. Dietschy; D.J. Mangelsdorf (2000). Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science*, **289**, 1524 – 1529.
- Reynier, M.O.; J.C. Montet; C. Marteau; C. Crotte; A.M. Montet; A. Gerolami; H. Sarles (1979). Intestinal absorption and micellar solubilisation of cholesterol. *Gastroenterology*, **76**, 1225.

- Rhainds, D.; L. Brissette (1999). Low density lipoprotein uptake: holoparticle and cholesteryl ester selective uptake. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **31**, 915 – 931.
- Riottot, M.; P. Olivier; A. Huet; J.J. Caboche; M. Parquet; J. Khallou; C. Lutton (1993). Hypolipidemic effects of β -cyclodextrin in the hamster and in the genetically hypercholesterolemic Rico rat. *Lipids*, **28**, 181 – 188.
- Riottot, M.; E. Sacquet (1985). Increase in the ileal absorption rate of sodium taurocholate in germ-free and conventional rats given an amylo maize diet. *British Journal of Nutrition*, **53**, 307 – 310.
- Riottot M.; E. Sacquet; J.P. Vila; C. Leprince (1980). Relationship between small intestine transit and bile acid metabolism in axenic and holoxenic rats fed different diets. *Reproduction, Nutrition, Development*, **20**, 163 – 171.
- Rioux, F.M.; S.M. Innis (1993). Cholesterol and fatty acid metabolism in piglets fed sow milk or infant formula with or without addition of cholesterol. *Metabolism*, **42**, 1552 – 1559.
- Rogers, D.H.; D.N. Kim; K.T. Lee; J.M. Reiner; W.A. Thomas (1981). Circadian variation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in swine liver and ileum. *Journal of Lipid Research*, **22**, 811 – 819.
- Rothblat, G.H.; L.Y. Arbogast; E.K. Ray (1978). Stimulation of esterified cholesterol accumulation in tissue culture cells exposed to high density lipoproteins enriched in free cholesterol. *Journal of Lipid Research*, **19**, 350 – 358.
- Rothblat, G.H.; M. de la Llera-Moya; V. Atger; G. Kellner-Weibel; D.L. Williams; M.C. Phillips (1999). Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *Journal of Lipid Research*, **40**, 781 – 796.
- Rothblat, G.H.; M.C. Phillips (1982). Mechanism of cholesterol efflux from cells. Effects of acceptor structure and concentration. *Journal of Biological Chemistry*, **257**, 4775 – 4782.
- Rothschild, M.F.; A.B. Chapman (1976). Factors influencing serum cholesterol levels in swine. *Journal of Heredity*, **67**, 47 – 48.
- Rubio, L.A.; A. Brenes; C. Centeno (2003). Effects of feeding growing broiler chickens with practical diets containing sweet lupin (*Lupinus angustifolius*) seed meal. *British Poultry Science*, **44**, 391 – 397.
- Rubio, L.A.; G. Grant; T. Daguid; D. Brown; A. Puzstai (1999). Organs relative weight and plasma amino acid concentrations in rats fed diets based on whole legume (faba bean, lupin, chickpea, defatted soybean) seed meals or their fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **79**, 187 – 194.
- Rudel, L.L.; M.D. Morris; J.M. Felts (1972). The transport of exogenous cholesterol in the rabbit. I. Role of cholesterol ester of lymph chylomicra and lymph very low density lipoproteins in absorption. *Journal of Clinical Investigation*, **51**, 2686 – 2692.
- Russell, D.W.; K.D. Setchell (1992). Bile acid biosynthesis. *Biochemistry*, **31**, 4737 – 4749.
- Sacquet, E.; C. Leprince; M. Riottot (1982). Dietary fiber and cholesterol and bile acid metabolisms in axenic (germfree) and holoxenic (conventional) rats. I. Effect of wheat bran. *Reproduction, Nutrition, Development*, **22**, 291 – 305.
- Sacquet, E.; C. Leprince; M. Riottot (1983). Effect of amylo maize starch on cholesterol and bile acid metabolisms in germfree (axenic) and conventional (holoxenic) rats. *Reproduction, Nutrition, Development*, **23**, 783 – 792.
- Sadzikowski, M.R.; J.F. Sperry; T.D. Wilkins (1977). Cholesterol-reducing bacterium from human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, **34**, 355 – 362.
- Salgado, P.; J.M. Martins; F. Carvalho; M. Abreu; J.P.B. Freire; R. Toullec; J.P. Lalles; O. Bento (2002). Component digestibility of lupin (*Lupinus angustifolius*) and pea (*Pisum sativum*) seeds and effects on the small intestine and body organs in anastomosed and intact growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, **98**, 187 – 201.

