RICARDO MORAES BORGES

**DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA E ULTRA-ESTRUTURAL DA ABSORÇÃO DE ÓLEO
DE SOJA PELO INTESTINO DO JACARÉ DO PANTANAL
(*Caiman yacare*, Daudin, 1802)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

RICARDO MORAES BORGES

**DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA E ULTRA-ESTRUTURAL DA ABSORÇÃO DE ÓLEO
DE SOJA PELO INTESTINO DO JACARÉ DO PANTANAL
(*Caiman yacare*, Daudin, 1802)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da
Silva

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Borges, Ricardo Moraes.

Descrição histológica e ultra-estrutural da absorção de óleo de soja pelo intestino do jacaré do Pantanal (*Caiman yacare*, Daudin, 1802) / Ricardo Moraes Borges. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Histologia comparativa.

Versão do título para o inglês: Histological and ultrastructural description of soybean oil absorption by the intestine of the Jacaré do Pantanal (*Caiman yacare*, Daudin, 1802).

1. *Caiman yacare* 2. Aquacultura 3. Inclusão lipídica 4. Absorção lipídica 5. Réptil 6. Óleo de soja I. Silva, Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0114/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ricardo Moraes Borges.

Título da Tese: Descrição histológica e ultra-estrutural da absorção de óleo de soja pelo intestino do jacaré do Pantanal (*Caiman yacare*, Daudin, 1802).

Orientador(a): Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **131** nas fls. **110** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **José Roberto Machado Cunha da Silva**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Absorção de lipídios e proteínas pelo intestino de jacaré-do-pantanal Caiman yacare (Daudin, 1802)*" do qual participam o(s) aluno(s) **Ricardo Moraes Borges, Leandro Nogueira Pressinotti**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **20.09.2011, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 22 de setembro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

DEDICATÓRIA

Ao querido povo do Estado de Mato Grosso.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva
(Andrews, Karina, Ligia, Gabriel, Alfonso, Paola, Tânia, Ana Paula, Renata, Débora,
Douglas, Camila, Joana, Luciana);

Aos amigos do Laboratório de Embriologia Molecular de Vertebrados
(Maraysa, Tatiane e Felipe);

Ao laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Insetos
(Fábio Siviero e Renan);

A todos os colegas do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento;
Aos funcionários da SBIB (Biblioteca do ICB)

Ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Veterinária e Zootecnia
(Bruno Cogliati);

A Emília Ribeiro, Júnior (Cruz), Gaspar e Edson, do
Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento;

A Maria Inês Borella, Marinilce Fagundes dos Santos e Chao Yun Irene Yan,
professoras do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento;

À Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), à FAPEMAT, à FAPESP e
à COOCRIJAPAN, na pessoa do Médico Veterinário Alessandro Spíndola Bérnago;

Em especial, aos amigos:
Leandro Nogueira Pressinotti, Rhavena Liotti (e também Pedro);
Obrigado por me receberem em sua família!

Aos amigos Victor Manuel Aleixo, João Carlos Shimada Borges e
José Roberto Machado Cunha da Silva;

Mais especialmente ainda a:
Sonia, Luiz, Patricia, Eduardo, Thais, Danilo, Letícia, Ângela, Elias,
Lima, Divina, Tonhão (em memória) e Geralda.
A eles, dedico este trabalho.

RESUMO

Borges RM. Descrição histológica e ultra-estrutural da absorção de óleo de soja pelo intestino do jacaré do pantanal (*Caiman yacare*, Daudin, 1802). [tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

O cultivo de *Caiman yacare* demanda grandes gastos financeiros com alimentação, deste modo, é necessário formular dietas mais eficientes e mais baratas para a engorda dos animais e tornar esta atividade industrial mais rentável. A adição de óleo de soja na dieta é uma oportunidade para a diminuição dos custos, mas não se conhece os efeitos da utilização de óleos vegetais na saúde e no bem-estar desta espécie carnívora. Neste trabalho, utilizaram-se a abordagem histológica e ultra-estrutural, para analisar o processo de absorção de óleo de soja pelo intestino do jacaré do pantanal para avaliar possíveis alterações na histoarquitetura do intestino, potencial causador de patologias. A absorção de óleo de soja ocorreu maciçamente por toda a extensão do intestino delgado, desde o duodeno até o jejuno-íleo caudal, e residualmente pelo intestino grosso. Inclusões lipídicas foram observadas nos domínios supranucleares dos enterócitos, ocupando até 47% da área epitelial, enquanto que lipoproteínas do tipo quilomícrons, de no máximo 440 nm de diâmetro, foram observadas nos domínios basolaterais dos enterócitos e também na *lamina propria*. Os quilíferos centrais das vilosidades intestinais e os vasos linfáticos presentes na mucosa estavam abundantemente preenchidos por lipídeos, e os vasos sanguíneos apresentaram menos partículas, sugerindo que em crocodilianos, o transporte de lipídeos absorvidos pela mucosa intestinal ocorre principalmente pelo sistema linfático e com pequena contribuição do sistema circulatório, apesar da formação de quilomícrons relativamente pequenas. O número de enterócitos proliferativos presentes no intestino delgado e grosso não foi alterado após absorção de óleo de soja. A absorção do óleo de soja também não causou rupturas no epitélio de revestimento, não induziu o recrutamento de granulócitos heterofílicos ou eosinofílicos para a mucosa intestinal, não induziu a formação de heterófilos tóxicos nem causou a degranulação de mastócitos presentes na mucosa intestinal. Estes dados, em conjunto, sugerem que a absorção de óleo de soja não alterou a histoarquitetura da mucosa intestinal e, portanto, óleo de soja apresenta potencial para ser utilizado na formulação de dietas para *Caiman yacare*. Justifica-se, deste modo, a intensificação das pesquisas dos efeitos crônicos do óleo de soja sobre a saúde, o bem-estar e ganho de peso/crescimento desta espécie carnívora.

Palavras-chave: *Caiman yacare*. Aquicultura. Inclusão lipídica. Absorção lipídica. Réptil. Óleo de soja.

ABSTRACT

Borges RM. Histological and ultrastructural description of soybean oil absorption by the intestine of the jacaré do pantanal (*Caiman yacare*, Daudin, 1802). [Ph. D. thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Cultivation of *Caiman yacare* demands large financial expenditures on food, so it is necessary to formulate cheaper and more efficient feedings for the species weight gain in order to reduce costs and optimize industrial profits. The soybean oil addition in the diet formulation is an opportunity to reduce spending, but very little is known about the effects of vegetable-origin oils in this carnivore species health and welfare. By using histological and ultrastructural approaches, we described the process of soybean oil absorption by the intestine of *Caiman yacare* in order to evaluate possible intestinal histoarchitecture changes that may lead to potential pathologies and reduced health conditions or discomfort. We observed that the soybean oil absorption occurred massively across the entire small intestine length and residually by the large intestine. Lipid droplets were present in the enterocyte supranuclear domains, filling up to 47% of the epithelial area whilst chylomicrons of up to 440 nm diameter were observed in the basal domains of enterocytes and also in the intestinal villus *lamina propria*. Greatest amount of lipids were observed in the villous central lacteals, in the *tunica mucosa* lymphatic vessels and to a lesser extent, in the blood capillaries, suggesting that the lipid transport in crocodilians occurs mainly by the lymphatic system and probably presenting a minor contribution of the blood circulation, in spite of the production of such small-sized chylomicrons. The number of proliferative enterocytes present in the small and large intestine did not change after the soybean oil absorption. We also observed that soybean oil absorption did not damage the intestinal mucosa, it was not sufficient to recruit heterophilic or eosinophilic granulocytes to the intestinal mucosa, it did not cause formation of toxic heterophils nor induced mucosa-resident mast cell degranulation. Together, these data suggest that soybean oil absorption did not change mucosa histoarchitecture and it may potentially be used in *Caiman yacare* feeding formulations, justifying the to come research of soybean oil effects on health status, welfare and weight gain of this carnivorous species in the long term.

Keywords: *Caiman yacare*. Aquaculture. Lipid droplet. Intestine. Lipid absorption. Reptile. Soybean oil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição geográfica da espécie <i>Caiman yacare</i>	16
Figura 2 – Modelo de absorção lipídica pelo intestino de um vertebrado hipotético	39
Figura 3 – Imobilização do jacaré do pantanal e manobra adotada para a injeção intragástrica de óleo de soja	51
Figura 4 – Pontos de coleta ao longo do intestino delgado e do intestino grosso	52
Figura 5 – Processamento de imagem para a estimativa da ocupação do epitélio de revestimento da mucosa intestinal por lipídeos	54
Figura 6 – Absorção de óleo de soja pelos segmentos intestinais de <i>Caiman yacare</i>	61
Figura 7 – Absorção de óleo de soja pelo intestino grosso de <i>Caiman yacare</i>	62
Figura 8 – Definição dos domínios funcionais das vilosidades intestinais: ápice e laterais – domínios absorptivos	64
Figura 9 – Definição dos domínios funcionais das vilosidades intestinais: base das vilosidades – domínio proliferativo	65
Figura 10 – Descrição ultraestrutural das gotículas lipídicas presentes nos enterócitos	68
Figura 11 – Descrição ultraestrutural das lipoproteínas de secreção	69
Figura 12 – Vias de transporte dos lipídeos após absorção intestinal	71
Figura 13 – Contribuição do sistema circulatório para a absorção lipídica	73
Figura 14 – Adição de óleo de soja não é suficiente para alterar a organização pseudoestratificada dos enterócitos no epitélio de revestimento	74
Figura 15 – Descrição das alterações morfológicas nas vilosidades intestinais após absorção de óleo de soja	76
Figura 16 – Quantificação das lesões intestinais após absorção aguda de óleo de soja	77
Figura 17 – Quantificação do índice de proliferação dos enterócitos após absorção aguda de óleo de soja	78
Figura 18 – Administração de óleo de soja não alterou o domínio dos enterócitos proliferativos	80
Figura 19 – Caracterização morfológica dos granulócitos da mucosa intestinal de <i>Caiman yacare</i>	83
Figura 20 – A absorção de óleo de soja não aumentou o recrutamento de granulócitos para a mucosa intestinal	85

Figura 21 – Heterofilia e eosinofilia são eventos facilmente detectáveis após fixação por tetróxido de ósmio e por coloração Rosenfeld 86

LISTA DE TABELAS

Tabela A1 – Médias e desvios-padrão das lesões ocorrentes no epitélio de revestimento da mucosa intestinal após tratamento com óleo de soja	126
Tabela A2 – Teste <i>post hoc</i> de significância estatística da quantificação das lesões intestinais após absorção de óleo de soja	127
Tabela A3 – Médias e desvios-padrão da proporção de enterócitos PCNA positivos após absorção de óleo de soja	128
Tabela A4 – Teste <i>post hoc</i> de significância estatística das diferenças das proporções de enterócitos PCNA positivos após absorção de óleo de soja	128

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Descrição taxonômica do jacaré do pantanal (<i>Caiman yacare</i>)	15
1.2 Distribuição geográfica do jacaré do pantanal	15
1.3 Importância econômica do jacaré do pantanal e sua exploração comercial	17
1.4 Sistemas de cultivo do jacaré do pantanal	18
1.4.1 Dieta do jacaré do pantanal de vida livre e em sistema de cultivo	18
1.4.2 Adição de lipídeos na dieta de crocodilianos	20
1.5 Justificativa	22
1.6 Objetivo	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1 Anatomia do intestino do jacaré do pantanal	26
2.2 Histoarquitetura do intestino do jacaré do pantanal	27
2.2.1 Relevo interno do intestino	27
2.2.2 Morfologia microscópica do intestino	28
2.2.2.1 Epitélio de revestimento das vilosidades intestinais	28
2.2.2.2 Lâmina própria	29
2.2.2.3 Submucosa, túnicas musculares e serosa	30
2.3 Alterações da mucosa intestinal durante a digestão em répteis	31
2.4 Aspectos comparativos dos sítios de absorção lipídica pelo intestino de vertebrados	33
2.4.1 Absorção de lipídeos pelo intestino de Peixes	33
2.4.2 Absorção de lipídeos pelo intestino de Aves	35
2.4.3 Absorção de lipídeos pelo intestino de Mamíferos	37
2.4.4 Absorção de lipídeos pelo intestino de Répteis	38
2.5 Aspectos moleculares da absorção lipídica	40
2.5.1 Digestão de triglicérides	40
2.5.2 Passagem de ácidos graxos e monoacilglicerol pela membrana dos enterócitos	41
2.5.3 Formação de gotículas lipídicas	43
2.5.4 Transporte de lipoproteínas a partir da mucosa intestinal	46
2.6 Efeito de diferentes fontes lipídicas na modulação do sistema imune inato	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1 Manutenção dos animais e desenho experimental	50

3.2 Coleta dos segmentos intestinais	52
3.3 Processamento histológico para análise em microscopia de luz	53
3.4 Estimativa da ocupação do epitélio de revestimento da mucosa intestinal pelas gotículas lipídicas	53
3.5 Análise qualitativa da infiltração granulocítica na mucosa intestinal após absorção de óleo de soja	55
3.6 Imunohistoquímica	55
3.7 Descrição ultraestrutural da mucosa intestinal em microscopia eletrônica de transmissão	56
3.8 Quantificação das lesões na mucosa intestinal	56
3.9 Estimativa da proliferação celular no epitélio de revestimento	57
4 RESULTADOS	59
4.1 Descrição histológica do processo de absorção de óleo de soja pelos diferentes segmentos intestinais	59
4.2 Caracterização dos domínios funcionais das vilosidades intestinais de <u>Caiman yacare</u>	63
4.3 Descrição ultraestrutural das inclusões lipídicas na mucosa intestinal	66
4.4 Contribuição das vias linfática e sanguínea no transporte de lipídeos absorvidos pelo intestino	70
4.5 Caracterização da organização epitelial após absorção de óleo de soja	73
4.6 Alterações morfológicas das vilosidades intestinais durante a absorção lipídica	75
4.7 Caracterização do índice de proliferação dos enterócitos após absorção de óleo de soja	78
4.8 Caracterização morfológica e ultraestrutural dos granulócitos presentes na mucosa intestinal de <u>Caiman yacare</u> após fixação com tetróxido de ósmio	82
4.9 Efeitos da absorção lipídica no recrutamento de granulócitos para a mucosa intestinal	84
5 DISCUSSÃO	87
5.1 Descrição histológica do processo de absorção de óleo de soja pelos diferentes segmentos intestinais	87
5.2 Caracterização dos domínios funcionais das vilosidades intestinais de <u>Caiman yacare</u>	89
5.3 Alterações morfológicas das vilosidades intestinais durante a absorção lipídica	92
5.4 Caracterização morfológica e ultraestrutural dos granulócitos presentes na mucosa intestinal de <u>Caiman yacare</u> após fixação com tetróxido de ósmio	95
5.5 Efeitos da absorção lipídica no recrutamento de granulócitos para a mucosa intestinal	97

<i>5.6 Caracterização do índice de proliferação dos enterócitos após absorção de óleo de soja</i>	100
<i>5.7 Ultraestrutura das inclusões lipídicas na mucosa intestinal</i>	102
<i>5.8 Contribuição das vias linfática e sanguínea no transporte de lipídeos absorvidos pelo intestino</i>	104
6 CONCLUSÃO	107
REFERÊNCIAS	108
APÊNDICE – Análises estatísticas	126
ANEXO – Autorização para utilização de animais silvestres em atividades com finalidade científica	129

1 INTRODUÇÃO

1.1 Descrição taxonômica do jacaré do pantanal (*Caiman yacare*)

Existem aproximadamente 23 espécies de crocodilianos viventes, as quais são agrupadas na Ordem Crocodylia e apresentam ancestralidade comum mais próxima com as Aves (Chiari et al., 2012). Tradicionalmente, esta ordem é dividida em três famílias, baseando-se em filogenias inferidas a partir de dados morfológicos: família Alligatoridae, que abriga os gêneros Alligator, Melanosuchus, Paleosuchus e Caiman, gênero ao qual pertence o jacaré do pantanal; família Crocodylidae, com os gêneros Crocodylus, Osteolaemus e Tomistoma; e família Gavialidae, com a espécie única *G. gangeticus* (Brochu et al., 2003; St. Jhohn et al., 2012). Filogenias inferidas a partir de sequenciamento de genes mitocondriais, no entanto, indicam que a Ordem Crocodylia seria dividida apenas nas famílias Alligatoridae e Crocodylidae, sendo que a família Gavialidae não seria sustentada e a espécie única *G. gangeticus* seria incorporada à família Crocodylidae (Man et al., 2011).

O gênero Caiman, que habita exclusivamente as Américas Central e do Sul, apresenta três espécies: *Caiman crocodilus*, *Caiman latirostris* e *Caiman yacare*. Alguns autores, no entanto, reconhecem apenas as espécies *C. crocodilus* e *C. latirostris*, sendo *C. yacare* uma subespécie de *C. crocodilus* (*Caiman crocodilus yacare*) (Bampi, Coutinho, 2002; Brochu et al., 2003; Busack, Pandya, 2001; Campos et al., 2010; Hrbek et al., 2007). O Grupo de Especialistas em Crocodilianos da União Internacional para a Conservação da Natureza (CSG/IUCN, 2014) assim como o Ministério do Meio Ambiente (MMA/IBAMA) e parte dos pesquisadores, reconhecem *Caiman yacare* como sendo espécie distinta (Bampi, Coutinho, 2002; Campos et al., 2010). *Caiman crocodilus yacare*, portanto, é considerada uma sinonímia importante para o jacaré do pantanal, por também constar na literatura científica.

1.2 Distribuição geográfica do jacaré do pantanal

O jacaré do pantanal habita o centro da América do Sul, ocorre sempre associado a corpos d'água, sejam alagados, rios, lagos ou salinas (Bampi, Coutinho,

2002; Santos, 1997), podendo ser encontrado, portanto, nos diversos tipos de habitats presentes no Pantanal. Os principais rios onde podem ser encontrados *C. yacare* são os Rios Guaporé/Madeira e Paraná/Paraguai. Sua distribuição geográfica vai desde a borda sul da floresta Amazônica até o norte da Argentina, na fronteira com o Paraguai, enquanto que a fronteira ocidental é o leste da Bolívia e a fronteira oriental, as terras altas às margens do pantanal (figura 1).

Figura 1 – Distribuição geográfica da espécie *Caiman yacare*.

Mapa de ocorrência do jacaré do pantanal e a localização aproximada do município de Cáceres, local onde está situada a COOCRIJAPAN, fazenda de criação de jacaré do pantanal onde os trabalhos foram realizados.
Fonte: Modificado de Campos et al., 2010.

Apesar de essa ser a distribuição geográfica do jacaré do pantanal corriqueiramente citada nos artigos científicos, as suas fronteiras de ocorrência não são bem precisas porque existe confusão taxonômica com *Caiman crocodilus crocodilus*, que apresenta distribuição geográfica mais ampla, porque existem zonas de hibridação entre *C. crocodilus* e *C. yacare* nas fronteiras de ocorrência e porque há gradientes de diferenças morfológicas ao longo de sua distribuição geográfica,

dificultando o reconhecimento da espécie (Coutinho, Campos, 1996; Farias et al., 2013; Mourão et al., 2000).

1.3 Importância econômica do jacaré do pantanal e sua exploração comercial

Quase todas as espécies de crocodilianos são exploradas comercialmente (Santos, 1997). A exploração do jacaré do pantanal tem como principais produtos a carne para o consumo humano e o couro para a indústria da moda. Antes dos anos 70, o jacaré do pantanal foi bastante explorado pela população rural local e geralmente pobre, para a obtenção de proteínas para alimentação e como alternativa econômica, através da venda das peles de animais extraídos diretamente da natureza (Bampi, Coutinho, 2002). Nos anos 60 e 70, suas populações sofreram drásticas diminuições por causa da caça ilegal, associado a um período de intensa seca cíclica no Pantanal. Atualmente, essa espécie não corre o risco de extinguir-se (Farias et al., 2013). Dentre todos os crocodilianos, o jacaré do pantanal apresenta o maior adensamento populacional, chegando a mais de 100 indivíduos por quilômetro quadrado, totalizando cerca de 30 milhões de indivíduos por todo o pantanal (Bampi, Coutinho, 2002; Coutinho et al., 1996; Farias et al., 2013; Mourão et al., 2000). As altas densidades populacionais registradas são uma característica importante para a sustentabilidade da exploração deste recurso silvestre. Ainda assim, a caça é proibida, mas o cultivo em fazendas é permitido, e a comercialização das peles e da carne obtidas de animais mantidos nas fazendas autorizadas é regulamentada pelos órgãos ambientais brasileiros (Brasil, 1990, 2008).

A implementação de fazendas para a criação de espécies silvestres é permitida apenas em locais de sua ocorrência (Verdade, 2004), sendo a criação do jacaré do pantanal uma alternativa para a diversificação das atividades econômicas nas regiões pobres do pantanal, de onde a espécie *Caiman yacare* é endêmica e para a geração de postos de trabalho direto e indireto (Aleixo, 2000, 2011b; Nogueira-Filho, Nogueira, 2000). Vale destacar que esta indústria está em plena atividade em alguns municípios do estado de Mato Grosso, com certificação das agências ambiental e sanitária federal. Estima-se que esta atividade movimente cerca de R\$ 2.800.000,00 anuais no estado de Mato Grosso, com a venda de 120 toneladas de carne e de 16 mil peles por ano, apesar de seu couro ser considerado de qualidade inferior quando

comparado ao couro de outras espécies, como o obtido do crocodilo do Pacífico (*Crocodylus porosus*), do crocodilo do Nilo (*Crocodylus niloticus*), do crocodilo da Papua-Nova-Guiné (*Crocodylus novaeguineae*) e do aligátor americano (*Alligator mississippiensis*) (Aleixo, 2011a; Verdade, 2001, 2004).

1.4 Sistemas de cultivo do jacaré do pantanal

O sistema de cultivo de jacaré do pantanal mais utilizado no Brasil, se não o único adotado até o momento, é o modelo “ranching”, sistema semi-intensivo caracterizado pela coleta limitada de ovos postados na natureza, incubação artificial para a eclosão dos filhotes e a engorda dos animais nascidos nas próprias fazendas (Aleixo, 2011b; Bampi, Coutinho, 2002; Campos et al., 2005; Santos, 1997; Verdade, 2004). A criação do jacaré do pantanal em sistema de cultivo é uma alternativa para a exploração silvestre após a proibição da caça e apresenta algumas vantagens, apesar dos altos custos iniciais da implementação da indústria, tais como o melhor aproveitamento do couro, e a obtenção de carnes com rigoroso controle sanitário para ser utilizado no consumo humano.

É desejável a implementação do sistema “farming”, no qual se mantêm os adultos reprodutores cativos e engordam-se apenas os filhotes eclodidos na própria fazenda, fechando todo o ciclo reprodutivo. Este sistema apresenta vantagens ecológicas, ao diminuir a pressão sobre os estoques naturais, pois não seria mais necessário coletar os ovos da natureza e vantagens econômicas, pois permitiria obter animais com as características comerciais de interesse mais aguçadas e lotes de animais com características homogêneas, ao proceder com a seleção artificial e genética dos reprodutores. Um dos motivos para não ser adotado o sistema “farming” é o alto custo financeiro que seria necessário para a alimentação dos adultos reprodutores.

1.4.1 Dieta do jacaré do pantanal de vida livre e em sistema de cultivo

Os crocodilianos, em geral, são animais carnívoros oportunistas, alimentando-se de anelídeos, artrópodes, moluscos, peixes, anfíbios, outros répteis, ovos, aves e mamíferos (Santos, 1997). Dois parâmetros determinam quais são os itens

alimentares apreendidos pelo jacaré do pantanal: tamanho do predador e disponibilidade dos itens alimentares. Animais jovens, por apresentarem porte pequeno, tendem a se alimentar de invertebrados, principalmente pertencentes às ordens Odonata, Hemíptera, Coleóptera e à Classe Mollusca e pequenos peixes (Santos et al., 1996).