- Scallen, T.J.; B. Seetharam; M.V. Srikantaiah; E. Hansbury; M.K. Lewis (1975). Sterol carrier protein hypothesis: requirement for three substrate-specific soluble proteins in liver cholesterol biosynthesis. *Life Sciences*, **16**, 853 – 873.
- Schaefer, E.J.; S. Eisenberg; R.I. Levy (1978). Lipoprotein apoprotein metabolism. *Journal of Lipid Research*, **19**, 667 – 687.
- Schiff, E.R.; N.C. Small; J.M. Dietschy (1972). Characterization of the kinetics of the passive and active transport mechanisms for bile acid absorption in the small intestine and colon of the rat. *Journal of Clinical Investigation*, **51**, 1351 – 1362.
- Schneider, D.L.; D.G. Gallo; H.P. Sarett (1966). Effect of cholestyramine on cholesterol metabolism in young adult swine. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **121**, 1244 – 1248.
- Schneider, W.J.; U. Beisiegel; J.L. Golstein; M.S. Brown (1982). Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164,000 molecular weight. *Journal of Biological Chemistry*, **257**, 2664 – 2673.
- Scholz-Ahrens, K.E.; H. Hagemester; J. Unshelm; N. Agergaard; C.A. Barth (1990). Response of hormones modulating plasma cholesterol to dietary casein or soy protein in minipigs. *Journal of Nutrition*, **120**, 1387 – 1392.
- Schwartz, C.C.; L.G. Halloran; Z.R. Vlahcovic; D.H. Gregory; L. Swell (1978). Preferential utilization of free cholesterol from high-density lipoproteins for biliary cholesterol secretion in man. *Science*, **200**, 62 – 64.
- Schwarz, M.; E-G. Lund; R. Lathe; I. Björkhem; D.W. Russell (1997). Identification and characterization of a mouse oxysterol 7 α -hydroxylase cDNA. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 23995 – 24001.
- Schwartz, M.; S. Margolis (1983). Effects of drugs and sterols on cholesterol 7 α -hydroxylase activity in rat liver microsomes. *Journal of Lipid Research*, **24**, 28 – 33.
- Scow, R.O.; E.J. Blanchette-Mackie; L.C. Smith (1980). Transport of lipid across capillary endothelium. *Federation Proceedings*, **39**, 2610 – 2617.
- Setchell, K.D. (1998). Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *American Journal of Clinical Nutrition*, **68**, 1333S – 1346S.
- Shakir, K.M.; S.G. Sundaram; S. Margolis (1978). Lipid synthesis in isolated intestinal cells. *Journal of Lipid Research*, **19**, 433 – 442.
- Shapiro, D.J.; V.W. Rodwell (1971). Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **246**, 3210 – 3216.
- Sharma, R.D. (1984). Hypocholesterolemic effect of hydroxy acid components of Bengal gram. *Nutrition Reports International*, **29**, 1315 – 1322.
- Sharma, R.D. (1986). An evaluation of hypocholesterolaemic factor of fenugreek seeds (*T. foenum-graecum*) in rats. *Nutrition Reports International*, **33**, 669 – 677.
- Shefer, S.; S. Hauser; V. Lapor; E.H. Mosbach (1973). Regulatory effects of sterols and bile acids on hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase in the rat. *Journal of Lipid Research*, **14**, 573 – 580.
- Shepherd, J.; C.J. Packard; S.M. Grundy; D. Yeshurun; A.M. Gotto Jr.; O.D. Taunton (1980). Effects of saturated and polyunsaturated fat diets on the chemical composition and metabolism of low density lipoproteins in man. *Journal of Lipid Research*, **21**, 91 – 99.
- Shneider, B.L. (2001). Intestinal bile acid transport: biology, physiology, and pathophysiology. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **32**, 407 – 417.
- Shorey, R.L.; P.J. Day; R.A. Willis; G.S. Lo; F.H. Steinke (1985). Effects of soybean polysaccharide on plasma lipids. *Journal of the American Dietetic Association*, **85**, 1461 – 1465.
- Shutler, S.M. (1988). *Investigations into the hypocholesterolaemic effect of legumes*. PhD thesis, University of Reading.

- Shutler, S.M.; G.M. Bircher; J.A. Tredger; L.M. Morgan; A.F. Walker; A.G. Low (1989). The effect of daily baked bean (*Phaseolus vulgaris*) consumption on the plasma lipid levels of young, normo-cholesterolaemic men. *British Journal of Nutrition*, **61**, 257 – 265.
- Shutler, S.M.; A.G. Low; A.F. Walker (1988). Comparative effect of four different legume species on the plasma lipid levels of hypercholesterolaemic pigs. *Proceedings of the Nutrition Society*, **47**, 124A.
- Shutler, S.M.; A.F. Walker; A.G. Low (1987a). The cholesterol-lowering effects of legumes. I. Effects of the major nutrients. *Human Nutrition: Food Sciences and Nutrition*, **41F**, 71 – 86.
- Shutler, S.M.; A.F. Walker; A.G. Low (1987b). The cholesterol-lowering effects of legumes. II. Effects of fibre, sterols, saponins and isoflavones. *Human Nutrition: Food Sciences and Nutrition*, **41F**, 87 – 102.
- Shutt, D.A.; R.I. Cox (1972). Steroid and phyto-oestrogen binding to sheep uterine receptors *in vitro*. *Journal of Endocrinology*, **52**, 299 – 310.
- Siddiqui, M.T.; M. Siddiqui (1976). Hypolipidemic principles of *Cicer arietinum*: biochanin-A and formononetin. *Lipids*, **11**, 243 – 246.
- Sidhu, G.S.; D.G. Oakenfull (1986). A mechanism for the hypocholesterolaemic activity of saponins. *British Journal of Nutrition*, **55**, 643 – 649.
- Siljander-Rasi, H.; M. Jauhiainen; S.M. Blomqvist; T. Alaviuhkola; A. Kempainen; A. Aro; K. Suomi; V. Kankare (1994). Effects of dietary fats on serum lipoproteins in growing pigs. In: *Proceedings of the Vith International Symposium on Digestive Physiology in Pigs Volume II*. (Editado por Souffrant, W.-B.; H. Hagemester) EAAP Publication n°80, 411 – 414.
- Silverstein, S.C.; R.M. Steinman; Z.A. Cohn (1977). Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, **46**, 669 – 722.
- Simons, L.A.; S. Gayst; S. Balasubramaniam; J. Ruys (1982). Long-term treatment of hypercholesterolaemia with a new palatable formulation of guar gum. *Atherosclerosis*, **45**, 101 – 108.
- Sindhurani, J.A.; T. Rajamohan (1998). Hypolipidemic effect of hemicellulose component of coconut fiber. *Indian Journal of Experimental Biology*, **36**, 786 – 789.
- Siperstein, M.D.; I.L. Chaikoff; W.O. Reinhardt (1952a). ¹⁴C-cholesterol. V. Obligatory function of bile in intestinal absorption of cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, **198**, 111 – 114.
- Siperstein, M.D.; V.M. Fagan (1966). Feedback control of mevalonate synthesis by dietary cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, **241**, 602 – 609.
- Siperstein, M.D.; M.E. Jayko; I.L. Chaikoff; W.G. Dauben (1952b). Nature of the metabolic products of C¹⁴-cholesterol excreted in bile and feces. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **81**, 720 – 724.
- Sirtori, C.R.; R. Bosisio; F. Pazzucconi; A. Bondioli; E. Gatti; M.R. Lovati; P. Murphy (2000). Soy milk with a high glycitein content does not reduce low-density lipoprotein cholesterolemia in type II hypercholesterolemic patients. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **46**, 88 – 92.
- Sirtori, C.R.; G. Galli; M.R. Lovati; P. Carrara; E. Bosisio; M.G. Kienle (1984). Effects of dietary proteins on the regulation of liver lipoprotein receptors in rats. *Journal of Nutrition*, **114**, 1493 – 1500.
- Sirtori, C.R.; M.R. Lovati (2001). Soy proteins and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, **3**, 47 – 53.
- Slakey, L.L.; M.C. Craig; E. Beytia; A. Briedis; D.H. Fedlbruegge; R.E. Dugan; A.A. Qureshi; C. Subbarayan; J.W. Porter (1972). The effects of fasting, refeeding, and time of day on the levels of enzymes effecting the conversion of β -hydroxy- β -methylglutaryl-coenzyme A to squalene. *Journal of Biological Chemistry*, **247**, 3014 – 3022.
- Smith, D.R. (1998). Animal models: nutrition and lipoprotein metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, **9**, 3 – 6.

- Solomons, T.W.G. (1987). *Química orgánica. Volume 3*. Livros Técnicos e Científicos Editora, Rio de Janeiro.
- Soni, G.L.; M. George; R. Singh (1982). Role of common Indian pulses as hypocholesterolaemic agents. *Indian Journal of Nutrition and Dietetics*, **19**, 184 – 190.
- Souidi, M.; S. Dubrac; M. Parquet; F. Milliat; J. Férézou; C. Sérougne; C. Loison; M. Riottot; N. Boudem; T. Bécue; C. Lutton (2003). Effects of dietary 27-hydroxycholesterol on cholesterol metabolism and bile acid biosynthesis in the hamster. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **81**, 854 – 863.
- Souidi, M.; M. Parquet; S. Dubrac; C. Lutton (2001). Les nouvelles voies de la biosynthèse des acides biliaries. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, **25**, 81 – 92.
- Souidi, M.; M. Parquet; J. Férézou; C. Lutton (1999). Modulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase activities by steroids and physiological conditions in hamster. *Life Sciences*, **64**, 1585 – 1593.
- Souidi, M.; M. Parquet; C. Lutton (1998). Improved assay of hepatic microsomal cholesterol 7 α -hydroxylase activity by the use of hydroxypropyl β -cyclodextrin and an NADPH-regenerating system. *Clinica Chimica Acta*, **269**, 201 – 217.
- Spady, D.K.; J.M. Dietschy (1983). Sterol synthesis *in vivo* in 18 tissues of the squirrel monkey, guinea pig, rabbit, hamster, and rat. *Journal of Lipid Research*, **24**, 303 – 315.
- Spritz, N.; M.A. Mishkel (1969). Effects of dietary fats on plasma lipids and lipoproteins: an hypothesis for the lipid-lowering effect of unsaturated fatty acids. *Journal of Clinical Investigation*, **48**, 78 – 86.
- Stark, A.H.; Z. Madar (1993). *In vitro* production of short-chain fatty acids by bacterial fermentation of dietary fiber compared with effects of those fibers on hepatic sterol synthesis in rats. *Journal of Nutrition*, **123**, 2166 – 2173.
- Stein, O.; G. Halperin; Y. Stein (1981). Interaction between macrophages and aortic smooth muscle cells. Enhancement of cholesterol esterification in smooth muscle cells by media of macrophages incubated with acetylated LDL. *Biochimica et Biophysica Acta*, **665**, 477 – 490.
- Stein, Y.; M.C. Glangeaud; M. Fainaru; O. Stein (1975). The removal of cholesterol from aortic smooth muscle cells in culture and Landschutz ascites cells by fractions of human high-density apolipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta*, **380**, 106 – 118.
- Stokke, K.T. (1972). Subcellular distribution and kinetics of the acid cholesterol esterase in liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, **280**, 329 – 335.
- Stokke, K.T. (1974). Cholesteryl ester metabolism in liver and blood plasma of various animal species. *Atherosclerosis*, **19**, 393 – 406.
- Stokke, K.T.; K.R. Norum (1970). Subcellular distribution of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in rat liver cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **210**, 202 – 204.
- Stravitz, R.T.; Z.R. Vlahcovic; T.L. Russell; M.L. Heizer; N.G. Avadhani; P.B. Hylemon (1996). Regulation of sterol 27-hydroxylase and an alternative pathway of bile acid biosynthesis in primary cultures of rat hepatocytes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **57**, 337 – 347.
- Stuchlík, M.; S. Zák (2002). Vegetable lipids as components of functional foods. *Biomedical Papers*, **146**, 3 – 10.
- Sugano, M.; S. Goto; Y. Yamada; K. Yoshida; Y. Hashimoto; T. Matsuo; M. Kimoto (1990). Cholesterol-lowering activity of various undigested fractions of soybean protein in rats. *Journal of Nutrition*, **120**, 977 – 985.
- Sugano, M.; T. Ide; H. Okamatsu; Y. Fujisaki; H. Takahara (1980). Dietary modification of the distribution of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and sterol synthesizing activities in the rat small intestine. *Journal of Nutrition*, **110**, 360 – 370.