O tamanho das presas tende a aumentar com o incremento da idade e consequentemente aumento do porte dos animais e capacidade de predação animais maiores. No entanto, para os jacarés do pantanal de maior porte (com mais de um ano de idade), os itens alimentares consumidos variam de acordo com a época do ano, influenciados pelos ciclos de seca e cheia do pantanal e pela sazonalidade da temperatura ambiente. Os pulsos de inundação do pantanal regulam a disponibilidade de nutrientes no ambiente, tendo forte impacto no tamanho das populações das espécies predadas pelo jacaré do pantanal, enquanto que a sazonalidade de temperatura determina a intensidade de atividade dos jacarés, como o comportamento de alimentação. Deste modo, de janeiro a março, época de cheias e temperaturas altas, há grande disponibilidade de nutrientes no pantanal, aumentando a população de vertebrados e a oferta de itens alimentares de maior valor energético. Também, os animais estão bastante ativos pelas altas temperaturas, e acabam consumindo mais vertebrados, principalmente peixes, seguido de anfíbios e outros répteis e em menor proporção, aves e mamíferos de pequeno porte (Bampi, Coutinho, 2002). Em outro extremo, de julho a setembro, com temperaturas baixas e períodos de seca, os itens preferencialmente ingeridos são invertebrados, pela baixa disponibilidade de itens alimentares mais energéticos no ambiente e por causa do comportamento de estivação do jacaré do pantanal, causado pela seca e pelas baixas temperaturas (Bampi, Coutinho, 2002; Campos, 2002; Farias et al., 2013; Santos, 1997).

A ração oferecida para a engorda dos jacarés do pantanal mantidos em sistema de cultivo é formulada de acordo com a disponibilidade de descartes de origem animal fornecidos pelos frigoríficos locais. Ela é composta principalmente por miúdos crus e triturados de bovinos (pulmão, baço, rim e fígado) à qual são adicionadas vitaminas e minerais recomendados para a criação de suínos. Alternativamente, podem ser utilizados peixes inteiros, carcaças e vísceras de

peixes, de aves e de porcos, sangue, farinha de osso e eventualmente, vísceras e carcaças provenientes do abate dos próprios jacarés criados nas fazendas (Aleixo, 2000, 2002, 2011b; Maciel et al., 2003).

A monodieta, frequente nas fazendas de crocodilianos ou zoológicos, não é recomendável. *Crocodilus porosus*, uma espécie estuarina, alimentada exclusivamente com carne de porco por longo período, apresentou dermatite, sintoma atribuído à carência de ácidos eicosapentaenoico (20:5 n-3) e docosaexaenoico (22:6 n-3), que podem ser encontrados em peixes, itens frequentes na dieta de animais de vida livre. Jacaré do pantanal recém-eclodido alimentado exclusivamente com peixes apresentou maior crescimento quando comparado a animais alimentados exclusivamente com crustáceos, moluscos ou insetos. No entanto, após três meses de alimentação exclusiva com peixes, esses animais apresentaram problemas neuromusculares sugestivos, como falta de coordenação motora e “cabeça voltada para cima” e chegaram ao óbito (Santos et al., 1993).

Ainda com relação à dieta preparada nas fazendas, deve-se prestar especial atenção quando os itens fornecidos são provenientes de peixes. Devido à alta concentração de ácidos graxos altamente insaturados (HUFAs) presentes nos peixes, o processo de congelamento da matéria-prima oxida os ácidos graxos e estes podem provocar um quadro de esteatose hepática e necrose do tecido gorduroso, principalmente o presente entre os músculos da cauda, em crocodilianos alimentados cronicamente com estes itens (Huchzermeyer, 2000, 2002; Lane et al., 2013; Osthoff et al., 2010).

1.4.2 Adição de lipídeos na dieta de crocodilianos

Nota-se que há grande diferença entre os itens alimentares consumidos pelos animais de vida livre, composto principalmente por invertebrados, peixes e menor proporção de aves e mamíferos, e os itens incluídos na dieta oferecida para os animais mantidos em sistema de cultivo, composto principalmente de tecidos de mamíferos, aves e peixes. Com isso, o perfil de ácidos graxos ingeridos pelos animais de vida livre difere substancialmente do ingerido pelos animais cultivados.

Como forma de balancear a dieta oferecida a crocodilianos cultivados e identificar os ácidos graxos essenciais para o seu crescimento e ganho de peso, diversas fontes de lipídeos vegetais já foram testadas na alimentação. A digestão aparente de óleo de oliva e de óleo de canola é alta em *Alligator mississippiensis*, com cerca de 98%, e 96% para óleo de linhaça. Para efeito de comparação da alta digestibilidade destes óleos vegetais, óleo de peixe e óleo de galinha apresentam digestibilidade aparente de 96%, enquanto que sebo bovino e gordura de porco são os itens com menor digestibilidade aparente, 91% e 86%, respectivamente (Garnett, 1985; Staton et al., 1990a).

O crescimento de *Alligator mississippiensis*, promovido pela dieta adicionada de óleo de oliva, óleo de canola ou óleo linhaça é tão satisfatório quanto a dieta adicionada de óleo de peixe. No entanto, quando é utilizado óleo de fígado de galinha misturado a óleo de peixe, os animais crescem mais e ganham mais peso do que animais alimentados com ração adicionada de óleos vegetais (Staton et al., 1992).

Óleos vegetais, portanto, são digeridos e absorvidos por crocodilianos, e a adição de lipídeos à dieta de crocodilianos demonstrou-se ser favorável ao ganho de peso dos animais, principalmente pela deposição de gordura no músculo, nas serosas abdominais e na esteatoteca, órgão de acúmulo de lipídeos localizado no mesentério próximo ao fígado (Staton et al., 1990a, 1990b, 1992). Ao contrário de peixes carnívoros, nos quais os lipídeos são adicionados para serem utilizados como fonte energética e para a preservação de proteínas a serem utilizadas no crescimento corpóreo (Oliva-Teles, 2012), demonstrou-se que em crocodilianos, a adição de gorduras não diminui o catabolismo de proteínas, e as dietas hiperlipídicas, com cerca de 48% do valor energético da dieta em forma de lipídeos, ainda diminuem a digestibilidade proteica (Staton et al., 1990c) e a retenção corpórea de proteínas (Garnett, 1985, 1988). A adição de lipídeos na dieta de crocodilianos, portanto, não deve ser feita com o intuito de diminuir a quantidade de proteínas dietéticas. A recomendação para sua formulação é que o valor máximo de lipídeos seja menor do que 9%, para não diminuir digestibilidade, a retenção corpórea de proteínas e para que não haja diminuição do tempo de trânsito alimentar pelo sistema gastrointestinal, o que prejudicaria a eficácia na assimilação de nutrientes (Garnett, 1985, 1988). A quantidade de lipídeos presentes na

alimentação de *Caiman yacare* mantido em sistema de cultivo varia entre 4% e 12% (Aleixo, 2000), o mesmo valor mencionado em Staton et al. (1992) em que há bom desempenho no crescimento de *Alligator mississippiensis*.

Staton et al. (1990c) detectaram maior ganho de peso em crocodilianos alimentados com dietas apresentando entre 0,04% e 0,13% de ácido araquidônico (20:4 n-6), quando comparados a animais que não ingerem este ácido graxo. Apesar de ácido linoleico (18:2 n-6) ser metabolizado em ácido araquidônico pelo fígado de crocodilianos, esta conversão não é suficiente para suprir as suas necessidades nutricionais para este ácido graxo.

Demonstrou-se que em crocodilianos, a absorção dos diferentes ácidos graxos é influenciada tanto pelo tamanho da cadeia carbônica quanto pelo grau de insaturação e ocorre similarmente ao descrito para outros vertebrados: considerando ácidos graxos saturados, a absorção diminui com o aumento da cadeia carbônica. Considerando ácidos graxos de igual tamanho da cadeia carbônica, a insaturação aumenta a absorção (Garnett, 1985, 1988; Staton et al., 1990a, 1990b, 1990c, 1992). A interação entre as diferentes classes de ácidos graxos presentes nos óleo vegetais também pode influenciar a absorção de um ácido graxo específico. Por exemplo, ácido esteárico (18:0) proveniente de óleo de linhaça apresenta menor absorção do que ácido esteárico proveniente de óleo de oliva. A absorção de ácidos graxos poli-insaturados, no entanto, não apresentou variações quando as diversas fontes são comparadas, como ocorre com os ácidos graxos saturados (Staton et al., 1992).

1.5 Justificativa

Cerca de 50-60% do custo total de produção de jacaré do pantanal em sistema de cultivo é gasto com alimentação para a engorda dos animais. Isto ocorre porque o tempo requerido para os filhotes atingirem o porte de abate, entre 4-5 kg de peso total ou 30-40 cm de circunferência abdominal, é longo, levando de 2 a 3 anos, e porque o valor monetário do componente principal de sua dieta, proteína de origem animal, é elevado (Aleixo et al., 2002; Bampi, Coutinho, 2002; Rodríguez et al., 1996; Santos, 1997; Isberg, 2007). Uma oportunidade para a redução de custos com alimentação é a substituição, pelo menos em parte, da matéria-prima de origem

animal por carboidratos, proteínas e lipídeos de origem vegetal, nutrientes mais abundantes e financeiramente mais vantajosos.

Na prática, o manejo de *Caiman yacare* em sistemas de cultivo têm incorporado conhecimentos obtidos com pesquisas feitas em peixes, especialmente espécies carnívoras, por causa da grosseira semelhança metabólica entre ambos, pois são heterotermos e ectotermos, e da semelhança dos hábitos alimentares o que, conseqüentemente, indicaria necessidades nutricionais similares (Aleixo, 2000, 2011b). Por esta semelhança e por causa das lacunas existentes no conhecimento sobre manejo e/ou fisiologia de crocodilianos, grande parte do presente trabalho utiliza os trabalhos realizados em peixes como parâmetros de comparação.

A ração utilizada na dieta oferecida a diversas espécies de peixes carnívoros mantidos em aquicultura contém adição de óleo de peixe, obtido a partir de recursos pesqueiros naturais cada vez mais escassos e com alto custo de produção, inviabilizando o cultivo. Por esta razão, diversos estudos foram realizados para avaliar os efeitos histofisiológicos da substituição de óleo de peixe por óleos de fontes vegetais (Miller et al., 2008; Oliva-Teles, 2012; Sargent, Tacon, 1999).

A maior parte da diversidade de peixes carnívoros de clima tropical ou temperado, dulçaquícolas ou marinhos, até o momento estudados, prosperam bem com dietas adicionadas de óleos obtidos de diversas fontes vegetais: *Pseudoplatystoma fasciatum* e *Pseudoplatystoma coruscans* (Arslan et al., 2008; Martino et al., 2002), *Gadus morhua* (Booman et al., 2014), *Oncorhynchus mykiss* (Caballero et al., 2002); *Larmichthys crocea* (Duan et al., 2014), *Acipenser gueldenstaedtii* (Sener et al., 2006). Em algumas espécies, como em *Sparus aurata*, no entanto, o ganho de peso foi menor com a adição de alguns óleos vegetais, quando comparado com a adição de óleo de peixe (Caballero et al., 2004), o mesmo ocorrendo em *Alligator mississippiensis* (Staton et al., 1992). Ainda, a absorção e o metabolismo de óleos vegetais foram associados a alguns efeitos negativos sobre a saúde de alguns peixes, como esteatose intestinal e hepática (Caballero et al., 2003, 2004; Deplano et al., 1989), lesões no epitélio de revestimento da mucosa intestinal (Deplano et al., 1989; Olsen et al., 1999, 2000), diminuição da resistência a parasitas (Estensoro et al., 2011; Fracalossi, Lovell, 1994), supressão de parâmetros do sistema imune (Montero et al., 2003; Mourente et al., 2005, 2007), aumento da mortalidade (Sheldon, Blazer, 1991; Thompson et al., 1996) e podem promover

septicemia ou inflamação intestinal (Ghosh et al., 2013; Hekmatdoost et al., 2013; Jin et al., 2011).

Alguns destes efeitos negativos observados em peixes após alimentação com dietas adicionadas de óleos vegetais também foram descritos em crocodilianos cultivados, frequentemente alimentados com dietas hiperlipídicas, mesmo que os lipídeos sejam de origem animal. Esteatose intestinal e necrose do epitélio de revestimento da vilosidade intestinal foram observadas no duodeno de *Caiman latirostris* adultos após alimentação com pescoço de frango, especulando-se que a necrose poderia ter sido causada pelo excesso de lipídeos absorvidos pelos enterócitos (Starck et al., 2007). É de conhecimento dos criadores de jacaré do pantanal que dietas apresentando grande quantidade de gorduras de origem animal oferecida, principalmente a filhotes, provoca diarreia e aumento na mortalidade. Análise *post mortem* de alguns destes animais revelou a presença de fígados friáveis, sugerindo esteatose hepática.

Apesar de *Alligator mississippiensis* adultos prosperarem com alimentos adicionados de lipídeos de fontes vegetais, apresentarem grande digestibilidade aparente de óleos vegetais e estes promoverem ganho de peso, o crescimento do animal é menor do que com a adição de certos óleos de origem animal (Staton et al., 1990a, 1992), suscitando dúvidas sobre os motivos desta diferença. Não sabemos se jacaré do pantanal também prosperaria com adições de óleos vegetais, uma vez que o metabolismo de *Alligator mississippiensis* e *Caiman yacare* podem diferir, devido às condições de estresse ambientais diferentes que enfrentam: enquanto aquela espécie habita águas sazonalmente geladas, esta enfrenta efeitos sazonais da estiagem. Ainda, não se conhecem os efeitos dos lipídeos vegetais no metabolismo e na histoarquitetura intestinal de crocodilianos, que podem sofrer alterações ocasionando patologias, como danos à mucosa intestinal e estabelecimento de processo infeccioso/inflamatório, esteatose hepática e septicemia bacteriana, contribuindo para a mortalidade dos animais (Ghosh et al., 2013). Finalmente, o óleo de soja, material abundante nas regiões de criação de jacaré do pantanal com potencial de utilização na ração desta espécie e que apresenta proporção de ácidos graxos diferente dos demais óleos vegetais testados na dieta para o crescimento de crocodilianos, ainda não foi testado.

1.6 Objetivo

O crescimento e o ganho de peso de um organismo depende da construção organizada de diferentes tecidos, à custa de uma gama de nutrientes. Deste modo, o conhecimento das necessidades nutricionais de um animal, aliado ao conhecimento de como estes nutrientes essenciais são utilizados na organização e crescimento tecidual fornecem subsídios para que, no contexto da criação em cativeiro, diferentes matérias primas possam ser empregadas para atingir o objetivo de se obter o ganho de peso com o menor gasto possível e que não causem alterações morfológicas que possam ser danosas para a saúde e o bem estar do animal.

Apesar do conhecimento dos itens alimentares que compõem a dieta do jacaré do pantanal de vida livre e da influência de diversas dietas naturais e artificiais sobre o crescimento e ganho de peso dos animais, pouco se sabe sobre os mecanismos histofisiológicos que os diferentes compostos presentes nas dietas exercem sobre a histoarquitetura dos órgãos ou possíveis alterações patológicas que possam ser geradas por estes compostos, dificultando as substituições ou adições de compostos para a formulação de rações.

Uma abordagem possível para a identificação das necessidades nutricionais das espécies, portanto, é a descrição histofisiológica dos organismos frente a diferentes dietas ou em condições de adição ou supressão de nutrientes adicionados à ração. No presente trabalho, temos como objetivo descrever a histoarquitetura e a ultraestrutura dos segmentos intestinais durante a absorção de óleo de soja e as consequentes alterações ocasionadas por este processo na mucosa intestinal do jacaré do pantanal, para subsidiar a formulação de uma dieta mais eficiente e mais barata para o cultivo desta espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Anatomia do intestino do jacaré do pantanal*

O sistema digestório dos crocodilianos é composto por boca, esôfago, estômago bastante volumoso, intestino delgado curto com alças intestinais esparsas, intestino grosso também curto e ânus desembocando em cloaca. Não há a presença de cecos intestinais (Romão et al., 2011).

O intestino delgado apresenta o duodeno subdividido em segmento descendente, ligado ao antro pilórico do estômago e apresentando internamente a válvula pilórica, e duodeno ascendente, contínuo com o intestino delgado que se continua caudalmente. As metades descendente e ascendente do duodeno formam uma alça em torno do pâncreas e são unidas por uma serosa. A alça duodenal serve como parâmetro topográfico para diferenciar o duodeno do restante do intestino delgado.

A válvula pilórica restringe a passagem de partículas alimentares para o duodeno. Partículas sólidas de alimentos são retidas no estômago, inclusive gastrólitos ingeridos pelos jacarés, permitindo apenas o trânsito de substâncias líquidas e pastosas. O jejuno-íleo, assim chamado por não ser possível diferenciar anatômica ou histologicamente, o jejuno do íleo, é a porção seguinte do intestino, recebendo o conteúdo do duodeno e onde o mesentério se inicia (Aleixo, 2011b; Jin et al., 1990; Romão et al., 2011). O intestino delgado, compreendendo o duodeno e o jejuno-íleo, apresenta tamanho aproximado de 1,7 vez o comprimento total do animal e acomoda-se no abdômen formando alças. Caudalmente, o intestino delgado é separado do intestino grosso pelo esfíncter íleocólico (Santos, 1997).

O intestino grosso, ou reto, é bastante curto, suspenso por um pequeno mesentério dorsal, compreende a décima parte do comprimento total do intestino e apresenta cerca de três vezes o diâmetro do intestino delgado (Chiasson, 1962; Huchzermeyer, 2000; Reese, 1913; Romão et al., 2011; Santos, 1997). O ânus, ou *coprodeum*, é a abertura do intestino grosso que desemboca na cloaca e possivelmente apresenta um esfíncter anal.

2.2 Histoarquitetura do intestino do jacaré do pantanal

2.2.1 Relevô interno do intestino

O relevô interno do intestino delgado é formado por projeções da mucosa em direção à luz intestinal, sem contribuição da submucosa. As projeções ocorrem de maneira complexa e diferenciada ao longo do eixo céfalo-caudal do intestino. As projeções podem ocorrer de duas formas distintas: (1) cristas com forma zigzeagueada; e (2) cristas onduladas. Ambas percorrem longitudinalmente o intestino, dando o aspecto macroscópico de caminhos zigzeagueados ou ondulados ao relevô interno. As cristas zigzeagueadas, forma predominante dos segmentos craniais do intestino delgado, são projeções que apresentam ângulos agudos em si, enquanto que a crista ondulada, mais frequente nos segmentos caudais do intestino delgado e grosso, é formada por projeções com ângulos arredondados. A densidade das cristas nos segmentos craniais é bastante alta, com as cristas zigzeagueadas imbricadas umas às outras, enquanto que nos segmentos caudais, as cristas onduladas são mais espaçadas, diminuindo a densidade de cristas. No intestino grosso, as cristas são do tipo ondulada, mas as ondulações são menos organizadas, menos periódicas e as cristas mais espaçadas entre si do que as cristas onduladas dos segmentos caudais do intestino delgado. Um terceiro tipo de projeção da mucosa ocorre no intestino delgado cranial, caudal e também no intestino grosso. São as cristas dispostas transversalmente às cristas zigzeagueadas e onduladas, são mais baixas que as cristas longitudinais e são unidas a estas, formando pequenas celas (Aleixo, 2011b; Jin et al., 1990).

Em *Caiman yacare*, a altura das cristas presentes ao longo do intestino delgado apresentam diferenças, diminuindo gradualmente em direção caudal do intestino, mas por esta característica, apenas, não é possível diferenciar os diferentes segmentos do intestino delgado, como por exemplo, jejuno do íleo (Aleixo, 2011b). Apenas no intestino grosso, as cristas são significativamente menores do que as presentes no intestino delgado. A complexidade e a área da mucosa disponível para absorção, portanto, diminuem gradativamente em direção caudal, assim como o descrito para o aligátor americano (Reese, 1913).

2.2.2 Morfologia microscópica do intestino

Os tecidos que formam o intestino dos crocodilianos são, a partir da luz intestinal: a túnica mucosa, apresentando epitélio de revestimento, lâmina própria e muscular da mucosa; duas camadas musculares, a interna circular e a externa longitudinal, e uma túnica serosa típica. A presença de submucosa é controversa em crocodilianos e será discutido adiante.

2.2.2.1 Epitélio de revestimento das vilosidades intestinais

O epitélio de revestimento é composto por células de Paneth, células caliciformes, alguns linfócitos intraepiteliais, células enteroendócrinas, células multipotentes intestinais (ou enterócitos indiferenciados) e células cilíndricas absorptivas, os enterócitos, formando um epitélio do tipo simples (Aleixo, 2011b; Jin et al., 1990; Kotzé et al., 1992), estratificado (Reese, 1913) ou pseudoestratificado (Starck et al., 2007; Yamada et al., 1987). A variação estrutural do epitélio de revestimento da mucosa intestinal de crocodilianos decorre do processo fisiológico de digestão e da absorção de nutrientes pelos enterócitos, conforme discutido em outra seção.

As células de Paneth foram descritas apenas no intestino grosso do jacaré do pantanal, restritas à base das vilosidades e não ocorreria no intestino delgado (Jin et al., 1990). Em *Crocodylus niloticus*, *Crocodylus porosus* e *Alligator sinensis*, aparecem distribuídas em todos os segmentos intestinais, desde o intestino delgado, onde ocorrem em maior número até o segmento cloacal (Taguchi, 1920¹ apud Luppá, 1977). Kotzé et al. (1992), no entanto, não encontraram células de Paneth em *Crocodylus porosus*, conflitando com os achados de Taguchi (1920 apud Luppá, 1977). Ainda, em algumas espécies de lagartos do gênero *Lacerta*, células de Paneth ocorrem ao longo das laterais das vilosidades intestinais, não estando restritas apenas às bases (Baecker, 1934² apud Luppá, 1977). Não se reconhece facilmente, portanto, a distribuição das células de Paneth ao longo do intestino, sendo um tópico que precisa ser melhor investigado em jacaré do pantanal.

¹ Taguchi H. Beiträge zur Kenntnis über die feinere Struktur der Eingeweideorgane der Krokodile. Mitt. Med. Fak. Tokyo. 1920;19:119–88.

² Baecker R. Die oxyphilen Panethschen Körnchenzellen im Darmepithel der Wirbeltiere. Erg. Anat. 1934;31:708–55

As células caliciformes, secretoras de mucinas neutras e ácidas, estão presentes com bastante frequência no epitélio de revestimento de todos os segmentos intestinais, intercaladas com outros tipos celulares e apresentam-se em maior número no intestino grosso, sendo que no intestino delgado, sua frequência aumenta em direção aos segmentos mais caudais (Aleixo, 2011b; Jin et al., 1990; Luppá, 1977).

Existem dois tipos de células enteroendócrinas descritas para répteis, segundo critérios morfológicos e propriedade tintorial: (1) células restritas à base das vilosidades, com formato cônico, com a base em contato com a lâmina própria e o ápice celular fazendo contato com a luz intestinal, apresentam grânulos presentes na porção basal das células, com coloração ortocromática para azul de toluidina-HCl, afinidade pela coloração por prata (“argentaffin”) e por cromo (“enterochromaffin”); e (2) células presentes ao longo das vilosidades, sendo encontradas inclusive nos ápices, com formato fusiforme, que chegam até a luz do intestino, apresentam coloração metacromática para azul de toluidina-HCl e negativa para coloração tanto por prata quanto por cromo (Luppá, 1977). Pela técnica de Imunohistoquímica para diferentes peptídeos reguladores da secreção e da motilidade gastrointestinal, Yamada et al. (1987) dividem esses dois tipos morfológicos de células enteroendócrinas em doze subtipos distribuídos pelo epitélio de revestimento do intestino delgado e grosso de *Caiman latirostris*.

2.2.2.2 Lâmina própria

A lâmina própria é formada por tecido conjuntivo frouxo areolar (Jin et al., 1990), apresentando fibras reticulares, fibras elásticas, fibroblastos, infiltração linfocitária, granulócitos eosinofílicos e mastócitos, vasos sanguíneos, eventualmente apresentando o granulócito eosinofílico do tipo heterófilo, fibras musculares percorrendo longitudinalmente a vilosidade, projetadas a partir da muscular da mucosa bastante evidente e o quilífero central, vaso linfático de maior calibre que os vasos sanguíneos e que percorre longitudinalmente a vilosidade (Jin et al., 1990; Kotzé et al., 1992; Reese, 1913). Na região próxima a muscular da mucosa, os quilíferos centrais se expandem, formando os seios linfáticos. Os seios linfáticos são drenados pelos vasos linfáticos que percorrem pelas túnicas

musculares até a serosa, de onde, finalmente, partem os vasos linfáticos mesentéricos (McCauley, 1956).