- Sugiuchi, H.; Y. Uji; H. Okabe; T. Irie; K. Uekama; N. Kayahara; K. Miyauchi (1995). Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulphated α -cyclodextrin. *Clinical Chemistry*, **41**, 717 – 723.
- Swell, L.; T.A. Boiter; H. Field; C.R. Treadwell (1955). The absorption of dietary cholesterol esters. *American Journal of Physiology*, **180**, 129 – 132.
- Swell, L.; M.D. Law (1966). Labeling of liver and serum cholesterol esters after the injection of cholesterol-4-C14 and cholesterol-4-C14 esters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **113**, 143 – 149.
- Swell, L.; C.R. Treadwell; M.D. Law (1964). Esterification of cholesterol in rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **104**, 128 – 138.
- Swenson, M.J. (1993). Propriedades fisiológicas e constituintes químicos e celulares do sangue. In: *Fisiologia dos animais domésticos*. (Editado por Swenson, M.J.; W.O. Reece) Guanabara Koogan S.A. (11ª Edição), Rio de Janeiro, 19 – 43.
- Syven, C. (1970). Influence of blood supply on lipid uptake from micellar solutions by the rat small intestine. *Biochimica et Biophysica Acta*, **203**, 365 – 375.
- Syven, C.; B. Borgström (1969). Absorption and lymphatic transport of cholesterol and sitosterol in the rat. *Journal of Lipid Research*, **10**, 179 – 182.
- Syven, C.; C. Nordstrom (1970). The site of absorption of cholesterol and sitosterol in the rat small intestine. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **5**, 57 – 63.
- Tabacik, C.; S. Aliau; M. Astruc; A.C. de Paulet (1981). Squalene epoxidase, oxydo-squalene cyclase and cholesterol biosynthesis in normal and tumoral mucosa of the human gastrointestinal tract. Evidence of post-HMG CoA regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **666**, 433 – 441.
- Tall, A.R.; D.M. Small (1978). Plasma high-density lipoproteins. *New England Journal of Medicine*, **299**, 1232 – 1236.
- Tanaka, K.; B. Aso; M. Sugano (1984). Biliary steroid excretion in rats fed soybean protein and casein or their amino acid mixtures. *Journal of Nutrition*, **114**, 26 – 32.
- Tavormina, P.A.; M.H. Gibbs; J.W. Huff (1956). The utilization of β -hydroxy- β -methyl- δ -valerolactone in cholesterol biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, **78**, 4498 – 4499.
- Taylor, J.A.; D.N. Salter; W.H. Close; G.H. Laswai (1992). Serum concentrations of insulin-like growth factor 1 and cholesterol in relation to protein and fat deposition in growing pigs. *Animal Production*, **55**, 257 – 264.
- Terpstra, A.H.; R.J. Hermus; C.E. West (1983). The role of dietary protein in cholesterol metabolism. *World Review of Nutrition and Dietetics*, **42**, 1 – 55.
- Terpstra, A.H.; J.C. Holmes; R.J. Nicolosi (1991). The hypocholesterolemic effect of dietary soybean protein vs. casein in hamsters fed cholesterol-free or cholesterol-enriched semipurified diets. *Journal of Nutrition*, **121**, 944 – 947.
- Terpstra, A.H.; F.J. Sanchez-Muniz (1981). Time course of the development of hypercholesterolemia in rabbits fed semipurified diets containing casein or soybean protein. *Atherosclerosis*, **39**, 217 – 227.
- Terpstra, A.H.; F.J. Sanchez-Muniz; C.E. West; C.J. Woodward (1982a). The density profile and cholesterol concentration of serum lipoproteins in domestic and laboratory animals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, **71**, 669 – 673.
- Terpstra, A.H.; G. van Tintelen; C.E. West (1982b). The hypocholesterolemic effect of dietary soy protein in rats. *Journal of Nutrition*, **112**, 810 – 817.
- Thacker, P.A.; M.O. Salomons; F.X. Aherne; L.P. Milligan; J.P. Bowland (1981). Influence of propionic acid on the cholesterol metabolism of pigs fed hypercholesterolemic diets. *Canadian Journal of Animal Sciences*, **61**, 969 – 975.

- Thewles, A.; R.A. Parslow; R. Coleman (1993). Effect of diosgenin on biliary cholesterol transport in the rat. *Biochemical Journal*, **291**, 793 – 798.
- Thomas P.J.; A.F. Hofmann (1973). Letter. A simple calculation of the lithogenic index of bile: expressing biliary lipid composition on rectangular coordinates. *Gastroenterology*, **65**, 698 – 700.
- Thompson, L.U. (1993). Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Research International*, **26**, 131 – 149.
- Thomson, A.B.R.; J.M. Dietschy (1981). Intestinal lipid absorption: major extracellular and intracellular events. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*. (Editado por Johnson, L.R.) Raven Press, New York, Volume 2, 1147 – 1220.
- Toll, A.; K. Wikvall; E. Sudjana-Sugiaman; K.H. Kondo; I. Björkhem (1994). 7 α -Hydroxylation of 25-hydroxycholesterol in liver microsomes. Evidence that the enzyme involved is different from cholesterol 7 α -hydroxylase. *European Journal of Biochemistry*, **224**, 309 – 316.
- Topping, D.L. (1991). Soluble fiber polysaccharides: effects on plasma cholesterol and colonic fermentation. *Nutrition Reviews*, **49**, 195 – 203.
- Topping, D.L.; R.J. Illman; J.M. Clarke; R.P. Trimble; K.A. Jackson; Y. Marsono (1993). Dietary fat and fiber alter large bowel and portal venous volatile fatty acids and plasma cholesterol but not biliary steroids in pigs. *Journal of Nutrition*, **123**, 133 – 143.
- Topping, D.L.; G.B. Storer; G.D. Calvert; R.J. Illman; D.G. Oakenfull; R.A. Weller (1980). Effects of dietary saponins on fecal bile acids and neutral sterols, plasma lipids and lipoprotein turnover in the pig. *American Journal of Clinical Nutrition*, **33**, 783 – 786.
- Trowell, H. (1972). Ischemic heart disease and dietary fiber. *American Journal of Clinical Nutrition*, **25**, 926 – 932.
- Truswell, A.S. (1993). Dietary fiber and health. *World Review of Nutrition and Dietetics*, **72**, 148 – 164.
- Tumbleson, M.E.; K.W. Hicklin; M.F. Burks (1976). Serum cholesterol, triglyceride, glucose and total bilirubin concentrations, as functions of age and sex, in Sinclair (S-1) miniature swine. *Growth*, **40**, 293 – 300.
- Turley, S.D.; J.M. Dietschy (1978). Reevaluation of the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile. *Journal of Lipid Research*, **19**, 924 – 928.
- Turley, S.D.; J.M. Dietschy (1979). Regulation of biliary cholesterol output in the rat: dissociation from the rate of hepatic cholesterol synthesis, the size of the hepatic cholesteryl ester pool, and the hepatic uptake of chylomicron cholesterol. *Journal of Lipid Research*, **20**, 923 – 934.
- Turley, S.D.; J.M. Dietschy (2003). Sterol absorption by the small intestine. *Current Opinion in Lipidology*, **14**, 233 – 240.
- Turner, P.R.; J. Tuomilehto; P. Happonen; A.E. La Ville; M. Shaikh; B. Lewis (1990). Metabolic studies on the hypolipidaemic effect of guar gum. *Atherosclerosis*, **81**, 145 – 150.
- Twisk, J.; E.C. de Wit; H.M. Princen (1995a). Suppression of sterol 27-hydroxylase mRNA and transcriptional activity by bile acids in cultured rat hepatocytes. *Biochemical Journal*, **305**, 505 – 511.
- Twisk, J.; M.F. Hoekman; E.M. Lehmann; P. Meijer; W.H. Mager; H.M. Princen (1995b). Insulin suppresses bile acid synthesis in cultured rat hepatocytes by down-regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase gene transcription. *Hepatology*, **21**, 501 – 510.
- Twisk, J.; M.F. Hoekman; L.M. Muller; T. Iida; T. Tamaru; A. Ijzerman; W.H. Mager; H.M. Princen (1995c). Structural aspects of bile acids involved in the regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase. *European Journal of Biochemistry*, **228**, 596 – 604.
- Twisk, J.; E.M. Lehmann; H.M. Princen (1993). Differential feedback regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA and transcriptional activity by rat bile acids in primary monolayer cultures of rat hepatocytes. *Biochemical Journal*, **290**, 685 – 691.

- Ulloa, N.; F. Nervi (1985). Mechanism and kinetic characteristics of the uncoupling by plant steroids of biliary cholesterol from bile salt output. *Biochimica et Biophysica Acta*, **837**, 181 – 189.
- Vahouny, G.V.; R. Chanderbhan; A. Kharroubi; B.J. Noland; A. Pastuszyn; T.J. Scallen (1987). Sterol carrier and lipid transfer proteins. *Advances in Lipid Research*, **22**, 83 – 113.
- Vahouny, G.V.; R. Tombes; M.M. Cassidy; D. Kritchevsky; L.L. Gallo (1980). Dietary fibers: V. Binding of bile salts, phospholipids and cholesterol from mixed micelles by bile acid sequestrants and dietary fibers. *Lipids*, **15**, 1012 – 1018.
- Valencia, Z.; E.R. Chavez (1997). Lignin as a purified dietary fiber supplement for piglets. *Nutrition Research*, **17**, 1517 – 1527.
- Van Berkel, T.J.; A. Van Tol; J.F. Koster (1978). Iodine labelled human and rat low-density and high-density lipoprotein degradation by human liver and parenchymal and non-parenchymal cells from rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, **529**, 138 – 146.
- Vance, D.E.; H. Van den Bosch (2000). Cholesterol in the year 2000. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1529**, 1 – 8.
- Van der Meer, R.; A.C. Beynen (1987). Species-dependent responsiveness of serum cholesterol to dietary proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **64**, 1172 – 1177
- Van Soest, P.J.; J.B. Robertson; B.A. Lewis (1991). Carbohydrate methodology, metabolism and nutritional implications in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, **74**, 3583 – 3597.
- Van't Hooft, F.M.; D.A. Hardman; J.P. Kane; R.J. Havel (1982). Apolipoprotein B (B-48) of rat chylomicrons is not a precursor of the apolipoprotein of low density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **79**, 179 – 182.
- Venkatesan, S.; K.A. Mitropoulos (1982). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. The difference in the mechanism of the *in vitro* modulation by phosphorylation and dephosphorylation to modulation of enzyme activity by non-esterified cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta*, **710**, 446 – 455.
- Verrillo, A.; A. de Teresa; P.C. Giarrusso; S. La Rocca (1985). Soybean protein diets in the management of type II hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis*, **54**, 321 – 331.
- Vitic, J.; J. Stevanovic (1993). Comparative studies of the serum lipoproteins and lipids in some domestic, laboratory and wild animals. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **106**, 223 – 229.
- Vlahčević, Z.R.; G. Eggertsen; I. Björkhem; P.B. Hylemon; K. Redford; W.M. Pandak (2000). Regulation of sterol 12 α -hydroxylase and cholic acid biosynthesis in the rat. *Gastroenterology*, **118**, 599 – 607.
- Vlahčević, Z.R.; S.K. Jairath; D.M. Heuman; R.T. Stravitz; P.B. Hylemon; N.G. Avadhani; W.M. Pandak (1996). Transcriptional regulation of hepatic sterol 27-hydroxylase by bile acids. *American Journal of Physiology*, **270**, G646 – G652.
- Vlahčević, Z.R.; R.T. Stravitz; D.M. Heuman; P.B. Hylemon; W.M. Pandak (1997). Quantitative estimations of the contribution of different bile acid pathways to total bile acid synthesis in the rat. *Gastroenterology*, **113**, 1949 – 1957.
- Wade, D.P.; J.S. Owen (2001). Regulation of the cholesterol efflux gene, *ABCA1*. *The Lancet*, **357**, 161 – 163.
- Wang, H.; J. Chen; K. Hollister; L.C. Sowers; B.M. Forman (1999). Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Molecular Cell*, **3**, 543 – 553.
- Wang, L.; M.A. Connelly; A.G. Ostermeyer; H.-H. Chen; D.L. Williams; D.A. Brown (2003). Caveolin-1 does not affect SR-BI-mediated cholesterol efflux or selective uptake of cholesteryl ester in two cell lines. *Journal of Lipid Research*, **44**, 807 – 815.
- Wang, Y.H.; G.H. McIntosh (1996). Extrusion and boiling improve rat body weight gain and plasma cholesterol lowering ability of peas and chickpeas. *Journal of Nutrition*, **126**, 3054 – 3062.