A presença de glândulas intestinais (criptas de Lieberkühn) em crocodilianos é motivo de debate na literatura. Em crocodilo do Nilo, são bastante desenvolvidas (Kotzé et al., 1992), mas são completamente ausentes em *Caiman yacare* segundo Aleixo (2011b) ou pouco desenvolvidas no intestino delgado e presentes de maneira difusa no intestino grosso, segundo Jin et al. (1990). Também em *Caiman latirostris*, Starck et al. (2007), entendem que não há a formação de criptas típicas. Em jacaré do pantanal, portanto, o epitélio de revestimento de duas vilosidades intestinais contíguas são relativamente afastados entre si e pouco aprofundados na *lamina propria*, formando um vale alargado, com aspecto similar à abertura das criptas presentes nos mamíferos e aves. As criptas, por sua vez, seriam formadas por epitélios de revestimento próximas umas das outras, causado pelo espessamento da lâmina própria. Por não formar criptas intestinais típicas e para enfatizar as diferenças morfológicas existentes entre as vilosidades intestinais de mamíferos/aves com a de crocodilianos, utilizaremos o termo “base das vilosidades intestinais”. A muscular da mucosa é bastante evidente e localiza-se próximo à base das vilosidades intestinais em uma face e próxima à túnica muscular pela face mais externa em relação ao tubo intestinal.

2.2.2.3 Submucosa, túnicas musculares e serosa

A submucosa inexistente em jacaré do pantanal, segundo Aleixo (2011b) ou é pouco desenvolvida, segundo Jin et al. (1990). Em aligátor americano, Reese (1913) também não reconhece a presença de submucosa e em crocodilos do Nilo, a submucosa está presente, porém apresenta-se bastante delgada (Kotzé et al., 1992). Deste modo, não há a formação de *plicae circularis* em crocodilianos.

Em mamíferos, a camada submucosa projeta-se para a luz intestinal, formando *plicae circularis*, conferindo o aspecto de pregas do relevo interno do intestino delgado. A partir das pregas circulares, partem as vilosidades intestinais, formadas apenas pela mucosa. As cristas zigzagueadas e onduladas descritas em crocodilianos são formadas apenas por mucosa, sendo, portanto, estruturas com a mesma descrição histológica das vilosidades intestinais dos mamíferos, porém

sem o aspecto digitiforme destes (Aleixo, 2011a; Fox, 1965; Jin et al., 1990; Luppá, 1977). As glândulas de Brünner, presentes na submucosa do duodeno de mamíferos estão ausentes em jacaré do pantanal (Jin et al., 1990).

As túnicas musculares apresentaram-se divididas em duas camadas, uma circular interna e outra longitudinal externa, sendo a primeira mais desenvolvida. A espessura de ambos os estratos aumenta no jejuno-íleo caudal e no intestino grosso quando comparado com o intestino delgado cranial (Aleixo, 2011a; Jin et al., 1990; Kotzé et al., 1992).

A serosa, formada por tecido conjuntivo denso, reveste externamente o intestino, é contínuo com o mesentério e apresenta vasos linfáticos que se comunicam com os coletores mesentéricos (Luppá, 1977).

2.3 Alterações da mucosa intestinal durante a digestão em répteis

As serpentes que se alimentam infreqüentemente, mas com grandes volumes de alimentos, como no caso da *Python molurus bivittatus* (Starck, Beese, 2001) e cobras, como *Thamnophis sirtalis parietalis* (Starck, Beese, 2002), que apresentam alimentação mais freqüente, apesar de períodos de jejum, e *Caiman latirostris* com o mesmo padrão de alimentação (Starck et al., 2007), aumentam de tamanho em resposta ao processo de digestão. De dois a três dias após início da ingestão de alimentos, a espessura da mucosa intestinal de *C. latirostris* apresenta crescimento de 50% a 100% (Starck et al., 2007), enquanto que a mucosa de Python pode ter aumento de até 300% (Starck e Beese, 2001). Dentre as alterações que levam ao aumento da espessura da mucosa estão a dilatação dos vasos sanguíneos e linfáticos da lâmina própria, aumento do comprimento das microvilosidades dos enterócitos, aumento do comprimento dos enterócitos, que passam a apresentar inclusões de gotículas lipídicas, formando intestino esteatótico, e pela distensão do epitélio de revestimento da vilosidade intestinal. Estas modificações resultam na reorganização dos enterócitos na estrutura epitelial, fazendo com que um epitélio do tipo pseudoestratificado, presente antes da alimentação, passe a apresentar a organização de epitélio do tipo simples pós prandialmente (Secor, 2008; Starck, Beese, 2001, 2002; Starck et al., 2007). Este comportamento, em resposta ao processo de digestão, explicaria porque o epitélio de revestimento das vilosidades

intestinais foi descrito como sendo do tipo simples em jacaré do pantanal por Aleixo (2011b) e por Jin et al. (1990) e em crocodilo do Nilo por Kotzé et al. (1992), enquanto que em *Caiman latirostris* (Yamada et al., 1987) e no aligátor americano (Reese, 1913), foram considerados como pseudoestratificado ou estratificado, respectivamente (Starck et al., 2007).

A contribuição da proliferação celular para o aumento do volume da mucosa intestinal durante processo digestório parece ser mínima, mas certamente contribui, juntamente com a morte celular, para a renovação do epitélio de revestimento da mucosa intestinal.

Com doze horas, já é possível observar incremento de células proliferativas no epitélio de revestimento em Python (Starck, Beese, 2002; Helmstetter et al., 2009). A mesma espécie apresenta 5,9% de células em processo de morte celular no epitélio de revestimento da mucosa intestinal quando em jejum, e passam a apresentar 10% de morte nos dois primeiros dias de alimentação, sendo que no primeiro dia, já é possível observar enterócitos em processo de morte celular. O processo de descamação do epitélio de revestimento, para eliminação das células necróticas e/ou apoptóticas sem que haja ruptura na integridade da membrana, pode ser visualizado ao entre dois a quatro dias após início da alimentação (Lignot et al., 2005; Starck, Beese, 2001, 2002). Estes dados evidenciam a velocidade da resposta da renovação epitelial da mucosa intestinal deflagrado pelo processo de absorção de nutrientes em répteis. Não encontramos na literatura estimativas a respeito do tempo necessário para que o epitélio de revestimento seja completamente renovado (Lignot et al., 2005). Em crocodilianos, não encontramos estimativas de proliferação ou da morte celular no epitélio de revestimento em decorrência da absorção.

A ausência de criptas intestinais em répteis levou Helmstetter et al. (2009) a estudarem a disposição de células multipotentes intestinais no epitélio de revestimento. Ao contrário do que ocorre em mamíferos ou aves, cujas criptas são bastante profundas e onde estão presentes as células multipotentes intestinais, na serpente Python, as células proliferativas estão presentes de maneira dispersa pelas laterais do epitélio de revestimento, intercaladas com células caliciformes, enteroendócrinas e enterócitos não mitóticos, deixando de ocorrer apenas no ápice das vilosidades. Células apoptóticas e/ou necróticas foram observadas restritas ao ápice das vilosidades, sugerindo que a renovação do epitélio de revestimento pela

exclusão dos enterócitos ocorre do mesmo modo que em mamíferos e em aves. Estes dados demonstrados em Python certamente destoam do observado em outras espécies de vertebrados e suscitam a dúvida se a presença de células proliferativas dispersas pelo epitélio de revestimento é uma condição específica para esta espécie ou comum a outros répteis, já que em aves, mamíferos e peixes, a condição frequentemente descrita é a de células proliferativas restritas à base das vilosidades intestinais ou no fundo das criptas intestinais (Aleixo, 2011b).

2.4 Aspectos comparativos dos sítios de absorção lipídica pelo intestino de vertebrados

Os parâmetros físico-químicos dos lipídeos, associados a diversos fatores biológicos, determinam a extensão do intestino recrutado para sua absorção, assim como sua quantidade total absorvida. Dentre os parâmetros físico-químicos podemos citar a natureza do lipídeo, se sólido (gorduras) ou líquido (óleos), se esterificado em triglicéride ou na forma de ácido graxo livre, o tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo e o grau de insaturação (Ockner et al., 1972). Estes parâmetros influenciam a digestibilidade do lipídeo e o fluxo pelo sistema gastrointestinal, consequentemente influenciando o segmento intestinal recrutado para sua absorção. Especialmente dentre os animais heterotermos ectotermos, o fator temperatura contribui substancialmente para a digestibilidade e consequentemente para a absorção dos lipídeos ingeridos. Os fatores bióticos que influenciam o local de absorção dos lipídeos são mais numerosos, como idade, fase do ciclo reprodutivo, estado nutricional, variações na microbiota intestinal e também por variações anatômicas do aparelho gastrointestinal, apresentando, portanto, algumas variações entre as diferentes classes de vertebrados. A seguir, revisamos o processo de absorção lipídica pelos segmentos intestinais em algumas classes de vertebrados.

2.4.1 Absorção de lipídeos pelo intestino de Peixes

Diversos peixes contêm ramificações intestinais que se abrem próximo ao duodeno, os cecos pilóricos, considerados os sítios mais importantes na absorção de lipídeos (Bauermeister et al., 1979; Denstadli et al., 2004; Greene, 1913; Olsen et

al., 1998; Sire et al., 1981; Tocher, 2003). As larvas dos peixes *Coregonus lavaretus* L. (Rösch, Segner, 1990) e *Sparus aurata* L. (Sarasquete et al., 1995) recém-eclodidas e em início da fase de alimentação exógena, ainda não apresentam a diferenciação dos cecos pilóricos, desta forma, a absorção de lipídeos ocorre no intestino anterior. Ainda em consideração a alevinos, Tanaka (1972), dividindo o intestino em três segmentos, observou que os segmentos anteriores e mediais do intestino, compreendendo cerca de 75% do comprimento do intestino total, são responsáveis pela absorção de lipídeos em 21 espécies de peixes. Em larvas de *Dicentrarchus labrax*, Deplano et al. (1991) observaram que lipídeos são absorvidos por todo o intestino pré-valvar, compreendido cranialmente ao reto, porém constatou-se que a maior parte dos lipídeos fora absorvida nos dois terços caudais do intestino pré-valvar, diferentemente das larvas de outras espécies.

Absorção pelos segmentos anterior e médio também ocorre em peixes adultos, independente da zona climática em que ocorrem, como no peixe antártico *Notothenia coriiceps* (Hernandez-Blazquez et al., 2006) ou no peixe tropical *Centropomus parallelus* (Borges et al., 2010). Peixes sem estômago morfológicamente diferenciado, como *Cyprinus carpio* L. e *Tinca tinca* L. (Noaillac-Depeyre, Gas, 1974, 1976), também apresentam absorção lipídica pelos segmentos craniais do intestino.

Conclui-se que os segmentos anteriores do intestino e os cecos pilóricos, quando presentes, são os locais preferenciais para absorção de lipídeos em peixes, e a extensão do intestino em que ocorre a absorção frequentemente se estende aos segmentos mediais, geralmente correspondendo aos 75% do comprimento inicial do intestino. As diferenças na extensão do intestino em que são descritos os processos absorptivos decorre da imprecisão em se reconhecer e comparar os diferentes segmentos do intestino de diferentes espécies de peixes (Hernandez-Blazquez, 1996), pelas diferenças na quantidade total de lipídeo utilizado nos diferentes estudos, uma vez que o excesso de lipídeos tenderia a ser absorvido por maiores extensões do intestino, ou por causa das diferenças entre os perfis de ácidos graxos presentes nos óleos utilizados, que podem ser prontamente absorvidos e por isso absorvidos logo nos segmentos mais craniais, ou demorarem mais para serem absorvidos, sendo absorvidos mais caudalmente. Apesar de pouco explicitado em estudos com peixes, é razoável inferir, baseado nos estudos de mamíferos e aves,

que toda a extensão do intestino delgado de peixe, inclusive os segmentos mais caudais, apresenta capacidade para absorver lipídeos, principalmente quando o animal é submetido a dietas hiperlipídicas (Booth et al., 1961b; Hurwitz et al., 1973).

Interessantemente, Greene (1913) utilizou injeção retal de óleo de oliva em salmonídeos e constatou que os lipídeos eram absorvidos pelos diversos segmentos intestinais, sendo a maior parte absorvida pelos cecos pilóricos e, surpreendentemente, constatou a presença de gotículas lipídicas nas células estomacais da cárdia e do piloro, sendo corroborado pelos achados de Denstadli et al. (2004).

2.4.2 Absorção de lipídeos pelo intestino de Aves

No grupo das aves, a absorção lipídica pelo intestino também foi bastante explorada em espécies de interesse zootécnico, como perus e galinhas. Em galinhas, parte do duodeno é incapaz de absorver lipídeos (Renner, 1965), enquanto que em perus, o duodeno é capaz de absorver 60% do total de óleo de soja adicionado à dieta (Hurwitz et al., 1979). Em ambos os casos, a abertura do ducto pancreático e do ducto biliar ocorre apenas na porção distal do duodeno ascendente (Clench, Mathias, 1995). Uma vez que estes ductos são responsáveis pela secreção de lipase pancreática, que digere os lipídeos e sais biliares, que emulsificam os lipídeos em micelas, o duodeno inicial recebe o lipídeo proveniente do estômago, mas nele não há digestão do lipídeo nem formação de micelas, impossibilitando a absorção lipídica no segmento inicial do duodeno. O intestino de perus, no entanto, é capaz de realizar o movimento retrógrado do quimo (antiperistalse), levando-o de volta ao duodeno, e permitindo que este segmento intestinal possa contribuir com a maior parte da absorção de lipídeos (Hurwitz et al., 1979). Antiperistalse também foi descrito no intestino de galinhas (Renner, 1965), mas a baixa absorção de lipídeos pelo duodeno nesta espécie pode se dever à menor eficiência do efeito retrógrado do quimo quando comparado com perus e não pela incapacidade do duodeno de galinhas em absorver lipídeos. Em favor desta hipótese está o fato de ácido oleico ser absorvido pelo duodeno de galinhas quando este é administrado juntamente com ácido taurocólico, um sal biliar comum em mamíferos (Lionarons et al., 2012; Sklan, 1979).

O efeito do tamanho das cadeias carbônicas dos ácidos graxos e do grau de insaturação na absorção intestinal também foi bastante explorado em aves. Hurwitz et al. (1979) constataram que em perus, quase 90% do ácido linoleico (18:2) é absorvido, sendo que 80% deste total é prontamente absorvido no duodeno, restando apenas 10% para ser absorvido ao longo do restante do intestino. Em contraste, apenas 20% de ácido esteárico (18:0) é absorvido no duodeno e os outros 50%, do total de 70% de absorção para este ácido graxo, são absorvidos caudalmente ao duodeno. Portanto, a dificuldade em se absorver determinado ácido graxo, neste caso ácido graxo saturado, faz com que maior extensão do intestino seja recrutado para a absorção, enquanto que ácidos graxos insaturados são prontamente absorvidos pelos segmentos craniais (Hurwitz et al., 1973; Renner, 1965). O tamanho da cadeia do ácido graxo também apresenta influência direta no local de absorção lipídica, deste modo, mais de 40% do total de 70% de ácido palmítico (16:0) é absorvido nos primeiros centímetros de duodeno de galinhas, enquanto que menos de 20% do ácido esteárico (18:0) é absorvido neste mesmo segmento, apesar de este ácido graxo ser absorvido ao longo dos próximos segmentos intestinais e apresentar os mesmos 70% de absorção do ácido palmítico (Hurwitz et al., 1979).

Os segmentos mais caudais do intestino normalmente não são sítios de absorção de lipídeos ou os absorvem pouco, mas podem ser recrutados para tal também em casos de dietas hiperlipídicas. O íleo de galinhas, por exemplo, foi descrito como sendo competente para a absorção de ácidos esteárico, palmítico e linolênico (Hurwitz et al., 1973). Em galinhas submetidas à remoção parcial do jejuno e ligação do íleo ao duodeno, observou-se a capacidade do íleo em absorver ácido oleico, embora com menor afinidade do que o jejuno (Sklan et al., 1999). Este experimento corrobora a hipótese de que o maior empecilho para que haja a absorção de ácidos graxos pelos segmentos caudais do intestino delgado é a alta eficiência dos segmentos craniais em absorver grande parte dos lipídeos, restando pouco lipídeo a ser absorvido caudalmente.

Em aves, os cecos intestinais, quando estão presentes, localizam-se caudalmente, na transição entre o intestino delgado e intestino grosso, variando em comprimento, morfologia e número (Clench, Mathias, 1995). Embora tenha sido descrito que os cecos intestinais e o intestino grosso de galinhas em condições

normais não absorvam lipídeos provenientes de dietas (Hurwitz et al., 1973, 1979), não encontramos nenhum relato de experimentos testando a capacidade de absorção pelo ceco intestinal ou pelo intestino grosso de aves.

2.4.3 Absorção de lipídeos pelo intestino de mamíferos

Estudos em mamíferos conflitam quanto ao segmento do intestino delgado que preferencialmente absorve lipídeos, principalmente porque os diferentes grupos de pesquisa utilizam metodologias e modelos animais diferentes entre si (Gump et al., 1961). Discute-se se o principal segmento para absorção de lipídeos seja o duodeno e segmento cranial do jejuno ou o segmento caudal do jejuno e o íleo (Borgström et al., 1962, 1974; Frazer, 1943; Gump, Barker, 1968). Este panorama também aparece em mamíferos ruminantes: Bauchart (1993) menciona que os segmentos craniais do jejuno absorvem 15-25% de lipídeos e os segmentos caudais absorvem 55-65%, enquanto que Bennett (1964) descreve a absorção de lipídeos ocorrendo com máxima intensidade no duodeno próximo ao piloro e ao longo dos 25% do comprimento inicial do jejuno, e o restante do lipídeo disponível sendo absorvido pelos segmentos caudais do jejuno e no íleo.

Embora divergentes, estes estudos demonstram uma característica interessante da fisiologia intestinal com relação à dieta lipídica, que é a capacidade de absorção do lipídeo por grande parte, senão por toda a extensão do intestino delgado. Do mesmo modo que observado em aves, também em cachorros submetidos a cirurgias de remoção do jejuno cranial/mediano (jejunostomia) ou do íleo (ileostomia) e alimentados com ácidos graxos livres, que não necessitam de digestão, não ocorre diferença significativa no volume de ácidos graxos presentes no plasma sanguíneo, indicando absorção intestinal semelhante em ambos os segmentos, embora ocorra ligeira esteatorréia quando estes são comparados com o controle, sem remoção intestinal (Gump et al., 1961). Quando os animais são tratados com triglicérides, porém, os animais jejunostomizados apresentam esteatorréia aumentada, indicando que os segmentos craniais são importantes para absorção de lipídeos que necessitem ser digeridos, embora os segmentos caudais ainda possam absorver quantidades significativas de lipídeos, provavelmente pela presença de esterases presentes na borda em escova dos enterócitos (Gump,

Barker, 1968). Sukhotnik et al. (2003) demonstraram que após remoção parcial do intestino, a porção remanescente é capaz de aumentar sua área absorptiva, aumentando a quantidade de enterócitos totais e alongando as vilosidades intestinais, processos induzidos pela presença de lipídeos na luz intestinal. Esta plasticidade intestinal restaura a grande capacidade absorptiva para os ácidos graxos.

Outra evidência experimental que corrobora a hipótese de que os lipídeos podem absorvidos por toda extensão do intestino delgado dos mamíferos são os experimentos em que concentrações crescentes de lipídeos são administradas aos animais. Nestes casos, os lipídeos são absorvidos por toda extensão do jejuno e chegam a ser absorvidos também pelo íleo (Booth et al., 1961a; Booth et al., 1961b). Os cecos intestinais não contribuem com a absorção de lipídeos nos mamíferos.

Ácidos graxos de cadeia pequena, com menos de 9 carbonos, são produzidos por fermentação, a partir das fibras dietéticas, pela microbiota residente no intestino grosso de mamíferos e são absorvidos pelo cólon (McNeil et al., 1978). Em logomorfos, ácidos acético, propiônico e butírico, perfazem de 30% a 40% da necessidade energética metabólica, e em humanos, a absorção de ácidos graxos de cadeia pequena pelo cólon pode acrescentar 100KJ de caloria após refeição contendo vinte gramas de fibras (McNeil et al., 1978). Em ruminantes, ácidos graxos voláteis de dois a seis carbonos, são produzidos pela microbiota presente no rúmen e são absorvidos tanto no rúmen quanto no abomaso (Hocquette, Bauchart, 1999). Alguns estudos ainda demonstraram que ácidos graxos de cadeia média são absorvidos pelo estômago de mamíferos, uma vez que a digestão dos triglicérides que contém estes ácidos graxos de cadeia média é realizada pelas lípases linguais e/ou estomacais (Ramírez et al., 2001).

2.4.4 Absorção de lipídeos pelo intestino de répteis

Em crocodilianos, o ducto biliar comum e o ducto pancreático abrem-se na segunda metade do duodeno, em sua porção ascendente, assim como ocorre em galiformes, porém como o duodeno de crocodilianos é bastante curto quando comparado com o das aves (Chiasson, 1962; Xu et al., 1997), o segmento duodenal que não participaria da absorção lipídica é bastante curto. Movimentos antiperistálticos foram descritos no sistema gastrointestinal de crocodilianos,

relacionado ao reflexo de regurgitação (Andrews, et al., 2006), e em alguns répteis herbívoros, antiperistalse ocorre na cloaca para redirecionar o bolo alimentar para o intestino grosso, retendo o quimo por mais tempo no cólon para maximizar a absorção de nutrientes (Bjorndal, Bolten, 1993). Deste modo, é possível que também em crocodilianos, a antiperistalse possa contribuir para que haja absorção lipídica pelo segmento mais cranial do duodeno, como ocorre em algumas aves.

Estudos feitos *in vitro* com segmentos de intestino delgado da tartaruga *Chrysemys picta* (Fox, 1965) e em crocodilianos *in vivo* (Garnett, 1985, 1988; Staton et al., 1990a, 1990b, 1990c, 1992), sugerem que a digestibilidade aparente para os diversos ácidos graxos em répteis ocorre de acordo com o observado em outros vertebrados, mas estes estudos não demonstraram a extensão do intestino recrutado para a absorção.

Figura 2 – Modelo de absorção lipídica pelo intestino de um vertebrado hipotético.

Modelo hipotético em que são incluídas as principais variações anatômicas do sistema gastrointestinal de diferentes classes de vertebrados, para representar o processo genérico de absorção de lipídeos provenientes da dieta no filo dos vertebrados.

Fonte: Arquivo pessoal.

Podemos concluir, portanto, que nas diferentes classes de vertebrados estudados, os segmentos intestinais que preferencialmente absorvem lipídeos são os segmentos proximais do intestino delgado: cecos pilóricos, quando estes estão presentes, duodeno, jejuno cranial, jejuno medial e podendo chegar até o jejuno caudal ou íleo, dependendo da espécie analisada. Quanto maior o grau de

solubilidade dos lipídeos na água de solvatação presente nas proximidades da borda em escova dos enterócitos, mais facilmente serão digeridos e absorvidos, portanto serão absorvidos em segmentos mais craniais (Ramírez et al., 2001). Este é o caso para ácidos graxos de cadeias pequenas ou médias, insaturadas e com baixo ponto de fusão (figura 5).

O intestino, no entanto, é um órgão com plasticidade e apresenta amplas adaptações fisiológicas em resposta aos fatores ambientais. Quando o organismo depara-se com dietas hiperlipídicas, os segmentos craniais do intestino delgado possuem a capacidade de aumentar a absorção de lipídeos, enquanto que os segmentos caudais também passam a absorvê-lo, fazendo com que pouca energia calórica ingerida seja perdida nas fezes (Booth et al., 1961a; Singh et al., 1972; Townsend et al., 2008).

2.5 Aspectos moleculares da absorção lipídica

A absorção dos triglicérides pode ser dividida em quatro etapas, generalizadas a partir de mamíferos: (1) digestão dos lipídeos em ácidos graxos e monoacilglicerol; (2) absorção dos produtos da digestão lipídica pelos enterócitos, onde são novamente reesterificados em triglicérides pelo Retículo Endoplasmático; (3) formação de gotículas lipídicas no citoplasma, a partir dos triglicérides reesterificados pelo Retículo Endoplasmático; e (4) utilização dos triglicérides a partir do Retículo Endoplasmático e/ou das gotículas lipídicas para a formação de lipoproteínas que serão secretadas para a lâmina própria, a partir da mucosa intestinal.