- Watanabe, M.; T. Oku; Y. Shidoji; N. Hosoya (1981). A new aspect on the mechanism of intestinal cholesterol absorption in rat. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **27**, 209 – 217.
- Watt, S.M.; W.J. Simmonds (1976). The specificity of bile salts in the intestinal absorption of micellar cholesterol in the rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **3**, 305 – 322.
- Watt, S.M.; W.J. Simmonds (1981). The effect of pancreatic diversion on lymphatic absorption and esterification of cholesterol in the rat. *Journal of Lipid Research*, **22**, 157 – 165.
- Webb, N.R.; P.M. Connell; G.A. Graf; E.J. Smart; W.J. de Villiers; F.C. de Beer; D.R. van der Westhuyzen (1998). SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 15241 – 15248.
- Weihrauch, J.L.; J.M. Gardner (1978). Sterol content of foods of plant origin. *Journal of the American Dietetic Association*, **73**, 39 – 47.
- Weinstein, D.B.; T.E. Carew; D. Steinberg (1976). Uptake and degradation of low density lipoprotein by swine arterial smooth muscle cells with inhibition of cholesterol biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **424**, 404 – 421.
- Weisgraber, K.H.; R.W. Mahley (1980). Subfractionation of human high density lipoproteins by heparin-Sepharose affinity chromatography. *Journal of Lipid Research*, **21**, 316 – 325.
- Werb, Z.; Z.A. Cohn (1971). Cholesterol metabolism in the macrophage. *Journal of Experimental Medicine*, **134**, 1545 – 1590.
- Wester, I. (2000). Cholesterol-lowering effect of plant sterols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **102**, 37 – 44.
- Westergaard, H.; J.M. Dietschy (1976). The mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal cell. *Journal of Clinical Investigation*, **58**, 97 – 108.
- Wikvall, K. (1984). Hydroxylations in biosynthesis of bile acids. Isolation of a cytochrome P-450 from rabbit liver mitochondria catalyzing 26-hydroxylation of C27-steroids. *Journal of Biological Chemistry*, **259**, 3800 – 3804.
- Wilson, J.D. (1962). Relation between dietary cholesterol and bile acid excretion in the rat. *American Journal of Physiology*, **203**, 1029 – 1032.
- Wilson, J.D.; R.T. Reinke (1968). Transfer of locally synthesized cholesterol from intestinal wall to intestinal lymph. *Journal of Lipid Research*, **9**, 85 – 92.
- Windler, E.; Y. Chao; R.J. Havel (1980a). Determinants of hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants in the rat. *Journal of Biological Chemistry*, **255**, 5475 – 5480.
- Windler, E.; P.T. Kovanen; Y.S. Chao; M.S. Brown; R.J. Havel; J.L. Goldstein (1980b). The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat liver. A binding site that membrane mediates the uptake of rat lipoproteins containing apoproteins B and E. *Journal of Biological Chemistry*, **255**, 10464 – 10471.
- Windmueller, H.G.; P.N. Herbert; R.I. Levy (1973). Biosynthesis of lymph and plasma lipoprotein apoproteins by isolated perfused rat liver and intestine. *Journal of Lipid Research*, **14**, 215 – 223.
- Windmueller, H.G.; A.L. Wu (1981). Biosynthesis of plasma apolipoproteins by rat small intestine without dietary or biliary fat. *Journal of Biological Chemistry*, **256**, 3012 – 3016.
- Woodward, R.B.; K. Bloch (1953). The cyclization of squalene in cholesterol synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, **75**, 2023 – 2024.
- Woollett, L.A.; D.K. Spady; J.M. Dietschy (1992). Saturated and unsaturated fatty acids independently regulate low density lipoprotein receptor activity and production rate. *Journal of Lipid Research*, **33**, 77 – 88.

- Worgall, T.S.; S.L. Sturley; T. Seo; T.F. Osborne; R.J. Deckelbaum (1998). Polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol regulatory elements by decreasing levels of mature sterol regulatory element-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 25537 – 25540.
- Wright, S.M.; A.M. Salter (1993). The effect of dietary casein and soy protein on cholesterol metabolism in hamsters. *Biochemical Society Transactions*, **21**, 155S.
- Wu, A.L.; H.G. Windmueller (1979). Relative contributions by liver and intestine to individual plasma apolipoproteins in the rat. *Journal of Biological Chemistry*, **254**, 7316 – 7322.
- Wu, Z.; K.O. Martin; N.B. Javitt; J.Y.L. Chiang (1999). Structure and functions of human oxysterol 7 α -hydroxylase cDNAs and gene CYP7B1. *Journal of Lipid Research*, **40**, 2195 – 2203.
- Würsch, P.; S. Del Vedovo; B. Koellreutter (1986). Cell structure and starch nature as key determinants of the digestion rate of starch in legume. *American Journal of Clinical Nutrition*, **43**, 25 – 29.
- Xu, G.; G. Salen; S. Shefer; G.S. Tint; L.B. Nguyen; T.S. Chen; D. Greenblatt (1999). Increasing dietary cholesterol induces different regulation of classic and alternative bile acid synthesis. *Journal of Clinical Investigation*, **103**, 89 – 95.
- Yamasmita, H., S. Kuroki; F. Nakayama (1989). An assay of cholesterol 7 α -hydroxylase utilizing a silica cartridge column and 5 α -cholesten-3 β ,7 β -diol as an internal standard. *Journal of Chromatography*, **496**, 255 – 268.
- Yancey, P.G.; J.K. Bielicki; W.J. Johnson; S. Lund-Katz; M.N. Palgunachari; G.M. Anantharamaiah; J.P. Segrest; M.C. Phillips; G.H. Rothblat (1995). Efflux of cellular cholesterol and phospholipid to lipid-free apolipoproteins and class A amphipathic peptides. *Biochemistry*, **34**, 7955 – 7965.
- Yoshie-Stark, Y.; A. Wäsche (2004). *In vitro* binding of bile acids by lupin protein isolates and their hydrolysates. *Food Chemistry*, **88**, 179 – 184.
- Young, S.G.; C.J. Fielding (1999). The ABCs of cholesterol efflux. *Nature Genetics*, **22**, 316 – 318.
- Yudkin, J. (1957). Diet and coronary thrombosis. *The Lancet*, **2**, 694.
- Zavoral, J.H.; P. Hannan; D.J. Fields; M.N. Hanson; I.D. Frantz; K. Kuba; P. Elmer; D.R. Jacobs Jr. (1983). The hypolipidemic effect of locust bean gum food products in familial hypercholesterolemic adults and children. *American Journal of Clinical Nutrition*, **38**, 285 – 294.
- Zhang, Y.; D.J. Mangelsdorf (2002). LuXuRies of lipid homeostasis: The unity of nuclear hormone receptors, transcription regulation, and cholesterol sensing. *Molecular Interventions*, **2**, 78 – 87.
- Zilversmit, D.B. (1967). Formation and transport of chylomicrons. *Federation Proceedings*, **26**, 1599 – 1605.
- Zilversmit, D.B.; L.B. Hughes; J. Balmer (1975). Stimulation of cholesterol ester exchange by lipoprotein-free rabbit plasma. *Biochimica et Biophysica Acta*, **409**, 393 – 398.
- Zubay, G.L. (1998). Metabolism of cholesterol. In: *Biochemistry*. WCB Publishers (4th Edition), USA, 532 – 560.
- Zyriax, B.-C.; E. Windler (2000). Dietary fat in the prevention of cardiovascular disease - a review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **5**, 355 – 365.