2.5.1 Digestão de triglicérides

A digestão de triglicérides, que compõe 90% dos lipídeos ingeridos por um animal carnívoro, é feita principalmente por lipases pancreáticas e em menor grau, por lipases linguais e/ou estomacais. Lipases são enzimas hidrossolúveis que agem na interface água-óleo. O sítio ativo enzimático das lipases têm acesso apenas aos triglicérides presentes na porção mais externa da gota de óleo (na interface água-óleo), e hidrolisa dois ácidos graxos do triglicéride, formando monoacilglicerol. Os

produtos da digestão, por serem anfipáticos, acumulam-se na interface, bloqueando acesso das lipases aos triglicérides, impedindo a progressão da digestão. Deste modo, os sais biliares produzidos pelo fígado são fundamentais para homogeneizar-se com os ácidos graxos livres e monoacilglicerol, formando micelas e removendo-os da interface, permitindo acesso da lipase a mais triglicérides a serem hidrolisados (Wilde, Chu, 2011).

As lipases, principalmente as produzidas no pâncreas de mamíferos, são moléculas com grande especificidade, hidrolisando os ácidos graxos que foram esterificados na posição *sn1* e *sn3* do triglicéride, formando, portando, *sn2*-monoacilglicerol, que juntamente com os dois ácidos livres gerados e emulsificados em micelas pelos sais biliares, poderão ser absorvidos pelos enterócitos. Alguns peixes, no entanto, apresentam lipases inespecíficas, que hidrolisam eficientemente os ácidos graxos presentes nas três posições de esterificação, gerando glicerol e três moléculas de ácidos graxos livres (Cowey, Sargent, 1977). Não encontramos na literatura, informações sobre lipases de répteis, deste modo, não sabemos se em crocodilianos, a absorção de lipídeos ocorre na forma de ácidos graxos livres e glicerol ou monoacilglicerol.

2.5.2 Passagem de ácidos graxos e monoacilglicerol pela membrana dos enterócitos

Os lipídeos são absorvidos na forma de ácidos graxos livres e monoacilglicerol em mamíferos ou ácidos graxos livres e glicerol em animais que apresentam lipases inespecíficas, como em peixes. Diferentemente de outros nutrientes, como carboidratos, aminoácidos ou di- tri-peptídeos, a absorção maciça de lipídeos provenientes da dieta pelos enterócitos não necessita de transportadores para atravessar a membrana, ocorrendo por simples difusão (Abumrad, Davidson, 2012). Talvez este fenômeno explique porque toda a extensão do sistema gastrointestinal, incluindo região pilórica do estômago e intestino grosso, apresenta potencial capacidade para a absorção de lipídeos (Denstadli et al., 2004; Greene, 1913). Deste modo, os segmentos caudais do intestino, que normalmente não são recrutados para absorção, passam a fazê-lo com o excesso de lipídeo presente na dieta, quando os segmentos craniais se tornam saturados.

Uma vez que para haver a absorção de ácidos graxos é necessária a presença de sais biliares que solubilizam os ácidos graxos na água de solvatação presente na borda em escova dos enterócitos, o único impedimento para a absorção de lipídeos pelos segmentos caudais do intestino seria a ausência de lipídeo solubilizado em micelas. Intestino grosso geralmente não apresenta absorção de lipídeos, sendo um dos fatores para tal, a absorção de sais biliares ocorrendo em segmentos anteriores a ele, geralmente no íleo. Apesar disso, cerca de 10% de sais biliares são perdidos diariamente pelas fezes, sugerindo que parte dos sais biliares chegam até a porção final do intestino, o que permitiria que pequenas quantidades de ácidos graxos pudessem ser absorvidos também pelo intestino grosso.

A presença de proteínas integrais de membrana nos domínios apicais de enterócitos, como FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase/CD36) (Drover et al., 2005), FATP4 (Fatty Acid Transport Protein) (Shim et al., 2009) e FABPpm (plasma membrane Fatty Acid Binding Protein), transportadores ativos de lipídeos pela membrana de hepatócitos, levantou a suspeita de que estas proteínas pudessem participariam do transporte ativo de lipídeos também pela membrana plasmática de enterócitos. No entanto, a inativação destes genes em camundongos mutantes, não eliminou por completo a absorção de lipídeos pelos enterócitos (Abrumrad, Davidson, 2012; Drover et al., 2005; Shim et al., 2009), reforçando a hipótese de transporte passivo dos ácidos graxos pela membrana dos enterócitos. Atualmente, acredita-se que a função principal destas proteínas seja a de reguladoras da absorção de ácidos graxos, removendo-os da membrana plasmática e transportando-os para os subcompartimentos celulares onde serão metabolizados, como no Retículo Endoplasmático. Com a remoção dos ácidos graxos difundidos pela membrana plasmática dos enterócitos, a concentração de ácidos graxos na membrana é mantida baixa, permitindo a difusão de mais lipídeos (Abumrad, Davidson, 2012; Glatz et al., 2010; Mansbach, Gorelick, 2010). Argumenta-se, ainda, que o transporte de ácidos graxos mediado por proteínas de membrana possa ser mais importante em organismos submetidos a dietas com baixos teores de lipídeos, ou para ácidos graxos mais específicos, que ocorrem com escassez na dieta, tornando mais eficiente a sua absorção e provendo o organismo com ácidos graxos necessários para a manutenção do seu metabolismo (Tso et al., 2004).

A entrada de ácidos graxos nos enterócitos pode se dar pelos domínios apical ou basolaterais da membrana celular. A entrada de lipídeos pelas membranas basolaterais dos enterócitos, provenientes da circulação sanguínea, favorece a oxidação de ácidos graxos pelos enterócitos e a síntese de fosfolipídeos de membrana (Abumrad, Davidson, 2012; Mansbach, Gorelick, 2010). Como o domínio apical do enterócito está direcionado para o lúmen intestinal, este domínio de membrana absorve lipídeos provenientes da dieta, e o principal destino deste lipídeo é a síntese de triglicérides pelo Retículo Endoplasmático e a formação de gotículas lipídicas ou lipoproteínas de secreção.

Proteínas associadas às membranas dos diferentes domínios dos enterócitos (apical *versus* basolateral) desempenham o papel de direcionar os lipídeos absorvidos para os diferentes subcompartimentos celulares que metabolizam o lipídeo. Dentre estas proteínas, podemos destacar a importância de FABPs (*Fatty Acid Binding Protein*), uma vez que estas proteínas foram descritas como sendo responsáveis, pelo menos indiretamente, pela absorção de grandes quantidades de lipídeos pelos enterócitos (Atshaves et al., 2010; Weisiger, Zucker, 2002), em um processo chamado de transporte vetorial de lipídeos. A expressão proteica de FABPs corresponde a cerca de 2-5% do total proteico no citoplasma do enterócito, evidenciando sua importância na absorção de lipídeos provenientes da dieta (Storch, Thumser, 2000).

2.5.3 Formação de gotículas lipídicas

As gotículas lipídicas presentes nos enterócitos normalmente apresentam alguns micrômetros de diâmetro (<1 a >5 μm), mas seu tamanho é extremamente variável devido ao metabolismo celular que controla sua gênese e utilização. As gotículas lipídicas são formadas pelo acúmulo de moléculas de lipídeos neutros, na forma de triglicérides, misturadas a algumas moléculas de éster de colesterol e envolvidas por monocamada de fosfolipídeos, proveniente do Retículo Endoplasmático. Os ácidos graxos e monoacilglicerol absorvidos pelos enterócitos são transportados até o Retículo Endoplasmático por FABPs, por exemplo, onde diversas enzimas associadas à membrana reticular sintetizam os triglicérides, que passam a acumular entre as hemicamadas da membrana reticular. O acúmulo de

triglicérides entre as hemicamadas faz brotar uma vesícula, que carrega consigo a monocamada fosfolipídica proveniente do Retículo Endoplasmático e algumas proteínas associadas ao metabolismo de síntese de triglicérides e lipólise. A formação de gotículas lipídicas também pode ocorrer pela fusão de gotículas lipídicas menores, previamente existentes no citoplasma (Wilfling et al., 2014) ou pela formação *de novo* de triglicérides na própria gotícula lipídica, uma vez que sua membrana apresenta enzimas capazes de síntese de triglicérides a partir de ácidos graxos e monoacilglicerol e/ou glicerol (Kuerschner et al., 2008).

Em alguns organismos em que não existem tecidos especializados para o armazenamento lipídico (adipócitos e/ou fígado), como é o caso do nematoide *C. elegans*, as gotículas lipídicas presentes nos enterócitos apresentam papel central como reserva de lipídeos (Mak, 2012). Nestes casos, mas não restrito a estes organismos, as gotículas lipídicas participam de diversas vias metabólicas, como por exemplo, na beta-oxidação pelas mitocôndrias e peroxissomos. Para isso, as gotículas lipídicas apresentam diversas enzimas associadas em sua monocamada lipídica, como ATGL (Lipase para Triglicérides de Adipócitos) e Acyl-CoA sintetase, que, respectivamente, digerem os triglicérides em ácidos graxos livres e o conjugam à Coenzima-A para serem utilizados no ciclo do ácido cítrico mitocondrial (Mullaney, Ashrafi, 2005).

Em vertebrados, as gotículas lipídicas, além de serem utilizadas na beta-oxidação, apresentam a função de reserva temporária de lipídeos, e costumam ocorrer em condições em que os animais enfrentam dietas hiperlipídicas, gerando uma condição de esteatose intestinal temporária, uma vez que os enterócitos são praticamente incapazes de regular a difusão de ácidos graxos por sua membrana plasmática e apresentam capacidade limitada de produzir e/ou secretar os triglicérides forma de lipoproteínas. Eventualmente, os triglicérides presentes nas gotículas lipídicas são novamente digeridos em ácidos graxos e monoacilglicerol por lipases do Retículo e/ou associadas à própria gotícula e novamente esterificados para serem secretados dos enterócitos, via complexo de Golgi, como lipoproteínas (Mansbach, Dowell, 2000).

Alguns experimentos de inibição farmacológica da síntese e da secreção de lipoproteínas, bem como a mutação de alguns genes que regulam estes processos, corroboram a hipótese de função das gotículas lipídicas como reserva temporária de

lipídeos, ocorrendo apenas enquanto as lipoproteínas não esgotarem o estoque de triglicérides armazenados nos enterócitos. Nestes casos, a diminuição de secreção de lipoproteínas está associada à formação de intestino esteatótico de modo mais duradouro (Goudriaan et al., 2002; Tso et al., 1980). Fontagné et al. (1998), adicionando fosfatidilcolina na alimentação de *Cyprinus carpio* L. que continha óleo de amendoim, notaram a diminuição de gotículas lipídicas nos enterócitos e maior fluxo de quilomícrons e VLDL para o fígado, sugerindo que o limitante para a formação lipoproteínas de secreção é o tempo necessário para a síntese de fosfolipídeos para formar membranas celulares a serem usadas no empacotamento das gotículas.

Uma vez que a formação de gotículas lipídicas está associada à inabilidade temporária dos enterócitos em produzir lipoproteínas secretórias em uma taxa suficientemente rápida para utilizar os ácidos graxos absorvidos intensamente, diversas condições influenciarão a formação de intestino esteatótico, como por exemplo, a quantidade de lipídeos presentes na dieta, a digestibilidade e a capacidade de absorção deste lipídeo. Deste modo, lipídeos facilmente digeridos e absorvidos, como óleos vegetais, que apresentam grandes concentrações de ácidos graxos poli-insaturados, tenderiam a se acumular nos enterócitos formando gotículas lipídicas, enquanto que ácidos graxos saturados, mais dificilmente esterificados em triglicérides, contribuiriam menos com a formação de gotículas lipídicas (Listenberger et al., 2003). Óleos vegetais são eficientemente digeridos e absorvidos por peixes carnívoros, levando à formação de gotículas lipídicas nos enterócitos, como é o caso em *Salvelinus alpinus* L. alimentada com suplementação de óleo de linhaça (Olsen et al., 2000), *Notothenia coriiceps* após injeção intragástrica de óleo de milho (Hernandez-Blazquez et al., 2006), *Oncorhynchus mykiss* com alimentação adicionada de óleo de soja (Caballero et al., 2003) e larvas de *Cyprinus carpio* L. alimentadas com adição óleo de amendoim (Fontagné et al., 1998).

A condição corpórea prévia também pode influenciar a formação de gotículas lipídicas nos enterócitos. Por exemplo, camundongos obesos apresentam intestino esteatótico mesmo em condições de jejum (Douglas et al., 2012) e animais previamente alimentados retêm parte dos lipídeos no intestino, sendo secretados em um segundo pulso de alimentação contendo lipídeos (Jackson et al., 2002).

2.5.4 Transporte de lipoproteínas a partir da mucosa intestinal

Os lipídeos absorvidos pelo intestino podem adquirir diversas rotas metabólicas, dependendo de fatores como o status nutricional do animal (i.e. alimentado *versus* jejum), do tamanho da cadeia carbônica dos ácidos graxos ingeridos e também da espécie analisada. Grande parte dos lipídeos absorvidos é transportada para fora da mucosa intestinal na forma de lipoproteínas, após reesterificação dos ácidos graxos e glicerol (ou monoacilglicerol dependendo da espécie considerada) em triglicéride e formação de quilomícrons e/ou VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa), para serem transportados pelos vasos linfáticos, no caso de lipoproteínas grandes, os quilomícrons, ou pelo sistema circulatório, como no caso de lipoproteínas pequenas, em geral não maiores do que 30 nm de diâmetro (Casley-Smith, 1962; Ramírez et al., 2001). Especialmente no caso de aves, que possuem o sistema linfático pouco desenvolvido, as lipoproteínas formadas são de menor tamanho (portomícrons) e são transportadas pelo sistema circulatório pelo sistema porta-hepático (Arija et al., 2000; Baião, Lara, 2005; Fraser et al., 1986; Hermier, 1997; Noyan et al., 1964; Sklan et al., 1984).

Alguns ácidos graxos, especialmente os com menos de 12 carbonos, podem associar-se a albumina, sendo solubilizados no líquido intersticial e, sem serem reesterificados, são transportados pelo sistema circulatório diretamente a partir da mucosa intestinal (Griffin, 2009). Ocorre, por exemplo, em aves, nas quais cerca de 27% a 31% dos ácidos graxos são transportados desta forma pelo sistema venoso até o fígado (Stevens, 2004).

Diversas condições podem influenciar a via de transporte dos lipídeos a partir da mucosa intestinal, como por exemplo, o tipo de lipídeo utilizado na alimentação. Ácidos graxos poli-insaturados promovem a formação de quilomícrons e ácidos graxos saturados promovem a formação de VLDL (Sire; Sakr et al., 1997; Greevenbroek, Erkelens e Bruin, 2000). Deste modo, o tipo de óleo utilizado na dieta pode levar ao sistema circulatório contribuir mais ou menos para o transporte dos lipídeos a partir da mucosa intestinal (Mansbach, Dowell, 2010). Deste modo, é importante avaliarmos o modo de transporte de lipídeos nos crocodilianos, completamente desconhecido.

2.6 Efeito de diferentes fontes lipídicas na modulação do sistema imune inato

É bem aceito, em mamíferos, que ácidos graxos ômega-6 apresentem papel pró-inflamatório do sistema imune inato na mucosa intestinal, enquanto que ácidos graxos ômega-3 apresentem papel anti-inflamatório e deprimem a resposta leucocitária neste contexto. Camundongos alimentados com óleo de soja ou óleo de milho, ricos em ácidos graxos poli-insaturados ômega-6, principalmente ácido linoleico (18:2 n-6), apresentam infiltração intensa de macrófagos e neutrófilos na mucosa intestinal quando o intestino é desafiado com bactérias (Ghosh et al., 2013; Hekmatdoost, 2013). Por outro lado, a adição de ácidos graxos ômega-3, presentes em óleos de peixe, diminuem o recrutamento de macrófagos e neutrófilos após desafio destes animais com antígenos bacterianos. Também ácido oleico (18:1 n-9), abundante em óleo de soja e de milho, apresenta papel pró-inflamatório em ratos, uma vez que sua adição dietética também causa aumento de recrutamento de neutrófilos para sítios de infecção (Rodrigues et al., 2010).

Interessantemente, a alimentação com óleos vegetais ricos em ácidos graxos ômega-6 está correlacionada com o aumento de morte celular na mucosa intestinal e com relativo pouco aumento na taxa de proliferação celular, desbalanço que provoca inibição da renovação do epitélio de revestimento da mucosa intestinal. Ainda, está associada ao remodelamento tecidual drástico, que consiste na formação de edema na submucosa, diminuição de células caliciformes e extensivas lesões no epitélio de revestimento, causando exposição da lâmina própria para a luz intestinal e aumentando a translocação de bacteriana residentes intestinais ou patogênicas oportunistas, para a lâmina própria da mucosa intestinal. Estes eventos não ocorrem em animais alimentados com óleos ricos em ômega-3 (Ghosh et al., 2013; Hekmatdoost, 2013). Ghosh et al. (2013) demonstraram que animais alimentados com ácidos graxos ômega-3 sofrem sepsia e apresentaram aumento das taxas de mortalidade, induzidas por infecção bacteriana, quando comparados com animais alimentados com ácidos graxos ômega-6 (Ghosh et al., 2013). Deste modo, em mamíferos, os ácidos graxos ômega-6 exacerbam a resposta imune na mucosa intestinal, capaz de provocar a lesão tecidual, mas o sistema imune é eficiente e impede alastramento do processo infeccioso, enquanto que em animais alimentados com ácidos graxos ômega-3, há supressão do sistema imune inato na

mucosa intestinal, permitindo a instalação de infecção bacteriana sistêmica e levando o hospedeiro à morte (Ghosh et al., 2013; Hekmatdoost et al., 2013).

Os efeitos pró e anti-inflamatórios dos ácidos graxos são atribuídos à capacidade destes ácidos serem metabolizados em eicosanoides, como prostaglandinas, leucotrienos e resolvinas, moléculas lipídicas mediadoras da ativação ou supressão da função leucocitária. Ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) ingeridos na dieta são metabolizados por enzimas dessaturases e alongases, para gerar ácidos graxos altamente insaturados (HUFA), que são incorporados nas membranas celulares na forma de fosfatidilcolina e fosfatidiletalona. PUFA ômega-6, como ácido linoleico (18:2 n-6), são metabolizados gerando ácido araquidônico (AA, 20:4 n-6), e PUFA ômega-3, como ácido alfa-linolênico (18:3 n-3), geram ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) e docosaexaenoico (DHA, 22:6 n-3) (Calder, 2013). Estes HUFAs incorporados nas membranas celulares são hidrolisados por fosfolipases de membrana gerando os eicosanoides que atuam na resposta imune. Eicosanoides produzidos a partir de DHA e EPA possuem efeito supressor do sistema imune, como diminuição do recrutamento de macrófagos e neutrófilos, enquanto que AA apresenta efeito ativador do recrutamento destes leucócitos, pela produção de eicosanoides que recrutam macrófagos e neutrófilos, explicando porque a ingestão de diferentes PUFAs e/ou HUFAs (ômega-3 *versus* ômega-6) modulam a resposta imune (Wall et al., 2010).

Este padrão observado em mamíferos pode não se aplicar para outras classes de vertebrados. O efeito de ácidos graxos ômega-3/ômega-6 sobre o sistema imune de peixes, por exemplo, é bastante contraditório, apesar da abundante investigação sobre o tema (Bell, Sargent, 2003; Oliva-Teles, 2012). Isso decorre principalmente por causa da variedade de protocolos utilizados nos diferentes estudos e pela grande diversidade de espécies utilizadas, demonstrando a diversidade metabólica para os lipídeos e consequentemente a complexidade das respostas imune frente aos lipídeos provenientes da dieta nesta classe de vertebrados (Blazer, 1992).

Peixes marinhos não apresentam dessaturases e alongases, não sendo capazes de gerar HUFAs a partir de PUFAs. A produção de eicosanoides a partir de HUFAs nos peixes marinhos pode ficar comprometida caso estas espécies não

sejam alimentadas com óleos/alimentos que contenham HUFAs, como peixes ou óleos de peixe. Nestes casos, a substituição de óleos de peixes por óleos vegetais é feita apenas parcialmente para que não seja comprometida a resposta imune. Por exemplo, a espécie de peixe marinha *Sparus aurata* L. alimentada com mistura de óleos de origem vegetal, como óleo de linhaça, soja e canola e contendo óleo de peixe (Montero et al., 2003), apresentam parâmetros imunológicos similares a peixes alimentados com óleo de peixe exclusivamente.

Em peixes dulçaquícolas, os quais apresentam capacidade de produzir HUFAs a partir de PUFAs, a adição de óleos vegetais pode ser mais extrema, sem afetar os parâmetros de imunidade. Em geral, a adição de óleos de fontes únicas, sejam de origem de peixes, sejam de origem vegetal, suprimem a resposta imune, enquanto que misturas de diversas fontes de óleos costumam apresentar respostas mais satisfatórias, embora neste caso as causas possam ser diversas (Bell, Sargent, 2003; Fracalossi, 1994). Para cada espécie, portanto, necessita-se identificar o balanço correto entre ácidos graxos ômega-3/ômega-6 tanto de PUFAs quanto de HUFAs para que não haja supressão da imunidade (Arts, Kohler, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção dos animais e desenho experimental

Sete animais com tamanho médio de $32,21 \pm 3,05$ cm de comprimento, medidos a partir do focinho até início da cloaca e peso médio de $594,34 \pm 166,81$ g foram gentilmente cedidos pela COOCRIJAPAN, fazenda de jacarés do pantanal localizada no município de Cáceres, Mato Grosso, Brasil.

Durante o mês de fevereiro de 2012, os animais foram mantidos por 6 a 8 dias em tanque de concreto queimado, com dimensões de 70 cm por 200 cm, preenchido por água, sendo uma parte mais profunda, com 20 cm de profundidade, permitindo a submersão completa dos animais e outra mais rasa, com 5 cm de profundidade, permitindo a emersão parcial. O tanque localizava-se dentro de galpão coberto por telhas de amianto, sem incidência solar direta, mas permitindo aos animais a percepção do ciclo claro-escuro natural. Os animais foram mantidos em temperatura ambiente durante todo o tempo de experimentação: temperatura média do ar $31,50 \pm 1,70$ °C, sendo a máxima de 33 °C e a mínima de 29 °C, e temperatura média da água de 24 °C.

Os animais foram mantidos com água *ad libitum* e jejuaram por 5 dias, para eliminação do conteúdo gastrointestinal. Para realizar a injeção intragástrica de óleo de soja, os animais foram imobilizados com a boca aberta e 5 ml de óleo de soja comercial foram injetados diretamente no estômago dos animais com auxílio de mangueira de silicone de 4 mm de diâmetro externo, acoplada a seringa (figura 3). O volume de óleo de soja administrado foi calculado segundo a fórmula:

$$v = (p.g)/d$$

Sendo: v = volume de óleo administrado; p = peso médio dos animais utilizados; g = consumo médio de gorduras pelos animais; d = densidade do óleo de soja a 30 °C.

O valor de g utilizado no cálculo foi 0,008, uma vez que o consumo de alimentos pelos animais mantidos em cultura é de cerca de 10% do seu peso corporal e que a alimentação oferecida contém, em média, 8% de gorduras totais

(entre 4% e 12%) (Aleixo, 2011b). A densidade do óleo de soja a 30 °C é, em média, de aproximadamente 0,93 g/ml (Hammond et al., 2005). A quantidade de lipídeos ingeridos por estes animais em sistema de cultura seria entre 3,66 ml e 6,94 ml, para o menor e o maior animal, respectivamente, considerando o teor médio de 8% de gorduras presentes na dieta.

Figura 3 – Imobilização do jacaré do pantanal e manobra adotada para a injeção intragástrica de óleo de soja.

Com o auxílio de tubo siliconado de diâmetro apropriado ao tamanho do animal e seringa, o óleo de soja, ou solução controle, foi injetado diretamente no estômago do animal. Barra: 2,0 cm.
Fonte: Arquivo pessoal.