VII. ANEXOS

Anexo Ia. Valores bibliográficos referentes à concentração de lípidos plasmáticos de animais da espécie suína em amamentação ou consumindo regimes comerciais ou à base de caseína, sem adição de colesterol

Idade/peso dos animais	Yorkshire						Yorkshire x Landrace (♀)		
	Yorkshire (♂)	Yorkshire (♂)	Yorkshire x Duroc x Hampshire e Chester White x Hampshire (♀, ♂)	Yorkshire x Duroc x Hampshire (♀, ♂)	Landrace x Yorkshire (♀, ♂)	84 d			
	18 d	18 d	12 h	12 d	25 d	45 d	160 d	112 d	140 d
Principais componentes do regime alimentar	Leite	Leite	Leite	Leite	Leite	RC ¹ com soja (9,5%) e milho (77,8%)	RC com soja (32%) e milho (54,4%)	RC com soja (4%) e milho (64,4%)	
Colesterol livre	1,34 ± 0,13								
Colesterol total	4,60 ± 0,18	3,42 ± 0,42	1,55	4,03	3,86	2,36	2,53	2,38 ± 0,11	2,46 ± 0,11
LDL-colesterol	(2,88 ± 0,28) ²	(1,90 ± 0,29)							2,56 ± 0,11
HDL-colesterol	1,71 ± 0,18	1,52 ± 0,13						1,26 ± 0,08	
Triacilgliceróis totais	0,81 ± 0,17		0,60	1,13	0,88	0,73	0,61	1,27 ± 0,05	0,42 ± 0,03
Fosfolípidos totais			1,01	1,67	2,08	1,10	1,21		0,43 ± 0,03
Referências bibliográficas	Rioux e Innis (1993)	Devlin et al. (1998)	Mersmann et al. (1979)					Valencia e Chavez (1997)	Dubreuil e Lapierre (1997)

Notas: Quando necessário, as unidades foram convertidas em unidades do Sistema Internacional;

¹ RC - Regime comercial; ² () - Valores referentes ao colesterol das fracções VLDL + LDL.

Anexo Ia. Valores bibliográficos referentes à concentração de lípidos plasmáticos de animais da espécie suína em amamentação ou consumindo regimes comerciais ou à base de caseína, sem adição de colesterol (continuação).

	Suínos domésticos (♀, ♂)	Large White x Landrace (♂)	Duroc x (Large White x Landrace) ¹ (♂)	Large White (♂)	Large White x Landrace (♂)
Idade/peso dos animais	60 d ² 90 d 180 d	38 kg	≈ 40 kg ≈ 45 kg	63,1 kg	30 kg 60 kg 90 kg
Principais componentes do regime alimentar	RC ³	Caseína (15,7%), amido de milho (56,2%) e banha (15,3%)	RC	Caseína (17,8%), amido de milho (43,1%) e óleo de soja (15%)	RC
Colesterol livre			mmol·L⁻¹		
Colesterol total	3,18 2,74 2,59	2,4 ± 0,4	2,68 ± 0,10 2,64 ± 0,10	0,60 ± 0,06 2,31 ± 0,13	2,18 2,15 2,11
LDL-colesterol	1,79 1,24 1,27		1,42 ± 0,04 1,38 ± 0,03	1,42 ± 0,09	1,10 ± 0,07 ⁴
HDL-colesterol	1,24 1,24 1,04		1,11 ± 0,03 1,12 ± 0,03	0,79 ± 0,06	0,96 ± 0,04 ⁴
Triacilgliceróis totais	0,87 0,70 0,62			0,32 ± 0,06	
Fosfolípidos totais				1,37 ± 0,15	
Referências bibliográficas	Pennisi et al. (1984)	Shutter (1988)	Martins et al. (dados não publicados)	Férezou et al. (1997)	Taylor et al. (1992)

Notas: Quando necessário, as unidades foram convertidas em unidades do Sistema Internacional;

¹ Valores obtidos em suínos resultantes do mesmo cruzamento utilizado nestes trabalhos experimentais, criados no CEEM e consumindo um regime comercial (S801, Rações Veríssimo S.A., Leiria, Portugal); ² Desmame feito aos 56 dias; ³ RC - Regime comercial; ⁴ Valores médios para os três pesos.

Anexo Ia. Valores bibliográficos referentes à concentração de lipídios plasmáticos de animais da espécie suína em amamentação ou consumindo regimes comerciais ou à base de caseína, sem adição de colesterol (continuação).

	Landrace (♀)	Landrace (♀)	Landrace x Yorkshire (♀)	Landrace x Duroc (♀)	Landrace (♀, ♂)	Suínos miniatura ¹ (♂)
Idade/peso dos animais	300 d	Adultos	Adultos	Adultos	Adultos	240 d
Principais componentes do regime alimentar	RC ²	RC	RC	RC	RC	RC
	<i>mmol·L⁻¹</i>					
Colesterol livre	0,66 ± 0,18					
Colesterol total	2,36 ± 0,32	2,05	2,02	2,04	2,75 ± 0,56	1,76 ± 0,24
LDL-colesterol	1,20 ± 0,31				1,80 ± 0,30	
HDL-colesterol	1,16 ± 0,14				0,97 ± 0,25	
Triacilgliceróis totais	2,17 ± 1,43	0,98	0,82	0,98		0,99 ± 0,31
Fosfolípidos totais	2,27 ± 1,43				1,87 ± 0,50	1,24 ± 0,12
Referências bibliográficas	Gillet et al. (1989)		Lingaas et al. (1992)		Vitic e Stevanovic (1993)	Hitz et al. (1987)

Notas: Quando necessário, as unidades foram convertidas em unidades do Sistema Internacional;

¹ Raça Pitman Moore; ² RC - Regime comercial.

Anexo Ib. Valores bibliográficos referentes a parâmetros hepáticos de animais da espécie suína em amamentação ou consumindo regimes comerciais ou à base de caseína, sem adição de colesterol

	Large Yorkshire x Landvarken (♀)		Suínos domésticos ¹		Large White (♂)	Suínos miniatura ² (♀, ♂)
	Idade/peso dos animais	14 a 28 d	0 a 5 d	84 d	168 d	63,1 kg
Principais componentes do regime alimentar	Leite	Leite	Leite	RC ³	RC	Caseína (17,8%), amido de milho (43,1%) e óleo de soja (15%)
Colesterol livre	<i>mg·g⁻¹</i>					
Colesterol total	23 ± 13				2,47 ± 0,08	1,70 ± 0,12
Triacilgliceróis					2,96 ± 0,08	1,91 ± 0,12
					11,41 ± 1,63	2,11 ± 0,10
					<i>pmol·(min·mg proteína)⁻¹</i>	
HMG CoA reductase	2,8 ± 1,2	0,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,9 ± 0,2	8,6 ± 0,9	9,3 ± 2,1
CYP7A1		18 ± 1	12 ± 3	18 ± 3	4,3 ± 0,5	58,5 ± 7,2
CYP27A1					<i>Altura do pico (mm)</i>	
Receptores de LDL					115 ± 8	
Referências bibliográficas	Kwekkeboom et al. (1990a)		Norlin (2002)		Férézou et al. (1997)	Huff et al. (2002)

Notas: Quando necessário, as unidades foram convertidas em unidades do Sistema Internacional; ¹ Valores obtidos em culturas de tecido hepático; ² Raça não definida; ³ RC - Regime comercial.