Os animais foram sacrificados a cada 24 horas até o prazo de 72 horas, sendo amostrados dois animais por dia. O animal controle (n=1) foi injetado com 5 ml de água mineral e sacrificado após 48 horas da injeção intragástrica. O sacrifício foi realizado por veterinário, com pistola de dardo cativo direcionado ao osso frontal.

O protocolo para experimentação animal estava de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratórios (SBCAL) e aprovado pela Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo: protocolo número 131, página 110, livro 02.

A autorização para atividades científicas com animais silvestres foi emitida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO - ICMBIO) do Ministério do Meio Ambiente: autorização número 30509-2 de 30 de Agosto de 2011 (Anexo B).

3.2 Coleta dos segmentos intestinais

Após exposição da cavidade abdominal, o intestino delgado foi separado do mesentério dorsal, do estômago e do intestino grosso e posteriormente segmentado em duodeno e jejuno-íleo. Duas amostras foram colhidas do duodeno, sendo uma da região central do duodeno descendente, próximo ao piloro e uma da região central do duodeno ascendente, próximo ao jejuno-íleo. Os dois segmentos foram analisados conjuntamente e designados apenas como duodeno. O jejuno-íleo foi amostrado quatro vezes, a parte central de cada $\frac{1}{4}$ do seu comprimento total. As duas amostras mais craniais foram arbitrariamente consideradas como jejuno-íleo cranial e as duas amostras mais caudais foram consideradas como jejuno-íleo caudal. O intestino grosso foi amostrado uma vez, sendo retirada a porção média (figura 4).

Figura 4 – Pontos de coleta ao longo do intestino delgado e do intestino grosso.

As linhas tracejadas indicam os pontos de coleta dos segmentos intestinais amostrados. Desenho sem escala.
Fonte: Arquivo pessoal.

Os segmentos intestinais foram seccionados transversalmente, com 1 cm de comprimento, com o auxílio de navalha de aço e imediatamente fixados. Após fixação, as seções transversais dos segmentos intestinais tiveram a região ventral cortada longitudinalmente, de forma a expor a luz intestinal, e duas amostras com 3 mm de lado foram obtidas para inclusão em resina metacrilato e análise em microscopia de luz, para inclusão em resina Spurr (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e análise em microscopia eletrônica de transmissão. Uma terceira amostra, consistindo da seção transversal completa foi colhida e incluída em parafina para a técnica de Imunohistoquímica.

3.3 Processamento histológico para análise em microscopia de luz

Réplicas das amostras foram fixadas em formalina diluída a 10% em salina tamponada com fosfatos (PBS) 1 M por 24 horas a 4 °C, pós-fixadas por 2 horas em tetróxido de ósmio (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA), diluído a 2% em tampão cacodilato (Electron Microscopy Sciences) e desidratadas com álcool etílico em concentrações crescentes e com a utilização de dois banhos de álcool etílico absoluto por 2 horas e um banho de 12 horas.

Após desidratação, as amostras foram infiltradas por resina metacrilato (Leica Microsystems, Wetzlar, Hesse, Alemanha), inicialmente, com solução de resina metacrilato diluída em álcool etílico absoluto (1:1) por 2 horas e posteriormente com resina metacrilato pura por 12 horas a 4 °C. As amostras foram incluídas em resina metacrilato pura, seguindo o protocolo do fornecedor. As amostras foram seccionadas com 2 µm de espessura em micrótomo rotativo utilizando navalhas de vidro.

O processo absorptivo de lipídeos foi evidenciado pelo pós-fixador tetróxido de ósmio, que cora as gotículas lipídicas em negro (Hernandez-Blazquez et al., 1989) e as demais estruturas histológicas foram evidenciadas pela coloração com Safranina, diluída em água destilada a 1%. As lâminas foram analisadas em microscópio Zeiss Standard 25 ICS com objetivas Zeiss NeoFluar e fotografadas com auxílio de câmera Zeiss AxioCam MRc.

3.4 Estimativa da ocupação do epitélio de revestimento da mucosa intestinal pelas gotículas lipídicas

As vilosidades intestinais que tiveram a quantidade de inclusões lipídicas mensurada foram escolhidas arbitrariamente, por apresentarem a maior concentração de gotículas lipídicas dentre todas as lâminas observadas, de todos os segmentos intestinais analisados. Apresentamos, portanto, apenas o maior valor obtido.

A estimativa do conteúdo lipídico presente no epitélio de revestimento da mucosa intestinal foi realizada com auxílio do software livre ImageJ 1.43m (NIH, Bethesda, EUA). Inicialmente a área correspondente ao epitélio de revestimento da mucosa intestinal foi estimada a partir de fotomicrografias digitais (figura 5A,B). As fotomicrografias foram transformadas em imagem do tipo *8-bit* (“escala de cinzas”) e

os pixels com valores mais próximos do preto (valores próximos do zero), que correspondem às gotículas lipídicas, foram selecionados a partir do histograma de distribuição de pixels, sendo que o valor limiar (“threshold”) foi calibrado manualmente para cada imagem, procedimento que evita a seleção de demais estruturas teciduais, representadas pelos pixels de cor cinza (valores mais próximos de 255) (figura 5C). As imagens foram binarizadas (transformadas em imagens preto e branco) e a área ocupada pelas gotículas lipídicas, agora representadas pelos pixels brancos, pôde ser mensurada automaticamente (figura 5D).

Figura 5 – Processamento de imagem para a estimativa da ocupação do epitélio de revestimento da mucosa intestinal por lipídeos.

(A) Fotomicrografia de luz do epitélio de revestimento ocupado por partículas negras, indicativo da presença de lipídeos. (B) Isolamento do epitélio de revestimento da lâmina própria para estimativa da área total do epitélio. (C) Processo de escolha dos pixels pretos, que correspondem às gotículas lipídicas, feita em imagem 8-bit (as áreas em vermelho representam a seleção das gotículas lipídicas). Note que os núcleos celulares e heterocromatina não foram selecionados. (D) Binarização da fotomicrografia. Após binarização, as gotículas lipídicas passam a ser representadas pelos pixels brancos, que podem ser medidos automaticamente para a estimativa da sua área total, correspondendo à área ocupada pelas gotículas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Os dados foram apresentados como sendo a proporção da área ocupada pelas gotículas lipídicas em relação à área total do epitélio de revestimento, incluindo áreas que não são efetivamente ocupadas por lipídeos, como as áreas ocupadas pelos núcleos dos enterócitos e demais tipos celulares presentes no

epitélio de revestimento, como células caliciformes, linfócitos intraepiteliais e células enteroendócrinas.

3.5 Análise qualitativa da Infiltração granulocítica na mucosa intestinal após absorção de óleo de soja

A infiltração granulocítica na mucosa intestinal potencialmente causada pelo processo absorptivo de lipídeos foi verificada de maneira qualitativa (Johnson et al., 1993; Mowat, Bain, 2011; Park et al., 2006; Reite, 1996). Para a identificação dos granulócitos, utilizou-se a coloração Rosenfeld (Rosenfeld, 1947) aplicada em cortes de tecidos incluídos resina metacrilato. Tendo em vista que a absorção lipídica ocorreu de maneira desigual mesmo em vilosidades intestinais contíguas e uma vez que a presença das gotículas lipídicas na mucosa intestinal é importante para realizarmos a associação entre a presença de infiltração granulocítica e a absorção lipídica, optamos por realizar a coloração Rosenfeld em tecidos previamente fixados com tetróxido de ósmio a 2%, para a manutenção das gotículas lipídicas no preparado histológico. Deste modo, fez-se necessário descrever, previamente, a morfologia dos granulócitos presentes na mucosa intestinal de *Caiman yacare* após uso do fixador tetróxido de ósmio para a correta identificação destes tipos celulares.

3.6 Imunohistoquímica

Para a técnica de imunohistoquímica, réplicas dos segmentos intestinais foram fixadas em Methacarn (60% de álcool metílico absoluto, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético glacial), incluídas em Paraplast (Leica Microsystems), seccionadas com 5 µm de espessura utilizando micrótomo rotativo com navalhas de aço e preparadas em lâminas para microscopia previamente silanizadas. Após desparafinização, os cortes histológicos passaram por processo de recuperação antigênica, incubando-os em tampão citrato 0,1 M pH 6,0 por 15 minutos em panela de pressão elétrica (Electrolux Cuisinart CPC-600). Peroxidases endógenas foram bloqueadas com peróxido de hidrogênio diluído em metanol a 3%, por 30 minutos a 37 °C. Os anticorpos primários foram diluídos em salina tamponada com fosfatos 1 M, contendo albumina bovina a 1% (Sigma-Aldrich) e azida sódica a 0,1% (Sigma-

Aldrich). Os cortes foram incubados com anticorpo primário por 30 minutos a 37°C e posteriormente por 18 horas a 4 °C em câmara úmida. Para a localização dos enterócitos proliferativos, utilizou-se o anticorpo IgG policlonal de coelho contra Antígeno Nuclear de Células Proliferativas (PCNA) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) com concentração final de 1 µg/ml. A revelação e visualização da imunohistoquímica foi realizada com o kit de detecção de polímeros SuperPicture, com precipitação do cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA). Após imunohistoquímica, os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris por um minuto, lavados em água amoniacal 0,5%, desidratados em série crescente de etanol, diafanizados em xilol e as lâminas foram montadas em lamínula com bálsamo do Canadá.

3.7 Descrição ultraestrutural da mucosa intestinal em microscopia eletrônica de transmissão

Para a análise ultraestrutural do processo absorptivo de lipídeos, as réplicas dos segmentos intestinais foram fixadas em McDowell (formalina diluída a 10% e glutaraldeído a 1%, em solução salina tamponada por fosfatos 0,1 M e pH 7,2) por 24 horas a 4 °C e transportadas no fixador para o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio diluído a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e incluídas em resina Spurr (Sigma-Aldrich). Seções ultrafinas de 70 nm foram coletadas em tela de cobre 100 mesh (Ted Pella Inc, Redding, CA, EUA), contrastadas com acetato de uranila 2% (Electron Microscope Sciences) e citrato de chumbo 0,5% (Electron Microscope Sciences). As análises foram feitas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-100CXII do ICB-USP.

3.8 Quantificação das lesões na mucosa intestinal

Uma vez que as lesões observadas na mucosa intestinal ficaram restritas ao ápice do epitélio de revestimento das vilosidades intestinais, o sistema de classificação de lesões da mucosa intestinal descrito por Gholamiandehkordi et al. (2007) foi modificado *a posteriori*, de modo a estabelecer apenas uma categoria de lesão, descrita como parte dos resultados.

A análise de lesão da mucosa foi feita com auxílio de microscopia de luz, em aumento de 400 vezes, tanto em material incluído em historesina quanto em parafina para diminuir a probabilidade da ocorrência de artefatos de técnica. Foram analisadas duas amostras de cada segmento intestinal (duodeno, jejuno-íleo cranial e jejuno-íleo cauda) de dois animais tratados com óleo de soja pelos períodos de 24, 48 e 72 horas e duas amostras de cada segmento intestinal do animal controle. Os resultados foram apresentados como sendo as proporções médias e os respectivos desvios-padrão de vilosidades intestinais danificadas em relação ao total de vilosidades presentes em cada segmento intestinal. As médias das proporções foram comparadas pelo teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido do teste *post hoc* de comparações aos pares de Dunn, para testar a significância das diferenças observadas entre: (1) os mesmos segmentos intestinais submetidos a tratamentos diferentes, sugerindo efeitos do óleo de soja, ou (2) entre os diferentes segmentos intestinais submetidos ao mesmo tratamento, o que sugeriria susceptibilidades diferentes dos segmentos intestinais ao óleo de soja. O nível de significância estatística estabelecida foi de 5% ($p < 0,05$) e foi calculado pelo programa GraphPad Prism para Windows v.5.01, 2007.

3.9 Estimativa da proliferação celular no epitélio de revestimento

A contagem de enterócitos cujos núcleos apresentaram imunomarcacão positiva para PCNA foi feita com auxílio de microscópio de luz e aumento de 400 vezes. Uma vez que a imunomarcacão para PCNA apresenta gradiente de marcação e que a coloração azulada dos núcleos de enterócitos PCNA negativos é mais óbvia, consideramos como sendo enterócitos PCNA positivos também as células que apresentaram os tons castanhos mais claros. A estimativa de proliferação celular presente no epitélio de revestimento foi apresentada como sendo a proporção média e o desvio-padrão de enterócitos PCNA positivos em relação à quantidade total de enterócitos. A contagem foi feita em cinco vilosidades intestinais de cada segmento intestinal (duodeno, jejuno-íleo caudal e intestino grosso) de dois animais tratados com óleo de soja por 24 horas e cinco vilosidades dos respectivos segmentos intestinais do animal controle. Após aplicação do teste de Bertlett para verificação da homogeneidade das variações entre amostras e do teste Kolgomorov-

Smirnov para análise da normalidade de distribuição, optou-se por comparar as médias das proporções pelo teste estatístico *one-way* ANOVA, seguido do teste *post hoc* de comparações aos pares de Bonferroni, para testar a significância das diferenças observadas entre o controle e o tratamento com óleo de soja nos respectivos segmentos intestinais. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$) e foi calculado pelo programa GraphPad Prism para Windows v.5.01, 2007.

4 RESULTADOS

4.1 Descrição histológica do processo de absorção de óleo de soja pelos diferentes segmentos intestinais

No momento do abate, não foram verificadas gotas de óleo na lâmina d'água presente nos tanques, indicando que o óleo de soja não fora regurgitado pelos animais. Gotas de óleo foram observadas no conteúdo estomacal de animais sacrificados 24 horas após injeção intragástrica de óleo de soja, mas ausentes nos estômagos de animais sacrificados 48 e 72 horas após injeção, indicando passagem completa para o duodeno em 48 horas. Gotas de óleo estavam ausentes no estômago do animal controle.

Cortes histológicos dos segmentos intestinais dos animais que permaneceram com óleo de soja no sistema gastrointestinal por 24 horas evidenciaram grande quantidade de partículas osmiofílicas, coradas em negro, indicando a presença de lipídeos. As partículas osmiofílicas estavam presentes em toda a extensão do intestino delgado, desde o duodeno até o segmento mais caudal do jejuno-íleo. No duodeno destes animais, assim como ao longo de todo o jejuno-íleo, as partículas osmiofílicas estavam presentes abundantemente no epitélio de revestimento, tornando menos visível a presença de partículas osmiofílicas na lâmina própria (figura 6A,B). Não observamos diferenças na presença de partículas osmiofílicas entre duodeno ascendente e duodeno descendente.

No duodeno de animais sacrificados após 72 horas da injeção intragástrica, houve pouca quantidade de partículas lipídicas no epitélio de revestimento do duodeno, mas grande quantidade na lâmina própria, enquanto que ao longo de todo o jejuno-íleo, as partículas osmiofílicas estavam presentes em grande quantidade no epitélio de revestimento e menos evidentes na lâmina própria (figura 6C,D). Os animais tratados com óleo de soja por 48 horas apresentaram o mesmo padrão de absorção descrito para os animais mantidos por 72 horas.

No intestino grosso também foram observadas partículas osmiofílicas no epitélio de revestimento, embora em menor quantidade do que o observado no intestino delgado e não detectamos a presença de partículas osmiofílicas na lâmina própria deste segmento intestinal (figura 7A,B).

No animal controle, não observamos a presença de partículas osmiofílicas em nenhum segmento intestinal e em nenhum estrato histológico, indicando que os animais controle possuíam pouco ou nenhum lipídeo chegando ao intestino pela luz intestinal ou pelo sistema circulatório e que o pós-fixador tetróxido de ósmio não foi suficiente para evidenciar os lipídeos de membrana quando analisados em microscopia de luz (figuras 6E,F e 7C,D). Deste modo, podemos concluir que as partículas osmiofílicas observadas na mucosa intestinal são gotículas lipídicas provenientes da injeção intragástrica de óleo de soja.

Figura 6 – Absorção de óleo de soja pelos segmentos intestinais de *Caiman yacare*.

Cortes histológicos de intestino delgado incluído em resina metacrilato. Coloração por tetróxido de ósmio e safranina. (A) Duodeno e (B) jejuno-íleo caudal de animal mantido por 24 horas com óleo de soja. Observe a presença abundante de partículas osmiofílicas no epitélio de revestimento e a menor presença na lâmina própria dos dois segmentos intestinais. (C) Duodeno (D) e jejuno-íleo caudal de animal mantido com óleo de soja por 72 horas. No duodeno, as partículas osmiofílicas estavam presentes apenas na lâmina própria, enquanto que no jejuno-íleo, o epitélio de revestimento ainda apresentava grande quantidade de partículas osmiofílicas. No animal controle, duodeno (E) e jejuno-íleo caudal (F) não apresentaram partículas osmiofílicas. Barra: 100 μm.

Figura 7 – Absorção de óleo de soja pelo intestino grosso de *Caiman yacare*.

Cortes histológicos de intestino grosso incluído em resina metacrilato. Coloração por tetróxido de ósmio e safranina. Partículas osmiofílicas foram detectadas no epitélio de revestimento de apenas algumas vilosidades do intestino grosso dos animais incubados por 24 horas (A e B). Não foram observadas partículas osmiofílicas na lâmina própria deste segmento intestinal. No intestino grosso do animal controle (C e D), não foram encontradas partículas osmiofílicas. Barra: 100 μ m.

4.2 Caracterização dos domínios funcionais das vilosidades intestinais de Caiman yacare

A absorção de óleo de soja ocorreu tanto pelo ápice das vilosidades intestinais, onde as partículas osmiofílicas ocuparam o máximo de 34% da área total do epitélio de revestimento, quanto ao longo das laterais das vilosidades até próximo à sua base, com o preenchimento de até 47% da área epitelial pelos lipídeos (figura 8A,B). Apenas os enterócitos presentes na base das vilosidades intestinais não estavam ocupados por partículas osmiofílicas (figura 9B). No animal controle, o ápice, a lateral e a base das vilosidades intestinais estavam desprovidas de partículas osmiofílicas (figura 8C,D,E).

Para identificar a disposição das células multipotentes intestinais e sua posição em relação aos enterócitos absorptivos, realizamos imunohistoquímica para o antígeno PCNA. Os enterócitos PCNA positivos estavam dispostos na base das vilosidades intestinais, entremeados a poucos enterócitos PCNA negativos (figura 9A,D). Os enterócitos PCNA positivos recobriam a parte mais profunda da base da vilosidade e distribuíam-se lateralmente a elas, por alguns micrômetros de distância a partir do fundo da base (figura 9A,D). A frequência de enterócitos imunomarcados e/ou a intensidade de imunomarcção diminuiu no epitélio de revestimento ao longo do eixo base-ápice da vilosidade, enquanto que a quantidade de células positivas para PCNA presentes na lâmina própria permaneceu constante ao longo do mesmo eixo (figura 9A).

Próximo à base, identificamos enterócitos PCNA positivos e que também absorvem lipídeos, conforme sugerido pela presença de vacúolos citoplasmáticos, que acreditamos serem as inclusões lipídicas extraídas pelo etanol durante o processamento histológico (figura 9D). Esta região apresentou partículas osmiofílicas nos preparados em Histoiresina e fixados com tetróxido de ósmio (figura 9C). Estes dados sugerem a divisão das vilosidades intestinais em três domínios funcionais distintos: a base das vilosidades onde são encontradas células PCNA positivas e desprovidas de inclusões lipídicas, um domínio próximo à base, com células PCNA positivas e com capacidade de absorção lipídica e o domínio lateral restante, até o ápice da vilosidade, com enterócitos absorptivos e PCNA negativos.

Figura 8 – Definição dos domínios funcionais das vilosidades intestinais: ápice e laterais – domínios absortivos.

Cortes histológicos de intestino delgado incluído em resina metacrilato. Coloração por tetróxido de ósmio e safranina. Os enterócitos das vilosidades intestinais apresentaram grande capacidade para absorção do óleo de soja. O epitélio de revestimento do ápice da vilosidade teve até 34% da sua área ocupada por partículas osmiofílicas (A), enquanto que nas laterais, a área ocupada pelo lipídeo foi de 47% (B). No animal controle, não foram observadas a presença de partículas osmiofílicas nos ápices (C), nas laterais (D) ou na base (E) das vilosidades intestinais. Barra: A-E: 100 μ m.

Figura 9 – Definição de domínios funcionais das vilosidades intestinais: base das vilosidades – domínio proliferativo.

Corte histológico de intestino delgado incluído em parafina e imunohistoquímica para PCNA (A,D). Cortes histológicos de intestino delgado incluído em resina metacrilato e coloração por tetróxido de ósmio e safranina (B,C). (A) No epitélio de revestimento que recobre a base da vilosidade, detectamos a presença de inúmeros enterócitos PCNA positivos, enquanto que no ápice, os enterócitos PCNA positivos eram escassos. Na lâmina própria, não houve diminuição no número de células PCNA positivas ao longo do eixo base-ápice da vilosidade. (B) Corte histológico de jejuno-íleo demonstrando que o epitélio de revestimento presente na base das vilosidades intestinais não absorvem lipídeos (setas). A base da maior parte das vilosidades estava desprovida de partículas osmiofílicas. (C) Detalhe da base da vilosidade intestinal desprovida de partículas osmiofílicas. Note, porém, que a poucos micrômetros da base, os enterócitos apresentaram partículas osmiofílicas. Linha pontilhada indica a muscular da mucosa. (D) Na base da vilosidade, a grande maioria dos enterócitos apresentaram imunomarcção positiva para PCNA e poucos micrômetros acima, uma região de colocalização entre enterócitos PCNA positivos e enterócitos absorptivos, sugerido pela intensa vacuolização presente no epitélio (parêntesis vermelho). Em direção ao ápice, onde a absorção lipídica é máxima, os enterócitos PCNA positivos se tornam escassos. Barra: A: 50 μ m; B,C,D: 100 μ m.

4.3 Descrição ultraestrutural das inclusões lipídicas na mucosa intestinal

O lipídeo absorvido pelos enterócitos de *Caiman yacare* foi observado no citoplasma supranuclear, formando gotículas lipídicas. Neste compartimento, havia grande acúmulo de mitocôndrias que pareciam estar em contato com as gotículas lipídicas (figura 10A,B). O tamanho e a quantidade das gotículas lipídicas presentes no citoplasma dos enterócitos variaram bastante. Em alguns casos, as gotículas apresentaram-se numerosas e com diâmetros pequenos, sendo a menor observada com 44,00 nm (figura 10B), enquanto que em outros casos eram pouco numerosas e com diâmetros maiores, sendo a maior observada com 3990 nm de diâmetro (figura 10C). Neste caso, as gotículas preenchiam quase completamente o citoplasma dos enterócitos. As gotículas lipídicas supranucleares não estavam envoltas por membranas, exceto em alguns pontos, em que material mais eletrondenso pôde ser observado (figura 10D,E). Como controle da boa preservação das estruturas membranosas, demonstramos a presença das membranas citoplasmáticas e das cristas mitocondriais (figura 10D,E). As gotículas lipídicas se apresentaram com eletrondensidade média e com o aspecto homogêneo por toda a sua área (figura 10C,D), em contraste com as lipoproteínas de secreção, que se apresentou eletronlúcida (figura 11A,B). A geometria predominante das gotículas lipídicas observadas era próxima à circular, ocorrendo, em alguns casos, geometrias que sugeriam o processo de fusão entre gotículas (figura 10C). Não encontramos gotículas lipídicas na região da trama apical de actina e infreqüentemente nas porções basolaterais próximas ao núcleo (figura 10A,B). Neste caso, as gotículas lipídicas foram observadas dentro de estruturas membranosas, provavelmente Retículo Endoplasmático (figura 10F).

Nos domínios basolaterais dos enterócitos e nos espaços intercelulares, assim como na lâmina própria das vilosidades, observamos os lipídeos absorvidos na forma de lipoproteínas. As lipoproteínas consistiam de uma porção interna eletronlúcida circundadas por fina camada de eletrondensidade intermediária (figura 11A-D). As lipoproteínas apresentaram geometria irregular, com o aspecto sugestivo de fusão entre diversas partículas lipoproteicas e conferindo ao espaço intercelular o aspecto rugoso (figura 11C,E). O tamanho das lipoproteínas variou de 45 nm a 439 nm de diâmetro.

Microscopia eletrônica de transmissão de duodeno do jacaré do pantanal após injeção de óleo de soja. As gotículas lipídicas presentes nos enterócitos eram pequenas e abundantes (A e maior aumento em B) ou menos numerosas, porém com grandes proporções (C). As gotículas lipídicas eram circulares, mas frequentemente apresentaram a morfologia complexa, sugestivo de fusão entre gotículas (C). As gotículas lipídicas apresentaram eletrondensidade intermediária e aspecto homogêneo por toda sua extensão, encontravam-se no citoplasma supranuclear (A-C), próximo a mitocôndrias (A,B), mas nunca na região da trama terminal de actina (B). Observe em (B) a integridade dos elementos juncionais entre dois enterócitos. Em (D e E), observe que as gotículas lipídicas supranucleares não apresentavam membranas, exceto em alguns pontos (setas), apesar de as membranas citoplasmáticas e as cristas mitocondriais estarem bem preservadas. (F) Na porção basal dos enterócitos, infreqüentemente foram observados lipídeos com aspecto homogêneo, provavelmente gotícula lipídica, envolto por hemicamada de membrana. Barra: A: 300 nm; B,D,E: 150 nm; C: 300 nm; F: 600nm.

Figura 10 – Descrição ultraestrutural das gotículas lipídicas presentes nos enterócitos.

Figura 11 – Descrição ultraestrutural das lipoproteínas de secreção.

Microscopia eletrônica de transmissão de duodeno do jacaré do pantanal após injeção de óleo de soja. Os lipídeos supranucleares (gotículas lipídicas) apresentaram aspecto homogêneo (A e B, seta), enquanto que os localizados na porção basal possuíam aspecto rugoso (A e B, cabeça de seta). Em (B), maior detalhamento das duas populações lipídicas presentes no enterócito. (C) Maior detalhamento das lipoproteínas de secreção com aspecto irregular e alguns pontos sugestivos de fusão entre partículas (seta). (D) Detalhe de uma partícula de lipoproteína, identificado pela presença de revestimento mais eletrondenso (seta) e presente entre membranas, sugerindo provavelmente sendo secretada. (E) Lipídeos na forma de lipoproteínas presentes na lâmina própria, circundando um mastócito, conferindo ao tecido o aspecto rugoso. Barra: A,E: 600 nm; B,D: 250 nm; C: 150 nm.

4.4 Contribuição das vias linfática e sanguínea no transporte de lipídeos absorvidos pelo intestino

Os quilíferos centrais, que percorrem longitudinalmente as vilosidades intestinais, apresentaram aspecto dilatado nos animais injetados com óleo de soja e estavam preenchidos por partículas osmiofílicas. Nos quilíferos em que as partículas osmiofílicas não foram observadas, estes se apresentaram sem coloração por safranina em seu interior, sugerindo drenagem da linfa. Na lâmina própria, próximo à muscular da mucosa, partículas osmiofílicas estavam presentes nos seios linfáticos, que recebem a linfa a partir dos quilíferos centrais. Na *tunica muscularis*, os vasos linfáticos que drenam os seios linfáticos e ligam-se aos linfáticos coletores mesentéricos, também apresentaram partículas osmiofílicas (figura 12A,B,C). Os quilíferos centrais do animal controle raramente estavam dilatados e em alguns seios linfáticos, observamos a linfa corada pela safranina, sugerindo pouca drenagem linfática, contrastando com os animais que receberam óleo de soja (figura 12D,E).

Os capilares sanguíneos que percorrem as vilosidades intestinais, os capilares presentes na lâmina própria próximos à muscular da mucosa e as arteríolas da mucosa também apresentaram partículas osmiofílicas, embora a presença em vasos sanguíneos tenha sido menos frequente do que nos vasos linfáticos (figura 13A,B,C). Em alguns casos, as partículas osmiofílicas observadas nos capilares sanguíneos apresentaram tamanho estimado na ordem de micrômetros, igualando-se ao tamanho dos eritrócitos presentes nos vasos (figura 13A,B). Não observamos partículas osmiofílicas nos capilares sanguíneos do animal controle (figura 13D).

No intestino grosso, apesar de detectarmos a presença de partículas osmiofílicas no epitélio de revestimento, não as observamos na lâmina própria e, tampouco, conseguimos identificar a presença de vasos linfáticos dilatados na mucosa intestinal (figura 7C,D).

Figura 12 (continua) – Vias de transporte dos lipídeos após absorção intestinal.

Cortes histológicos de intestino delgado incluído em resina metacrilato. Coloração por tetróxido de ósmio e safranina. (A) Os quilíferos centrais, percorrendo longitudinalmente as vilosidades intestinais, estavam dilatados e frequentemente preenchidos por inúmeras partículas osmiofílicas. (B) Os seios linfáticos (seta), presentes na lâmina própria, próximos à muscular da mucosa, também apresentaram partículas osmiofílicas. (C) Caminho percorrido pelos vasos linfáticos através da *tunica muscularis*. Note os vasos ligados ao seio linfático da mucosa (seta) e a presença de partículas osmiofílicas ao longo do trajeto. Barra: 100 µm.

Figura 12 (continuação) – Vias de transporte dos lipídeos após absorção intestinal.

Cortes histológicos de intestino delgado incluído em resina metacrilato. Coloração por tetróxido de ósmio e safranina. (D) Lateral da vilosidade intestinal de animal controle, demonstrando que os quilíferos centrais não se apresentaram dilatados e sem a presença de partículas osmiofílicas. (E) Na mucosa próxima à muscular da mucosa, um seio linfático com coloração para safranina e sem presença de partículas osmiofílicas (seta). Barra: 100 μ m.

Figura 13 – Contribuição do sistema circulatório para a absorção lipídica.

Cortes histológicos de intestino delgado incluído em resina metacrilato. Coloração por tetróxido de ósmio e safranina (A,B) e Rosenfeld (C). (A) Vaso sanguíneo percorrendo longitudinalmente a vilosidade intestinal, assim identificado pela presença dos eritrócitos, contendo partículas osmiofílicas. Os capilares sanguíneos (B) e as arteríolas (C), ambos presentes na mucosa próximos à muscular da mucosa, também apresentaram partículas osmiofílicas, embora menos frequentemente do que o observado nos vasos linfáticos. Barra: A,B: 100 μ m; C: 10 μ m.

4.5 Caracterização da organização epitelial após absorção de óleo de soja

No ápice das vilosidades intestinais do animal controle, os enterócitos estavam dispostos de modo a formar epitélio de revestimento do tipo simples. Nos animais tratados com óleo de soja, o epitélio permaneceu com a organização epitelial do tipo simples, porém os enterócitos estavam mais espaçados do que no animal controle (figura 14A,D). As laterais e a base do duodeno (dado não mostrado), do jejuno-íleo caudal e do intestino grosso (dado não mostrado), tanto do animal controle quanto dos tratados com óleo de soja por 24 horas, apresentaram os enterócitos dispostos de modo a formar epitélio do tipo pseudoestratificado, mesmo após os enterócitos dos animais tratados, absorverem grandes quantidades de lipídeos, conforme evidenciado pela presença de vacúolos (figura 14B,C,E,F).

Figura 14 – Adição de óleo de soja não é suficiente para alterar a organização pseudoestratificada dos enterócitos no epitélio de revestimento.

Corte histológico de jejuno-íleo incluído em parafina. Coloração por Hematoxilina. Enterócitos presentes no ápice das vilosidades estavam organizados em epitélio do tipo simples, tanto nos animais tratados com óleo de soja (A) quanto no animal controle (D), embora no animal tratado, os enterócitos estivessem mais afastados entre si do que no animal controle. Mesmo estando carregado com lipídeos, as laterais (B) e a base (C) das vilosidades apresentaram enterócitos organizados em epitélio do tipo pseudoestratificado, a mesma organização do animal controle (E: lateral; F: base), sem o carregamento de lipídeos. Barra: 25 μ m.

4.6 Alterações morfológicas das vilosidades intestinais durante a absorção lipídica

Observado sob estereomicroscópio, o relevo interno dos segmentos intestinais estavam íntegros. As vilosidades intestinais não apresentaram alterações na sua organização morfológica, não havia sinais visíveis de lesões necróticas ou qualquer ruptura no aspecto ziguezagueado das vilosidades em nenhum dos segmentos intestinais após absorção de óleo de soja.

Sob microscopia óptica, no entanto, observamos que houve alterações na organização histológica de algumas vilosidades, consistindo na erosão do epitélio de revestimento da vilosidade e exposição da lâmina própria para a luz intestinal (figura 15A). As rupturas estavam restritas ao ápice das vilosidades intestinais, nunca ocorrendo nas laterais ou em sua base. Próximo às lesões observamos a presença de *debris* celulares e material fibroso contendo partículas osmiofílicas na luz intestinal, provavelmente proveniente do excesso da descamação epitelial, levando o epitélio à ruptura (figura 15A,B).

As maiores proporções de vilosidades intestinais danificadas foram encontradas nos duodenos. No animal controle $17,50 \pm 24,75\%$ das vilosidades intestinais estavam erodidas e no duodeno dos animais tratados com óleo de soja por 24 e 48 horas os valores eram próximos aos observados no controle, com $27,39 \pm 23,08\%$ e $34,95 \pm 27,52\%$, respectivamente. As diferenças observadas no duodeno entre os diferentes tratamentos com óleo de soja não foram consideradas estatisticamente significativas (figura 16; tabelas A1 e A2 do Apêndice). Esses dados não parecem ser artefatos de técnica, uma vez que amostras processadas em historesina, em parafina, e a repetição do experimento por pesquisador independente geraram resultados similares (dados não mostrados). O jejuno-íleo caudal de animais tratados com óleo de soja por 72 horas apresentou números elevados de lesões, ocorrendo em $13,36 \pm 24,48\%$ das vilosidades, enquanto que não foram observadas lesões no segmento correspondente do animal controle e pouco recorrente nos outros tratamentos (figura 16). Novamente, esta diferença não foi considerada estatisticamente significativa (tabelas A1 e A2). Quando os diferentes segmentos intestinais submetidos ao mesmo tratamento são considerados, as diferenças observadas na frequência das lesões também não são consideradas estatisticamente significativas (figura 16; tabelas A1 e A2), não

corroborando a hipótese de susceptibilidade diferentes a lesão dos segmentos intestinais submetidos ao tratamento com óleo de soja.

Figura 15 – Descrição das alterações morfológicas nas vilosidades intestinais após absorção de óleo de soja.

Cortes histológicos de intestino delgado incluído em resina metacrilato. Coloração por tetróxido de ósmio e safranina. (A) Vilosidades do duodeno de animal tratado com óleo de soja por 24 horas. O epitélio de revestimento perdeu a integridade tecidual e expôs a lâmina própria para a luz intestinal. Na luz intestinal, observamos a presença de material fibroso e amorfo, contendo partículas osmiofílicas. (B) Detalhe do ápice de uma vilosidade intestinal com o epitélio de revestimento alterado, com células contendo partículas osmiofílicas desprendendo-se do epitélio e expondo a lâmina própria. Barra: 200 μ m.

Figura 16 – Quantificação das lesões intestinais após absorção aguda de óleo de soja.

Médias e respectivos desvios-padrão das proporções de vilosidades intestinais danificadas nos diferentes segmentos intestinais após tratamento agudo com óleo de soja. Os maiores índices de lesões foram observados nos duodenos do animal controle e após tratamento com óleo de soja por 24 e 48 horas, mas não foram considerados significativamente diferentes quando estes foram comparados entre si. A proporção de vilosidades danificadas constatada no jejuno-íleo caudal dos animais tratados por 72 horas também não foi considerada estatisticamente diferente quando comparado com o mesmo segmento intestinal de animais submetidos aos outros tratamentos. As diferenças observadas entre os diferentes segmentos intestinais submetidos ao mesmo tratamento também não foram consideradas estatisticamente significativas. Para os valores das médias, desvios-padrão e teste de significância estatística, reporte-se para as tabelas A1 e A2 (Apêndice).

Em microscopia eletrônica de transmissão, as lesões epiteliais não foram detectadas. Em enterócitos nos quais observamos pouca absorção lipídica, foi possível observar a integridade dos complexos juncionais nos ápices celulares (figura 10C). Em outros enterócitos, no entanto, as gotículas lipídicas ocuparam grande parte do citoplasma, impossibilitando a observação de organelas, a exceção do núcleo (figura 10B). Mesmo neste caso, não houve sinais de descontinuidade no epitélio de revestimento da mucosa intestinal, não sendo possível correlacionar a grande quantidade de gotículas lipídicas nos enterócitos e a lesão epitelial, sugerindo que a absorção de óleo de soja de maneira aguda e nas quantidades oferecidas neste trabalho não seja deletéria para a integridade da mucosa intestinal.

4.7 Caracterização do índice de proliferação dos enterócitos após absorção de óleo de soja

Uma vez que as lesões observadas no epitélio de revestimento após absorção de óleo de soja não foram consideradas significativas, verificamos se a proliferação dos enterócitos estaria aumentada nos animais tratados com óleo de soja, como forma de compensação para a manutenção da integridade epitelial. Para tanto, calculamos os índices de proliferação dos enterócitos nos diferentes segmentos intestinais dos animais tratados com óleo de soja por 24 horas.

O tratamento com óleo de soja não alterou, de maneira significativa, a proporção de enterócitos PCNA positivos (figuras 17 e 18; tabelas A3 e A4) no duodeno, no jejuno-íleo caudal ou no intestino grosso dos animais tratados com óleo de soja quando estes segmentos intestinais foram comparados com os respectivos segmentos do animal controle (figuras 17 e 18).

Figura 17 – Quantificação do índice de proliferação dos enterócitos após absorção aguda de óleo de soja.

Médias e respectivos desvios-padrão da proporção de enterócitos proliferativos em relação ao número total de enterócitos do epitélio de revestimento da mucosa intestinal. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre animais tratados com óleo de soja por 24 horas e o animal controle, quando os respectivos segmentos intestinais foram analisados. Para os valores das médias, dos desvios-padrão e dos testes *post hoc* de significância estatística, reporte-se para as tabelas A3 e A4 (Apêndice).

Corte histológico de intestino em parafina e imunohistoquímica para PCNA no (A) Duodeno, (B) jejuno-íleo caudal e (C) intestino grosso de animais tratados com óleo de soja por 24 horas e nos respectivos segmentos do animal controle (D, duodeno; E, jejuno-íleo caudal, F, intestino grosso). A proporção de enterócitos PCNA positivos em relação ao total de enterócitos em uma vilosidade, não foi alterada com a administração de óleo de soja. (G-I) Controle negativo da Imunohistoquímica, com omissão de anticorpo primário (G, duodeno; H, jejuno-íleo caudal; I, intestino grosso). Barra: 250 μ m.

Figura 18 (continua) – Administração de óleo de soja não alterou o domínio dos enterócitos proliferativos.

Figura 18 (continuação) - Administração de óleo de soja não alterou o domínio dos enterócitos proliferativos.

Imunohistoquímica para PCNA em cortes de intestino incluído em parafina, mostrado em maior aumento para evidenciar a base das vilosidades intestinais com a presença dos enterócitos proliferativos. (A) Duodeno, (B) jejuno-íleo caudal e (C) intestino grosso de animais tratados com óleo de soja por 24 horas; (D) duodeno, (E) jejuno-íleo caudal e (F) intestino grosso do animal controle, injetado com água mineral. Barra: 50 μ m.

4.8 Caracterização morfológica e ultraestrutural dos granulócitos presentes na mucosa intestinal de Caiman yacare após fixação com tetróxido de ósmio

A absorção de lipídeos pelos enterócitos causa aumento da permeabilidade epitelial da mucosa intestinal e alguns ácidos graxos provenientes da dieta possuem efeito quimioatrativo sobre as células do sistema imune inato. Por estes motivos, a injeção intragástrica de óleo de soja poderia ter causado infiltração granulocítica na mucosa intestinal em *Caiman yacare*.

Uma vez que a absorção lipídica ocorreu de maneira heterogênea em um mesmo segmento intestinal, e as vilosidades intestinais apresentaram variações na quantidade de lipídeos absorvidos, para que fosse feita a correlação entre a presença de lipídeos na mucosa e o recrutamento de granulócitos para a mucosa intestinal, se fez necessário caracterizar os diferentes tipos de granulócitos presentes na mucosa intestinal após fixação por tetróxido de ósmio, este sendo necessário para a preservação das gotículas lipídicas nos tecidos. Foram identificados três tipos de granulócitos na mucosa intestinal:

- Os **Mastócitos** eram preenchidos por grânulos de tamanhos variados, em geral grandes e com bordas bem definidas, com formatos circulares e coloração heterogênea, variando roxo escuro a róseo, ligeiramente metacromático. Microscopia eletrônica de transmissão evidenciou células com grânulos irregulares, imbricados entre si e com eletrondensidades variáveis em uma mesma célula. O núcleo apresentou-se centralizado e com pouca heterocromatina. Estavam distribuídos na lâmina própria, em sua maioria próximos à lâmina basal do epitélio de revestimento, caracteristicamente percorrendo o eixo longitudinal da vilosidade intestinal desde o ápice até a base. Foram os granulócitos mais abundantes na mucosa intestinal. Também estavam presentes ocasionalmente na mucosa próximo à muscular da mucosa (figura 19A,D,D').
- Os **Granulócitos Eosinofílicos** apresentaram citoplasma com aspecto esponjoso quando observados sob microscopia de luz, eram preenchidos por inúmeros grânulos eosinofílicos de pequeno tamanho, com bordas pouco definidas e de difícil observação. Sob microscopia eletrônica de transmissão, os grânulos apresentaram-se esféricos, com eletrondensidade variável e apresentando halos eletrnluscentes. O núcleo apresentou-se centralizado ou ligeiramente excêntrico. Estavam presentes na lâmina própria próxima a base dos vilos e também na mucosa próximo à

muscular da mucosa, de maneira bastante esparsas. Não foram encontrados na lâmina própria ao longo das vilosidades intestinais (figura 19B,E).

- Os **Heterófilos** ocorriam apenas ocasionalmente. Apresentaram grânulos bem definidos, translúcido-esverdeados, com formatos variando entre esférico e em bastonetes, sendo estes os grânulos mais frequentemente observados e tipicamente presentes neste tipo celular. O núcleo apresentou-se excêntrico e possuía heterocromatina. Foram observados em capilares sanguíneos e em menor proporção na lâmina própria (figura 19C). Ocorriam apenas ocasionalmente.

Figura 19 – Caracterização morfológica dos granulócitos da mucosa intestinal de *Caiman yacare*.

Cortes histológicos de intestino incluído em resina metacrilato e coloração Rosenfeld para evidenciar os granulócitos na mucosa intestinal (A-C). Fotomicrografias eletrônicas de transmissão de granulócitos da mucosa intestinal (D,D',E). (A) Mastócito observado sob microscopia de luz, apresentando grânulos grandes, ligeiramente metacromáticos e o núcleo centralizado. (B) Granulócito eosinofílico observado sob microscopia de luz, com grânulos pequenos, pouco definidos e citoplasma com aspecto esponjoso e o núcleo descentralizado. (C) Heterófilo observado sob microscopia de luz, com grânulos translúcido-esverdeados, em forma de bastonetes e com núcleo excêntrico. (D) Fotomicrografia eletrônica de mastócito, evidenciando os grânulos grandes, imbricados, de eletron densidade variável. (D') Posição do mastócito próximo à lâmina própria do epitélio de revestimento, representada pela linha pontilhada. (E) Fotomicrografia eletrônica de granulócito eosinofílico, apresentando os grânulos comparativamente pequenos, circundados por um halo eletronluciscente. Barra: A-C: 10 µm; D: 500nm; D' 250 nm; E: 600 nm.

4.9 Efeitos da absorção lipídica no recrutamento de granulócitos para a mucosa intestinal

Não foi observada nenhuma alteração grosseira na concentração de mastócitos, heterófilos ou granulócitos eosinofílicos na mucosa intestinal de animais tratados com óleo de soja em nenhum segmento intestinal e em nenhum período após tratamento com óleo de soja que sugerisse, respectivamente, mastocitose, granuloma heterofílico ou eosinofilia (figura 20A-E). Apenas em raros momentos foram observados mastócitos degranulados (figura 20F). Também não encontramos heterófilos tóxicos/degranulados.

As únicas duas alterações observadas foram um episódio de acúmulo de heterófilos, o qual ocorreu na lâmina própria de uma vilosidade do jejuno-íleo caudal de animal tratado por 24 horas com óleo de soja e que apresentava lesão no epitélio de revestimento, sendo que a heterofilia observada estava restrita à vilosidade lesionada, não ocorrendo nas vilosidades intestinais contíguas (figura 21A), e um evento isolado de eosinofilia, restrito a uma pequena área da mucosa, próximo à muscular da mucosa, do jejuno cranial de animal tratado com óleo de soja por 72 horas, também não sendo observado em outros pontos da mucosa do segmento em questão (figura 21B).

Figura 20 – A absorção de óleo de soja não aumentou o recrutamento de granulócitos para a mucosa intestinal.

Cortes histológicos de intestino incluído em resina metacrilato. Coloração por Rosenfeld. Estas fotomicrografias de luz são representativas do adensamento de (A) mastócitos, de (B) granulócitos eosinofílicos e de (C) heterófilos na mucosa intestinal após tratamento agudo com óleo de soja. Não houve recrutamento de granulócitos ao longo das 72 horas de exposição dos animais ao óleo de soja. Adensamento de (D) mastócitos e de (E) granulócitos eosinofílicos na mucosa intestinal do animal controle. (F) A degranulação de mastócitos (seta), foi evento infrequentemente observado, mesmo com a grande quantidade de lipídeos chegando a mucosa intestinal. Barra: 10 μ m.

Figura 21 – Heterofilia e eosinofilia são eventos facilmente detectáveis após fixação por tetróxido de ósmio e por coloração Rosenfeld.

Cortes histológicos de intestino incluídos em resina metacrilato e coloração por Rosenfeld. Estas fotomicrografias de luz são os registros do único evento de heterofilia (A) e do único evento de eosinofilia (B) observados após tratamento agudo com óleo de soja, não ocorrendo em nenhum outro segmento intestinal analisado ou em outros pontos da mucosa do segmento intestinal onde estes eventos foram observados. Barra: 10 µm.

5 DISCUSSÃO

5.1 Descrição histológica do processo de absorção de óleo de soja pelos diferentes segmentos intestinais

Jacaré do pantanal não regurgitou o óleo de soja administrado intragastricamente, constatado pela ausência de gotas de óleo na lâmina d'água que preenchia completamente os tanques onde os animais foram mantidos. Regurgitação foi descrita em crocodilianos como reflexo do aumento do volume estomacal, provocado pelo acúmulo de material não digerido, como a quitina do exoesqueleto de artrópodes, a queratina presente em penas, pelos e garras de presas e eventuais vegetais e gastrólitos ocasionalmente ingeridos juntamente com as presas (Andrews et al., 2000). Regurgitação também pode ocorrer como resposta à irritabilidade da mucosa gástrica ocasionada pela ingestão de material tóxico ou nocivo ao trato gastrointestinal, que excitam células enteroendócrinas e levam ao vômito (Andrews et al., 2000; Andrews, Horn, 2006; Mawe, Hoffman, 2013). Uma vez que óleo de soja não está presente na dieta normal de crocodilianos e porque apresenta elementos-traço cujos efeitos sobre os crocodilianos não são conhecidos, como fitoesteróis, alguns metais pesados como cobre e hidrocarbonetos, como benzo[a]pireno (Camargo et al., 2012), compostos que podem ser considerados tóxicos para a mucosa gastrointestinal (Yuen et al., 2007), a ausência de regurgitação após administração de óleo de soja é um aspecto importante a ser considerado para a elaboração da ração para esta espécie. A ausência de regurgitação, portanto, sugere a ausência de irritabilidade gástrica com o uso agudo de óleo de soja.