Anexo Ic. Valores bibliográficos referentes à concentração de lípidos e ácidos biliares da bilis vesicular de animais da espécie suína em amamentação ou consumindo regimes comerciais ou à base de caseína, sem adição de colesterol

	Yorkshire (♂)	Large White (♂)	Lacombe x Yorkshire (♀, ♂)	Large White (♂)	Espécie suína ¹ (♀, ♂)
Idade/peso dos animais	18 d	63,1 kg	84,7 kg	133 d	Adultos
Principais componentes do regime alimentar	Leite	Caseína (17,8%), amido de milho (43,1%) e óleo de soja (15%)	Soja (13,2%) e cevada (66%)	Farinha carne magra (50%), leite magro (20%) e amido (20%)	
			mmol·L⁻¹		
Colesterol total	3,6 ± 0,6		3,34 ± 0,26	3,90	
Fosfolípidos	33,9 ± 5,8				
Ácidos biliares totais	99,3 ± 11,2			221,20	
Ác. cólico		0,0 ²			
Ác. quenodesoxicólico		24,8 ²		44,10	30 a 35 ²
Ác. hiocólico		12,4 ²			35 a 40 ²
Ác. desoxicólico					
Ác. hiodesoxicólico		45,1 ²		131,30	25 a 35 ²
Ác. 3α-hidroxi-6-oxo-5β-colanólico		17,7 ²			
Referências bibliográficas	Devlin <i>et al.</i> (1998)	Férezou <i>et al.</i> (1997)	Thacker <i>et al.</i> (1981)	Topping <i>et al.</i> (1993)	Lutton (1990)

Notas: Quando necessário, as unidades foram convertidas em unidades do Sistema Internacional;

¹ Valores médios; ² Valores apresentados em percentagem dos ácidos biliares totais.

Anexo Id. Valores bibliográficos referentes à excreção de esteróis neutros e ácidos de animais da espécie suína consumindo regimes comerciais ou à base de caseína, sem adição de colesterol

	Suínos domésticos ¹ (♂)	Large White (♂)
Idade/peso dos animais	23,2 kg	63,1 kg
Principais componentes do regime alimentar	RC ²	Caseína (17,8%), amido de milho (43,1%) e óleo de soja (15%)
	mg·d⁻¹	
Esteróis neutros	744,7 ± 83,5	1 080,0 ± 170,0
Colesterol		85,3 ± 36,7
Coprostanol		919,1 ± 52,9
Epicoprostanol		74,5 ± 21,6
Ácidos biliares	1 023,1 ± 255,2	1 630,0 ± 40,0
Ác. quenodesoxicólico		187,4 ± 16,3
Ác. hiocólico		176,0 ± 21,2
Ác. litocólico		267,3 ± 11,4
Ác. desoxicólico		
Ác. hiodesoxicólico		815,0 ± 4,9
Ác. 3α-hidroxi-6-oxo-5β-colanólico		172,8 ± 17,9
Ác. 7-oxo-litocólico		
Referências bibliográficas	Pakarinen <i>et al.</i> (1996)	Férézou <i>et al.</i> (1997)

Notas: Quando necessário, as unidades foram convertidas em unidades do Sistema Internacional;

¹ Raça não definida; ² RC - Regime comercial.

Anexo II. Composição química das leguminosas utilizadas nos ensaios e seus valores bibliográficos médios

	Sojex	Glycine max	P. sativum (cv. solara)	Pisum sativum	Lupinus angustifolius	Lupinus angustifolius	Lupinus angustifolius spp. ¹
	g·kg⁻¹ MS						
Matéria seca (g·kg ⁻¹)	910,8		877,2		912,3		911
Proteína bruta (N x 6,25)	370,9	380 - 420	227,2	230 - 310	375,6		322
Gordura bruta	202,5	180 - 220	19,1	20 - 30	67,4		58
Fibra insolúvel em detergente neutro	172,8		153,9		219,6		227
Fibra insolúvel em detergente ácido	122,3		59,4		65,8		
Fibra alimentar		70 - 150		150 - 210			250 - 400
Amido total	8,4 [†]	10 - 20	419,0 [†]	200 - 500	7,5 [†]		10 - 20
Sacarose	35,7 ²	47 - 76	14,5 ²	7 - 57	31,7 ²		12 - 26 ²
α-Galactósidos	33,7 ²	20 - 60	41,9 ²	51 - 87	65,8 ²		41 ²
Rafinose	7,7 ²	5 - 13	5,3 ²	3 - 16	9,5 ²		4 - 9 ²
Estaquiose	23,4 ²	22 - 43	23,1 ²	13 - 55	38,7 ²		35 - 38 ²
Verbascose	2,6 ²	0 - 3	13,5 ²	16 - 42	17,6 ²		12 - 19 ²
Factores anti-tripsínicos (TIA)	7,2 ²		2,5 ²		0,2 ²		0,12 ²
Alcalóides					0,3 ²		<0,20 ²
Saponinas				0,52 - 0,62 ^{2,5}			0,57 ²
Fitosteróis		1,61 ^{2,5}		1,35 ^{2,5}			
Referências bibliográficas		Guillon e Champ (2002) ⁴		Guillon e Champ (2002) ⁴		Glencross (2001) ⁴	Guillon e Champ (2002) ⁴

Notas: ¹ Valores médios para o *Lupinus albus*, *L. angustifolius* e *L. luteus*; ² (mg·g⁻¹); ³ Valores referentes ao *L. albus*; ⁴ Valores obtidos de vários autores referidos nesta revisão bibliográfica; ⁵ Weihrauch e Gardner (1978);

[†] Análise realizada de acordo com o método de Clegg (1956), no Laboratório de Nutrição da Estação Zootécnica Nacional, Fonte Boa, Santarém.