Com o prazo de 24 horas, partículas osmiofílicas foram observadas na mucosa do segmento mais caudal do intestino delgado (jejuno-íleo caudal), indicando que em 24 horas todo o segmento intestinal fora percorrido pelo óleo. Com 72 horas, ainda havia partículas osmiofílicas na lâmina própria do duodeno, mas não no epitélio de revestimento, indicando a finalização do processo de absorção no extremo cranial do intestino neste prazo. Em *Crocodylus porosus* alimentados com carne de porco contendo 48% de lipídeos, o tempo de trânsito do quimo pelo trato gastrointestinal foi de 24-34 horas, sendo significativamente menor

do que o observado em animais alimentados com carne contendo 8% de gorduras, cujo tempo de trânsito foi de 36-50 horas (Garnett, 1988). O óleo de soja injetado intragastricamente em *Caiman yacare* neste trabalho simulou a dieta pobre em lipídeos dos experimentos de Garnett (1988), no entanto, o tempo de trânsito do óleo de soja obtido em nossos experimentos, em torno de 24 horas, foi similar à dieta hiperlipídica daquele estudo. Obviamente, a forma como o lipídeo se apresenta para o trato gastrointestinal, se na forma sólida presente nos tecidos animais (Garnett, 1988) ou na forma líquida, como no caso do óleo de soja analisado neste trabalho, alteram o tempo de trânsito pelo sistema gastrointestinal, por causa das diferenças na digestibilidade e/ou da maior fluidez do óleo na forma líquida pelo sistema gastrointestinal. No entanto, como *Crocodylus porosus* submetido a alimentação sólida hiperlipídica apresentou menor tempo de trânsito do que a dieta sólida pobre em lipídeos, este dado sugere que a peristalse em crocodilianos pode ser aumentada pela interação direta do lipídeo com a mucosa gastrointestinal, diminuindo o tempo de trânsito do quimo. Uma vez que o tempo de passagem do alimento pelo sistema gastrointestinal está relacionado com a taxa de absorção de nutrientes e consequentemente com a taxa de conversão alimentar, não podemos descartar efeito semelhante em *Caiman yacare*, portanto, será necessário investigar se o tempo de trânsito das dietas acrescidas de óleo de soja nesta espécie será diminuído, o que poderá apresentar efeitos negativos na absorção de nutrientes e na taxa de conversão alimentar.

Interessantemente, observamos a presença de gotículas lipídicas no epitélio de revestimento da mucosa intestinal do intestino grosso, mas não na lâmina própria deste segmento intestinal. Sabe-se que absorção de lipídeos pode ocorrer também no estômago, tendo sido descrito em peixe (Denstadli et al., 2004; Greene, 1913), em mamíferos e também em répteis (Greene, 1913). Estes dados não surpreendem, dada a avidez com que lipídeos são absorvidos pelos enterócitos e porque a absorção lipídica pelos enterócitos não requerem transportadores de membrana, ocorrendo por simples difusão (Abumrad, Davidson, 2012).

Para que ácidos graxos sejam absorvidos, estes devem estar solubilizados na água de solvatação presente na borda em escova dos enterócitos, sendo que os sais biliares são responsáveis por esta solubilidade. Em mamíferos, a absorção dos

sais biliares ocorre no íleo, mas cerca de 10% da bile atinge o intestino grosso e são eliminadas nas fezes. A pequena absorção de óleo de soja que identificamos no intestino grosso pode representar resquício de sais biliares presentes no intestino grosso, o que teria permitido um pouco de absorção lipídica neste segmento. O intestino grosso de Caimanídeos apresenta todos os elementos anatômicos para absorção e transporte de lipídeos, como uma rede linfática na mucosa e vasos linfáticos coletores na serosa e no mesentério (Ottaviani, Tazzi, 1977). Apesar disso, não observamos a presença de quilíferos centrais dilatados nem a presença de partículas osmiofílicas na lâmina própria da mucosa intestinal, provavelmente por causa da pequena quantidade de lipídeo absorvido por este segmento intestinal. Em alguns animais tratados com óleo de soja, observamos pouco carregamento de lipídeos na mucosa intestinal ocorrendo já no jejuno-íleo caudal, sugerindo que a ausência de grandes quantidades de lipídeos absorvidos pelos segmentos distais do intestino seja por causa da alta eficiência dos segmentos craniais neste processo absorptivo, disponibilizando pouco lipídeo em micelas para o intestino grosso.

5.2 *Caracterização dos domínios funcionais das vilosidades intestinais de Caiman yacare*

A histoarquitetura das vilosidades intestinais varia consideravelmente entre os vertebrados, e uma vez que a forma tecidual e a sua função são correlacionadas, investigamos como as vilosidades intestinais de *Caiman yacare* são organizadas funcionalmente, especificamente para realizar as funções de absorção lipídica e de renovação do epitélio de revestimento. De acordo com os dados mostrados neste trabalho, propomos dividir as vilosidades intestinais em três domínios funcionais: (1) a base das vilosidades, com a presença das células multipotentes intestinais, PCNA positivas e que não absorvem lipídeos; (2) o epitélio absorptivo de lipídeos, que ocorre pelas laterais das vilosidades e chega até o ápice, onde os enterócitos são PCNA negativos; e (3) a região de transição entre a base e a lateral da vilosidade, onde encontramos enterócitos PCNA positivos e que também apresentaram inclusões lipídicas.

O intestino delgado de mamíferos apresenta as criptas intestinais, formadas pelo espessamento da lâmina própria que empurram o epitélio de revestimento de vilosidades intestinais adjacentes umas contra as outras, provocando o

estreitamento da luz intestinal. Em *Caiman yacare*, as criptas intestinais não estão presentes, apresentando-se, no lugar, um vale relativamente largo, formado pelo epitélio de revestimento de duas vilosidades adjacentes relativamente afastadas. O aspecto da base das vilosidades se assemelha à região onde ocorrem as aberturas das criptas intestinais de mamíferos (Aleixo et al., 2011a; Jin et al., 1990). Por não formar uma cripta intestinal típica, optamos por chamar esta região apenas de base da vilosidade, assim como o fazem Starck et al., (2007). Os domínios funcionais das vilosidades intestinais de mamíferos e de crocodilianos são iguais. Apesar das formas diferentes, as criptas intestinais de mamíferos e a base das vilosidades de crocodilianos apresentam semelhanças funcionais, pois em ambos há a presença das células multipotentes intestinais e são incapazes de absorver lipídeos em condições normais (Cardell et al., 1967; Kapadia, Essandoh, 1988).

A organização histológica das vilosidades intestinais de mamíferos em criptas pode ser explicada, pelo menos em parte, como uma barreira para restringir a passagem de ácidos graxos e sais biliares para o fundo das criptas, contribuindo para a proteção das células multipotentes intestinais acomodadas neste domínio da vilosidade intestinal. A sugestão de que a ausência de absorção lipídica pelos enterócitos presentes neste domínio seja em decorrência da organização histológica e não da incapacidade dos enterócitos multipotentes em absorver lipídeos, demonstrou-se que, em cultura *in vitro*, enterócitos provenientes das criptas intestinais são capazes de incorporar ácido oleico (18:1 n-9) (Levy et al., 2000) e também demonstrado em alguns peixes, como em *Centropomus parallelus* (Borges et al., 2010) e em *Salmo salar* L. (Denstadli et al., 2004), que não possuem criptas intestinais e normalmente são capazes de absorver lipídeos, em maior ou menor grau, também pela base das vilosidades.

Um dos motivos para não ocorrer absorção de lipídeos pelos enterócitos presentes nas criptas é porque a absorção lipídica pode promover a morte celular por estresse oxidativo (Freitas et al., 2012; Turan, Mahmood, 2007) e tanto ácidos graxos livres quanto os sais biliares podem aumentar a permeabilidade da membrana dos enterócitos, ocasionando danos às células (Danielsen et al., 2013). Além disso, os enterócitos indiferenciados são mais sensíveis a ácidos graxos e sais biliares do que enterócitos diferenciados (Danielsen et al., 2013). Podemos supor que os ácidos graxos e/ou sais biliares sejam deletérios também para os enterócitos

de répteis, uma vez que foram demonstrados aumento de células apoptóticas no intestino de Python (Lignot et al., 2005) e a presença de células necróticas no intestino de *Caiman latirostris* (Starck et al., 2007), em estado pós prandiano. Além disso, sais biliares obtidos de crocodilianos são utilizados como indutores apoptóticos em cultura de algumas células imortalizadas (Kang et al., 2012; Song et al., 2012).

Deste modo, enquanto que em mamíferos a presença de uma barreira física proporcionada pelo tecido parece contribuir para a restrição da absorção de lipídeos pelos enterócitos indiferenciados e para a manutenção da integridade de enterócitos proliferativos, em animais cujas criptas intestinais estão ausentes, como nos crocodilianos, outro mecanismo parece adquirir importância maior, como a expressão gênica diferencial ao longo do eixo base-ápice das vilosidades, estabelecendo regionalizações funcionais ao longo da vilosidade intestinal.

Em mamíferos além da presença de criptas intestinais, a regionalização funcional para o metabolismo lipídico também ocorre no nível de expressão gênica. Suzuki et al. (2007) mostraram que enquanto nas criptas grande parte dos genes expressos nos enterócitos são relacionados com o ciclo celular, na lateral e no ápice das vilosidades, a maior parte da expressão é de genes relacionados à digestão e ao transporte de nutrientes, dentre eles, genes reguladores do metabolismo lipídico. Por este motivo, enterócitos provenientes das criptas apresentam menor capacidade de absorção de ácidos graxos livres do que células que ocorrem ao longo das vilosidades (Palacios, Catalá, 1991) e possuem capacidade limitada de secretar lipoproteínas (Levy et al., 2000) quando são cultivados em presença de ácidos graxos. Dentre os genes que são responsáveis pela regionalização do metabolismo lipídico, podemos destacar a presença das proteínas ligantes de ácidos graxos FABP1 e FABP2 (*Fatty Acid Binding Protein*), expressos no ápice e nas laterais das vilosidades, mas ausentes nas criptas intestinais de ratos (Guilemeau et al., 2007; Suzuki et al., 2009; Levy et al., 2009; Poirier et al., 1996; Shields et al., 1986).

Apesar de a absorção de lipídeos provenientes da dieta ocorrer por simples difusão pela membrana plasmática dos enterócitos, acredita-se que a remoção dos ácidos graxos livres difundidos na membrana plasmática seja feita por FABPs, diminuindo a concentração de ácidos graxos nas membranas e as solubilizando no citoplasma, permitindo a difusão de mais ácidos graxos para o interior dos

enterócitos. FABP serviria, portanto, como um transportador intracelular para os ácidos graxos. Deste modo, a ausência de proteínas ligantes de ácidos graxos nos enterócitos presentes na base das vilosidades poderia explicar a ausência de partículas osmiofílicas observáveis nesta região, uma vez que sem FABPs, espera-se que pouco lipídeo seja absorvido por estes enterócitos e consequentemente não poderiam ser observados pela técnica histológica. Seria interessante, portanto, verificar o padrão de expressão para FABPs no intestino de crocodilianos para testar esta hipótese diretamente.

A observação de um domínio em que há a presença de enterócitos PCNA positivos e absorptivos seria, portanto, uma região de transição, composta por enterócitos recém-diferenciados que iniciam o processo absorptivo.

5.3 Alterações morfológicas das vilosidades intestinais durante a absorção lipídica

O processo de inclusão lipídica não alterou a organização do epitélio de revestimento da mucosa intestinal, o qual se apresentou com a organização pseudoestratificada na lateral e na base das vilosidades, assim como ocorreu no controle. Apenas no ápice das vilosidades, notamos modificação da organização epitelial, onde os enterócitos formavam epitélio do tipo simples no controle, com a presença de enterócitos bem aproximados, enquanto que nos animais tratados com óleo de soja, os enterócitos também se dispuseram segundo epitélio simples, porém com os enterócitos mais afastados. Starck et al., (2007) demonstraram que o epitélio de revestimento da mucosa intestinal de *Caiman latirostris* é do tipo pseudoestratificado, mas que funcionaria como um epitélio de transição durante a digestão alimentar, uma vez que durante o processo de absorção de nutrientes, os enterócitos aumentam seu volume em decorrência do acúmulo de gotículas lipídicas. Como consequência deste aumento de volume, juntamente com o aumento do fluxo sanguíneo e da dilatação dos quilíferos, o volume do epitélio de revestimento se distende e os enterócitos são reorganizados em epitélio do tipo simples. Este seria um dos mecanismos propulsores do processo de alongamento das vilosidades intestinais que é observado em répteis após alimentação e responsável pelo aumento da espessura da mucosa intestinal, atingindo sua espessura máxima 72 horas após início da ingestão (Starck, Beese, 2001, 2002; Starck et al., 2007).

Foi demonstrado, em *Caiman latirostris*, que o alongamento da vilosidade intestinal e consequentemente a reorganização epitelial da mucosa que ocorre após alimentação são causados também pelo dilatamento dos vasos linfáticos e pelo aumento do fluxo sanguíneo para a mucosa intestinal (Starck et al., 2007). Observamos que os vasos linfáticos estavam dilatados e preenchidos por partículas osmiofílicas, após absorção de óleo de soja, mas apesar disso, o epitélio de revestimento não alterou sua organização, possivelmente por não ter havido aumento do fluxo sanguíneo o suficiente para ocasionar distensão das vilosidades intestinais.

Outra possível explicação para a ausência de distensão do epitélio de revestimento de *Caiman yacare* após absorção de óleo de soja é que a absorção não teria atingido seu potencial máximo, apesar da ocupação de 39% a 47% da área do epitélio de revestimento, volume um pouco abaixo do observado no peixe *Salvelinus alpinus* L. (61%) alimentado com ração suprida de óleo de linhaça (Olsen et al., 2000), porém mais do que o obtido após injeção intragástrica de óleo de milho em *Notothenia coriiceps* (30%) (Hernandez-Blazquez et al., 2006).

Como a distensão da vilosidade intestinal foi descrita em répteis alimentados com pedaços de carne, o fenômeno de distensão dos enterócitos poderia ocorrer por causa da absorção adicional de aminoácidos, carboidratos e íons, ausentes em nossos experimentos. Deste modo, apenas com a injeção intragástrica de óleo de soja, o aumento de volume dos enterócitos não deve ter ocorrido de maneira completa e, portanto, a administração de óleo de soja não seria suficiente para distender as vilosidades intestinais, representando um ponto positivo, uma vez que a hipertrofia dos enterócitos pode ocasionar a ruptura do epitélio de revestimento, danificando a mucosa intestinal, conforme discutido a seguir.

Olsen et al. (2000), utilizando ração contendo proporções crescentes de óleo de linhaça (entre 5% e 20%), mostraram que existe correlação direta entre o aumento da área epitelial ocupada pelas gotículas lipídicas e o grau de lesão intestinal no salmonídeo *Salvelinus alpinus* L., sendo que o índice máximo de lesão ocorre quando 61% do epitélio de revestimento é ocupado por gotículas lipídicas. Deplano et al. (1989) utilizando ração contendo 12% de óleo de peixe, demonstraram que a hipertrofia dos enterócitos, que chegou a dobrar de tamanho após absorção de óleo, estava correlacionada com o aumento do índice de lesão

nos enterócitos no peixe *Dicentrarchus labrax* e Caballero et al. (2003), utilizando ração contendo 22% de lipídeos de origem vegetal, demonstraram que o máximo de área ocupada pelas gotículas lipídicas foi de apenas 13%, e as lesões epiteliais não ocorreram em *Sparus aurata*.

Uma vez que o perfil de ácidos graxos presentes na dieta influencia diretamente a composição de fosfolipídeos presentes da membrana plasmática dos enterócitos (Caballero et al., 2003) e estes influenciam as propriedades de fluidez e resistência à distensão da membrana plasmática, os diferentes óleos utilizados podem alterar a resistência dos enterócitos ao carregamento pelos lipídeos provenientes da absorção dietética. Em *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, a suplementação do meio de cultura com ácido linolênico (18:3 n-3) torna as células mais resistentes à pressão osmótica do que com a adição de ácido linoleico (18:2 n-6) e este ácido graxo, por sua vez, as tornam mais resistentes do que com ácido oleico (18:1 n-9) ou com ácido palmítico (16:0) (Freitas et al., 2012). Exemplo deste processo em peixes foi obtido com eritrócitos de *Salmo salar* L. alimentados com suplementação de ácido docosaexaenoico (22:6 n-3) e ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3), que apresentaram membranas plasmáticas mais resistentes à pressão osmótica do que eritrócitos de animais sem a presença destes ácidos graxos na alimentação (Erdal et al., 1991). Resta, portanto, testar a hipótese de que a adição de diferentes óleos vegetais na dieta animal altera a resistência osmótica dos enterócitos, fazendo-os mais ou menos resistentes a diferentes cargas de gotículas lipídicas, explicando a relação entre a quantidade de inclusões lipídicas e a ruptura que ocorre nos enterócitos.

Nossos dados mostram que a administração aguda de óleo de soja ocasiona a formação de intestino esteatótico, mas as inclusões lipídicas não foram correlacionadas com a presença de lesão intestinal, uma vez que observamos lesões intestinais também no animal controle, nos quais as inclusões não estavam presentes. Na espécie de cobra *Thamnophis sirtalis parietalis* alimentadas com peixes, observou-se a presença de inclusões lipídicas, mas não foram reportadas presenças de lesões intestinais (Starck, Beese, 2002). O mesmo autor, no entanto, descreveu a presença de células apoptóticas no ápice das vilosidades intestinais de *Python molurus bivittatus* (Starck, Beese, 2001) depois de se alimentarem com ratos ou coelhos, e células necróticas em *Caiman latirostris* (Starck et al., 2007)

alimentados com frango, sendo que nestes dois casos, a presença de inclusões lipídicas era bastante evidente, embora não fossem estimados os percentuais de ocupação das inclusões. A presença destas células apoptóticas e/ou necróticas no ápice das vilosidades, provavelmente se deveu ao processo de renovação celular que ocorre no epitélio da vilosidade intestinal, cujas taxas são aumentadas pós prandialmente (Lignot et al., 2005) e não seriam lesões devido a presença das inclusões lipídicas. Portanto, a presença de gotículas lipídicas pode ser descrita como processo fisiológico normal no intestino de répteis.

Nos peixes nos quais foram notadas as lesões intestinais e associadas ao aumento da presença de inclusões lipídicas ocorreu em animais após tratamentos crônicos com rações artificiais, adicionadas de diferentes óleos vegetais e/ou óleo de peixe (Deplano et al., 1989; Olsen et al., 1992, 1999, 2000). Borges et al. (2010), Denstadli et al. (2004) e Hernandez-Blazquez et al. (2006), no entanto, utilizaram injeção intragástrica de óleo vegetal sem associação com qualquer tipo de ração e analisaram os dados após apenas três dias, não mencionando a presença de lesões na mucosa intestinal após o tratamento, supostamente pela ausência destas. Estes dados reforçam a sugestão de que o excesso de carregamento dos enterócitos por lipídeos por si só não seriam capazes de ocasionar lesão intestinal, mas que as lesões ocorreriam em decorrência das alterações nos enterócitos e/ou na mucosa intestinal em resposta a dietas artificiais hiperlipídicas e que ocorreriam apenas em longo prazo. De fato, Douglas et al. (2012) mencionam que o intestino delgado de camundongos obesos, que apresentam maior quantidade de lipídeos na mucosa intestinal, mesmo quando alimentados com dietas com baixa concentração lipídica, são mais frágeis ao processamento histológico do que camundongos alimentados com dietas hiperlipídicas, mas que não são obesos, sugerindo que há efeito crônico do lipídeo na ocorrência de alterações na integridade epitelial.

5.4 Caracterização morfológica e ultraestrutural dos granulócitos presentes na mucosa intestinal de Caiman yacare após fixação com tetróxido de ósmio

Os heterófilos em crocodilianos são bastante característicos, reconhecidos pela presença dos grânulos eosinofílicos com formatos diversos, predominando os com forma de bastonetes (Girons, 1971; Glassman et al., 1981; Mateo et al., 1984; Moura et al., 1999). A única alteração observada com a coloração Rosenfeld após

fixação por tetróxido de ósmio foi a falta de coloração eosinofílica dos grânulos (Claver, Quaglia, 2009; Montali, 1988). Apesar de serem os leucócitos mais abundantes no sangue, chegando a perfazer 50% dos leucócitos (Zayas et al., 2011), estavam presentes em pouco número na mucosa intestinal e não conseguimos caracterizá-lo em microscopia eletrônica.

Os mastócitos foram identificados por serem células com abundância de grânulos grandes, bem evidentes e com bordas definidas e ligeiramente metacromáticos, mesmo com a pós fixação com tetróxido de ósmio. O tipo de fixador utilizado alterou bastante a morfologia e a propriedade tintorial dos grânulos, sendo que com o fixador glutaraldeído e sem pós fixador tetróxido de ósmio, os grânulos se apresentaram bastante metacromáticos, com coloração magenta intensa e os grânulos não foram observados com as bordas definidas e de maneira individualizadas, mas como um aglomerado de grânulos (dados não mostrados). A distribuição dos mastócitos pela mucosa é bastante característica, percorrendo toda a extensão da vilosidade intestinal e sempre próximos à lâmina basal ou a vasos sanguíneos (Crivellato, Ribatti, 2010; McMenamin, Polla, 2013). A maior parte dos mastócitos apresentaram, sob microscopia eletrônica de transmissão, grânulos irregulares, frequentemente imbricados.

Um segundo tipo de granulócito foi identificado em microscopia eletrônica de transmissão. Trata-se de granulócito com grânulos menores do que os presentes nos mastócitos, sem as formas irregulares e imbricadas destes, conforme evidenciado por microscopia eletrônica de transmissão e embora alguns fossem ligeiramente alongados, a predominância foi de grânulos arredondados. Acreditamos que sejam micrografias eletrônicas dos granulócitos presentes próximos à muscular da mucosa, os quais denominamos granulócitos eosinofílicos pela sua afinidade pelo corante eosina (Reite, Evensen, 2006). Os grânulos eram de pequeno tamanho e com bordas não bem definidas, por isso, observáveis com dificuldade em microscopia de luz. Uma vez que os grânulos são menores do que os presentes nos eosinófilos de sangue periférico de outros crocodilianos (Oliveira et al., 1998; Montali, 1988; Stacy et al., 2011; Wanstall, Robotham, Thomas, 1986; Zayas et al., 2011), estes não parecem ser os eosinófilos circulantes (Moura et al., 1997, 1998). Sua localização restrita em uma faixa próxima a muscular da mucosa as fazem se assemelhar às células granulocíticas eosinofílicas/mastócitos presentes no estrato

granuloso de salmonídeos e de outros peixes (Leknes, 2007), embora em *Caiman yacare* estas células se apresentem bem menos numerosas do que nestes peixes, ocorrendo apenas uma ou duas vezes a cada campo óptico máximo (Reite, Evensen, 2006; Wanstall, et al., 1986). É sabido que mastócitos apresentam grande diversidade fenotípica e de tipos de grânulos, dependendo do seu local de residência (Crivellato, Ribatti, 2010). Além disso, a diversidade de conteúdos nos grânulos as fazem ter propriedades tintoriais diferentes (Reite, Evensen, 2006). Por este motivo, os granulócitos eosinofílicos presentes próximo à muscular da mucosa poderiam representar uma segunda população de mastócitos residentes na mucosa intestinal, diferentes dos presentes ao longo das vilosidades.

5.5 Efeitos da absorção lipídica no recrutamento de granulócitos para a mucosa intestinal

Ainda que as lesões do epitélio de revestimento da mucosa intestinal observadas no presente trabalho não tenham sido causadas pela administração de óleo de soja, a análise do recrutamento de células do sistema imune inato se fez necessário, uma vez que o processo de absorção de ácidos graxos de cadeia longa (C14-C24) e em especial ácido linoleico (18:2 n-6), é suficiente para aumentar a permeabilidade do epitélio das vilosidades intestinais a bactérias potencialmente patogênicas (Ji et al., 2011; Scudamore et al., 2009). Ácido linoleico induz a degranulação de mastócitos presentes na lâmina própria, e o conteúdo dos grânulos faz diminuir a adesão célula-célula, aumentando a permeabilidade a macromoléculas/bactérias pela rota paracelular. Com isso, a absorção de lipídeos pode causar, indiretamente, processo infeccioso na mucosa intestinal e como resposta à infecção, haveria o acúmulo de granulócitos na mucosa intestinal, especialmente de células fagocitárias, como é o caso dos heterófilos de répteis (Ji et al., 2011; Stacy et al., 2011).

Em peixes, Geurden et al. (2009) descreveram que a permeabilidade epitelial é aumentada em animais alimentados com ração adicionada de óleos de canola e linhaça, enquanto que a adição de óleo de peixe diminui a permeabilidade. Nossos dados mostram que não foram observadas alterações grosseiras nas concentrações de mastócitos ou mastócitos degranulados, não sendo possível pela técnica histológica, avaliar se houve aumento da permeabilidade da mucosa intestinal

causada pela ingestão de óleo de soja. Resta verificar, portanto, se a absorção de lipídeos aumenta a permeabilidade da mucosa intestinal também em jacarés, como já descrito em mamíferos (Ji et al., 2011) e em peixes.

Não observamos alterações nas concentrações de heterófilos na mucosa intestinal de animais tratados com óleo de soja por 24, 48 ou 72 horas que sugerisse a presença de infiltrados leucocitários em resposta a infecções bacterianas (Montali, 1988). O tempo de tratamento analisado pode ter sido insuficiente para que houvesse recrutamento de granulócitos para a mucosa intestinal, apesar de Mateo (1984) ter descrito a presença de infiltração heterofílica subcutânea em *Alligator mississippiensis* mantido a 25 °C com apenas quatro horas de lesão, e a presença de heterófilos na mucosa atingido seu recrutamento máximo em apenas três dias após lesão. A presença de heterófilos tóxicos ou degranulados, que ocorrem em resposta a infecção bacteriana (Stacy et al., 2011) também não foram observados na mucosa intestinal.

Assumindo que em crocodilianos a absorção lipídica também aumente a permeabilidade da mucosa intestinal a bactérias, como observado em mamíferos (Ji et al., 2011; Scudamore et al., 2009) e em peixes (Geurden et al., 2009), a ausência de recrutamento leucocitário após absorção de óleo de soja pode indicar depressão de resposta imune inato nestes animais frente a um possível processo infeccioso. Em mamíferos, dietas contendo óleos ricos em ácido oleico (18:1 n-9) e ácido linoleico (18:2 n-6) aumentam o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para sítios desafiados com antígenos bacterianos, enquanto que a adição de óleos contendo ácidos graxo ômega-3 depreciam estes parâmetros do sistema imune inato, e o balanço apropriado entre as duas classes de lipídeos modula a resposta imune (Ghosh et al., 2013; Hekmatdoost et al., 2013; Rodrigues et al., 2010).

Contrariamente ao observado em mamíferos, o peixe *Onchorynchus mykiss* tratado com óleo de girassol, também contendo altas concentrações de ácido oleico (18:1 n-9) e linoleico (18:2 n-6), mas com baixa concentração de ômega-3 (Pickova, Morkore, 2007), apresenta diminuição no recrutamento de neutrófilos (Ashton et al., 1994); no peixe *Sparus aurata*, tratamento com óleo de soja, contendo sete vezes mais ômega-6, na forma de ácido linoleico (18:2 n-6), do que ômega-3, diminui a capacidade fagocitária de macrófagos (Montero et al., 2003); o efeito bactericida de macrófagos do peixe *Ictalurus punctatus* é menor após tratamento com óleo de soja,

quando comparado com óleo de peixe, rico em ômega-3 (Sheldon, Blazer, 1991); e em *Dicentrarchus labrax* L., o número total de leucócitos circulantes e o índice fagocitário de macrófagos são diminuídos com adição de canola, que apresenta mais ômega-6 do que ômega-3 (Mourente et al., 2005). Não sabemos se este padrão de resposta imune é amplo entre os peixes ou se restrito a apenas algumas espécies, provavelmente se apresentando em peixes marinhos, mas não em espécies dulçaquícolas. De qualquer modo, estes trabalhos chamam a atenção para a possibilidade de que dietas adicionadas de óleos vegetais ricos em ômega-6 e/ou a supressão de HUFAs na dieta (abundantes em óleos de peixes), possam provocar depressão de alguns parâmetros imunológicos de maneira espécie-específica (Ashton, et al., 1994; Estensoro et al., 2011; Montero et al., 2003; Oliva-Teles, 2012; Sheldon, Blazer, 1991).

Não sabemos se esta condição ocorre também em jacaré do pantanal. Os jacarés do pantanal mantidos em sistemas de cultivo apresentam proporção de ácidos graxos ômega-6/ômega-3 elevada em seus tecidos musculares, adiposo e sanguíneo, condição inversa ao encontrado em animais de vida livre (Vicente-Neto et al., 2010). Embora seja necessário verificar se ácidos graxos ômega-6 também estariam aumentados na mucosa intestinal e/ou nos leucócitos, a ausência de recrutamento de granulócitos para a mucosa intestinal após absorção de óleo de soja por estes animais levanta a dúvida se estes animais estão saudáveis ou com alguns parâmetros do sistema imune deprimido, assim como foi observado em alguns peixes. Neste caso, a dieta com adição de óleo de soja agravaria ainda mais a situação por causa do alto teor de ômega-6, especialmente ácido linoleico.

A possível depressão da resposta imune, especificamente a resposta da imunidade inata na mucosa intestinal, ocasionada pela alimentação adicionada de óleo de soja deve ser testada em longo prazo, pois em mamíferos com redução de resposta à infecção na mucosa intestinal, apresenta aumento da mortalidade devido à sepsia provocada por bactérias oportunistas (Ghosh et al., 2013; Hekmatdoost et al., 2013). Por outro lado, a presença de lesões na mucosa intestinal, ocasionadas pela ação de granulócitos recrutados para a mucosa em resposta à ingestão de ácidos graxos que exacerbam a resposta imune, poderia ser visto como sinal positivo, pois resolveria a infecção *in loco*, evitando a ocorrência de sepsia e permitindo a sobrevivência do animal. Em peixes, existem relatos de aumento da

mortalidade de animais por infecções oportunistas quando submetidos a dietas contendo diferentes fontes de óleos vegetais, como por exemplo, *Salmo salar* L. alimentado com adição de óleo de girassol (Thompson et al., 1996) e *Ictalurus punctatus* alimentado com adição de óleo de soja (Sheldon, Blazer, 1991), ambos os óleos apresentando grande proporção de ômega-6.

A ausência de lesão na mucosa intestinal observada em jacaré do pantanal mantidos em sistemas de cultivo após absorção de soja, portanto, poderia ser outro indicativo de supressão do sistema imune provocado pelo excesso de ácidos graxos ômega-6 em seus tecidos. Deste modo, se faz necessário analisar: (1) se o processo absorptivo de óleo de soja alteraria a permeabilidade epitelial em jacarés, aumentando riscos de instalação de processo infeccioso na mucosa intestinal; e (2) se o uso crônico de óleo de soja suprimiria a resposta imune a este processo infeccioso. Isso explicaria porque algumas linhagens bacterianas do gênero *Salmonella*, que habitam a luz intestinal e que normalmente não causam danos aos animais cultivados, em alguns momentos causam surtos epizooticos e levam os animais ao óbito (Van der Walt et al., 1997).

5.6 Caracterização do índice de proliferação dos enterócitos após absorção de óleo de soja

A absorção de lipídeos aumenta os índices de apoptose nos enterócitos, provocado pelo metabolismo aumentado que leva ao estresse oxidativo (Freitas et al., 2012; Turan, Mahmood, 2007). Um mecanismo de resposta da mucosa intestinal frente a estes efeitos deletérios seria o aumento da taxa de proliferação dos enterócitos para evitar o aparecimento de descontinuidades no epitélio de revestimento da mucosa intestinal. Serpentes alimentadas com pedaços de carne aumentam os índices de proliferação celular no intestino após 12 horas de alimentação (Helmstetter et al., 2009), mas uma vez que a morte celular também aumenta proporcionalmente, o resultante deste balanço é apenas o aumento da taxa de renovação epitelial, sem aumento do comprimento das vilosidades devido à hiperplasia (Helmstetter et al., 2009; Lignot et al., 2005; Starck, Beese, 2001, 2002; Starck et al., 2003).

Para verificar se a ausência de lesões intestinais em jacarés tratados com óleo de soja foi causado pelo aumento da proliferação dos enterócitos,

quantificamos a presença de enterócitos proliferativos com o uso do anticorpo PCNA. Não houve diferenças significativas na proporção de enterócitos PCNA positivos nos animais tratados com óleo de soja neste período de tempo analisado. Deste modo, o aumento na taxa de renovação epitelial não seria o responsável pela manutenção da integridade epitelial na mucosa intestinal de jacarés do pantanal após tratamento com óleo de soja. O uso de PCNA para identificação de células proliferativas é criticável, uma vez que esta proteína também é expressa em células que passam por reparos no DNA (Olsvik et al., 2007). Além disso, a imunomarcação apresentou-se como um gradiente de intensidade ao longo do eixo base-ápice da vilosidade, dificultando a decisão da presença ou não de imunomarcação. Alguns trabalhos, no entanto, utilizam este método para a quantificação de células proliferativas no intestino de peixes (Dezfuli et al., 2012).

A localização das células proliferativas na vilosidade intestinal é um aspecto importante a ser analisado, pois óleos vegetais adicionados na dieta de animais cultivados podem apresentar alguma toxicidade para o sistema gastrointestinal. As marcas de óleos de soja comercializadas no Brasil apresentam hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em sua composição, como o benzo[a]pireno, em decorrência do processamento industrial (Camargo et al., 2012). No peixe *Epinephelus coioides* (Yuen et al., 2007), a injeção contínua de benzo[a]pireno no intestino pelo período de quatorze dias aumentou a proliferação celular e as células PCNA positivas, antes restritas à base das vilosidades, passaram a ocupar a parte lateral da vilosidades até próximo ao seu ápice. Uma vez que neste peixe não foi observado aumento no número de células apoptóticas, há indícios do efeito hiperplásico desta substância no intestino deste peixe.

Em jacaré do pantanal, após tratamento com óleo de soja, observamos que não houve aumento da proliferação celular e os enterócitos PCNA positivos continuaram restritos à base das vilosidades, não migrando para em direção ao ápice, assim como no animal controle, e sugerindo que não houve alterando a taxa de renovação epitelial. Novamente, enfatizamos a necessidade de realizar avaliações da toxicidade do uso crônico do óleo de soja na mucosa intestinal. Neste caso, avaliando as taxas de proliferação e renovação epitelial, obtendo mais um parâmetro do bem-estar animal.

5.7 Ultraestrutura das inclusões lipídicas na mucosa intestinal

Existem dois tipos de inclusões lipídicas no citoplasma dos enterócitos: as gotículas lipídicas e as lipoproteínas de secreção. As gotículas lipídicas são formadas por uma região central contendo lipídeos neutros na forma de triglicérides, são envoltas por monocamada de fosfolípídeo, proveniente do Retículo Endoplasmático, que passa a revesti-la após seu brotamento desta organela e proteínas que se associam a esta membrana, que regula diversas etapas da síntese e da lipólise de triglicérides, consequentemente modulando seu tamanho e ocupação no citoplasma do enterócito (Pol et al., 2014). Embora não tenhamos observado membrana circundando completamente as inclusões lipídicas supranucleares, apenas pequenos fragmentos descontínuos, acreditamos que estas inclusões sejam gotículas lipídicas, pelo aspecto homogêneo, pela posição no citoplasma e pelo seu grande volume. Os volumes das gotículas variam bastante e podem chegar a 15 µm de diâmetro, conforme descrito nos enterócitos da larva de *Cyprinus carpio* L. após administração de óleo de amendoim (Fontagné et al., 1998).

Em peixes cultivados, nos quais são testadas diferentes inclusões de óleos na alimentação, a ocupação dos enterócitos com gotículas lipídicas aumenta com o uso de diversos óleos vegetais, como óleo de soja (rico em ômega-6) e óleo de linhaça (rico em ômega-3). Mesmo a adição de óleo de peixe (rico em HUFAs) é suficiente para formar intestino esteatótico, embora o carregamento citoplasmático seja menor do que quando os animais são alimentados com ração contendo óleo vegetal (Caballero et al., 2002, 2003).

Acredita-se que a presença de gotículas lipídicas seja sinal da saturação da capacidade dos enterócitos em formar lipoproteínas de secreção, que passam a acumular os triglicérides no citoplasma na forma de gotículas lipídicas e posteriormente utilizando-as para a formação de lipoproteínas de secreção. Fontagné et al. (1998), utilizando larva do peixe *Cyprinus carpio* L., demonstraram que a adição de óleo de amendoim a 6% na ração aumenta a quantidade de gotículas lipídicas nos enterócitos, processo revertido com a adição de fosfatidilcolina, principal fosfolípídeo presente nos quilomícrons e em VLDL secretadas pelos enterócitos. A diminuição da presença de gotículas lipídicas no intestino também ocorre com a adição de ácido palmítico (16:0) (Olsen et al., 2000),

provavelmente por recrutar estes ácidos graxos para a síntese de membranas celulares (Greevenbroek et al., 1995). Camundongos mutantes para o gene CD36 apresentam diminuição na produção de quilomícrons e intestino esteatótico após alimentação com óleo de oliva, novamente sugerindo que a formação das gotículas lipídicas supranucleares nos enterócitos está relacionada com a saturação da capacidade de produção de lipoproteínas de secreção (Drover, et al., 2005).

A presença de gotículas lipídicas foi relatada em cobras e serpentes após alimentação com tecidos animais (Starck, 2001, 2002), assim como em *Caiman latirostris* após alimentação com carne de frango, mesmo em pequena quantidade (1% do peso corpóreo) (Starck et al., 2007) e nossos dados evidenciam a presença de gotículas lipídicas em *Caiman yacare* após administração de óleo de soja, apresentando o mesmo grau de intestino esteatótico ao observado em *Caiman latirostris* após alimentação com carne de frango. Ainda, com 72 horas, os segmentos mais craniais do intestino não apresentaram as inclusões lipídicas, indicando a finalização do processo absorptivo e que o intestino esteatótico é um processo fisiológico normal, reversível e não estaria relacionado diretamente a um possível processo patológico intestinal.

As lipoproteínas secretadas pelos enterócitos podem ser divididas em duas categorias: quilomícrons ou VLDL. Uma forma possível de diferenciação das duas lipoproteínas leva em consideração seus tamanhos, com quilomícrons variando entre 75 e 1200 nm de diâmetro (Demignot et al., 2013; Kindel et al., 2010) e as VLDL variando entre 27 e 200 nm de diâmetro. As lipoproteínas observadas na mucosa do jacaré do pantanal em resposta à absorção de óleo de soja foram, frequentemente, maiores do que os valores descritos para VLDL, podendo ser consideradas, portanto, quilomícrons, embora sejam quilomícrons pequenas, por não ultrapassarem 440 nm de diâmetro (Bauermeister et al., 1979; Casley-Smith, 1962; Deplano et al., 1989, 1991).

Ácidos graxos poli-insaturados promovem a formação de lipoproteínas grandes, do tipo quilomícrons, enquanto ácidos graxos saturados promovem a formação de lipoproteínas menores, do tipo VLDL (Greevenbroek et al., 2000; Sakr et al., 1997; Sire et al., 1981). Óleo de soja apresenta 60% de PUFA e 15% de SFA (Dubois et al., 2007), portanto, é esperado que com absorção de óleo de soja, sejam formados tanto quilomícrons quanto VLDL. Caballero et al. (2003) demonstraram

que há diminuição no tamanho das lipoproteínas secretadas pelo intestino após utilização de óleo de soja na alimentação do peixe *Sparus aurata*, com a formação de VLDL entre 56 e 133 nm de diâmetro nos espaços intercelulares, enquanto que após ingestão de óleo de peixe, óleo de linhaça ou óleo de canola, são formados quilomícrons maiores, entre 300 e 800 nm de diâmetro. Existe a possibilidade de que as lipoproteínas secretadas pelos enterócitos do jacaré do pantanal após absorção de óleo de soja sejam menores do que as lipoproteínas secretadas pelos enterócitos desta espécie frente a dietas normais. A formação de lipoproteínas de menor tamanho poderia influenciar negativamente o estado de saúde destes animais, pois poderia alterar o modo de drenagem destas lipoproteínas a partir da mucosa intestinal, conforme discutido a seguir.

5.8 Contribuição das vias linfática e sanguínea no transporte de lipídeos absorvidos pelo intestino

Nossos dados mostram que as partículas osmiofílicas estavam presentes em grande quantidade e com bastante frequência, nos quilíferos centrais da mucosa, nos seios linfáticos e nos vasos linfáticos da túnica muscular, sugerindo a via linfática como a principal via de transporte dos lipídeos a partir dos enterócitos. Em menor quantidade e com pouca frequência, observamos partículas osmiofílicas nos vasos sanguíneos de pequeno calibre da mucosa, que corre ao longo da vilosidade e também em vasos na mucosa próximo à muscular da mucosa. Apesar da presença de partículas osmiofílicas nos vasos sanguíneos da mucosa, não há certeza de que se trate do transporte sanguíneo do lipídeo absorvido pelos enterócitos, uma vez que lipídeos podem ser recuperados em grande quantidade a partir de sangue periférico de animais alimentados (dados não mostrados). Em crocodilianos, os vasos linfáticos mesentéricos desembocam no sistema circulatório na altura da junção entre as veias jugular externa e subclávica (McCauley, 1956), local em que as lipoproteínas secretadas pelos enterócitos ganhariam o sistema circulatório. O grande tamanho das partículas osmiofílicas presentes nos vasos sanguíneos sugere que a origem deste lipídeo seja realmente da circulação sanguínea, uma vez que partículas grandes não conseguiriam atravessar o endotélio. Estes dados sugerem, portanto, que em crocodilianos, a drenagem de lipídeos a partir da mucosa intestinal é similar à descrita para os mamíferos, com maior

participação do sistema linfático, mas não podemos descartar a contribuição do sistema circulatório no transporte das lipoproteínas pequenas, como VLDL, após a absorção de óleo de soja.

Os quilíferos centrais são os principais captadores de lipoproteínas grandes, como os quilomícrons, enquanto que lipoproteínas menores, assim como ácidos graxos livres de cadeia carbônica média, associados a albumina, são capazes de ganhar o sistema circulatório diretamente (Dixon, 2010; Ramírez et al., 2001). A secreção de quilomícrons de pequeno tamanho, conforme o observado neste trabalho, associado ao processo de permeabilização da mucosa e dos vasos sanguíneos promovidos pela degranulação dos mastócitos presentes na mucosa, estimulada por ácidos graxos de cadeia longa provenientes da dieta (Ji et al., 2011), poderiam contribuir para aumentar o direcionamento de lipoproteínas diretamente aos capilares sanguíneos da mucosa. O direcionamento de lipoproteínas diretamente pelo sistema circulatório é bastante evidente em aves, cujos quilíferos centrais são pouco desenvolvidos e por este motivo os enterócitos secretam lipoproteínas menores, de até 173 nm (Fraser et al., 1986) chamadas portomícrons que caem nos capilares sanguíneos e se dirigem diretamente para o fígado via veia porta-hepática, sem passar pelo sistema linfático (Arija et al., 2000; Baião, Lara, 2005; Fraser et al., 1986; Hermier, 1997; Noyan et al., 1964; Sklan et al., 1984; Stevens, 2004).

Em camundongos, a deleção do gene *C1galt1* gera interconexão dos vasos linfáticos e sanguíneos na mucosa intestinal e as lipoproteínas secretadas pelos enterócitos também são direcionadas para o fígado pelos vasos sanguíneos, simulando a condição apresentada em aves, mas em camundongos, esta condição é patológica, causando esteatose hepática (Fu et al., 2008). No peixe *Sparus aurata*, Caballero et al. (2004) mostraram a formação de esteatose hepática quando óleo de soja é adicionado à dieta e associado à formação de VLDL, mas não com óleo de linhaça e a formação de quilomícrons. A esteatose, no entanto, é considerada reversível com a remoção deste óleo vegetal da alimentação e não há ocorrência de necrose no tecido hepático, por este motivo não foi considerada patológica.

Esteatose hepática é frequentemente descrita em crocodilianos mantidos em sistemas de cultivo e alimentados com restos de animais contendo altas concentrações de ácido linoleico (Coulson, Hernandez, 1983; Huchzermeyer, 2000;

Larsen et al., 1983; Osthoff et al., 2010; Wallach, Hoessle, 1968). Desta forma, será necessário observar se o uso crônico de óleo de soja na dieta aumentaria a quantidade de lipoproteínas de pequeno tamanho, se estes seriam direcionados ao fígado e se provocariam esteatose hepática em jacarés do pantanal.

6 CONCLUSÃO

Existe certa variabilidade das respostas histofisiológicas dos vertebrados frente a dietas hiperlipídicas, portanto, no contexto de manejo do jacaré do pantanal, se faz necessário entender o metabolismo lipídico desta espécie para fornecer subsídios para aplicar melhorias no cultivo deste recurso econômico de grande importância local. Pelos dados aqui apresentados, concluímos:

- Todos os segmentos intestinais do jacaré do pantanal foram capazes de absorver intensamente o óleo de soja, enquanto que o intestino grosso também o fez, embora em menor proporção.

- O tempo de passagem do óleo de soja pelo sistema gastrointestinal nesta espécie foi estimado em 24 horas, a temperatura média de 31,5 °C.

- A adição de óleo de soja causou intenso acúmulo de gotículas lipídicas nos enterócitos, formando intestino esteatótico, mas este processo não representa condição patológica, uma vez que foi temporário.

- Grande parte do óleo de soja absorvido foi transportado pelos vasos linfáticos na forma de quilomícrons de pequenas dimensões.

- Óleo de soja não causou lesões na mucosa intestinal do jacaré do pantanal e não ocasionou infiltração de granulócitos na lâmina própria, pelo menos de maneira aguda, pelo prazo de 72 horas.

- Apesar das observações positivas para a potencial utilização de óleo de soja na formulação de dietas para o cultivo de jacaré do pantanal, o que contribuiria para redução nos custos com a alimentação, estudos crônicos com utilização de óleo de soja e interação com outros elementos da dieta devem ser conduzidos para verificar a eficácia desta matéria-prima no ganho de peso, crescimento e possíveis efeitos colaterais com a utilização crônica, que possam alterar o bem-estar desta espécie, especificamente, alterações na resposta imune e resistência a infecções.

REFERÊNCIAS³

Abumrad NA, Davidson NO. Role of the gut in lipid homeostasis. *Physiol Rev.* 2012;92(3):1061–85.

Aleixo VM. Efeitos do uso de farelo de soja e de sistemas de alimentação sobre o desempenho de filhotes de jacaré-do-pantanal [*Caiman yacare* (Daudin, 1802)]. [dissertação (Mestrado em Produção Animal)]. Lavras: Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras; 2000.

Aleixo VM, Vieira P, Logato R, Ilson A, Oliveira GDE, Fialho ET. Efeitos da adição de diferentes teores de farelo de soja na dieta sobre o desenvolvimento de filhotes de jacaré-do-pantanal (*Caiman yacare* (Daudin, 1802)). *Ciênc Agrotec.* 2002;26(2):411-17.

Aleixo VM, Pressinoti LN, Campos DVS, Menezes-aleixo RDC, Ferraz RHS. Histologia, histoquímica e histometria do intestino de jacaré-do-pantanal criado em cativeiro. *Pesq Vet Bras.* 2011a;31(12):1120–8.

Aleixo VM. Análise histológica, histoquímica, histométrica e ultraestrutural de intestinos de jacaré do pantanal (*Caiman yacare* Daudin, 1802) (Crocodylia:Reptilia). [tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais)]. São Carlos: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos; 2011b.

Andrews PL, Axelsson M, Franklin C, Holmgren S. The emetic reflex in a reptile (*Crocodylus porosus*). *J Exp Biol.* 2000;203(10):1625-32.

Andrews PL, Horn, CC. Signals for nausea and emesis: implications for models of upper gastrointestinal diseases. *Auton Neurosci.* 2006;125(1-2):100-15.

Arija I, Viveros A, Brenes A, Canales R, Pizarro M, Castaño M. Histological alterations in the intestinal epithelium caused by the inclusion of full-fat sunflower kernels in broiler chicken diets. *Poult Sci.* 2000;79(9):1332–4.

Arslan M, Rinchar J, Dabrowski K, Portella MC. Effects of different dietary lipid source on the survival, growth, and fatty acid composition of south american catfish, *Pseudoplatystoma fasciatum*, Surubim, juveniles. *J World Aquac Soc.* 2008;39(1):51-61.

Arts MT, Kohler CC. Health and condition in fish: the influence of lipids on membrane competency and immune response. In: Arts MT, Kainz M, Brett MT. editores. *Lipids in Aquatic Ecosystems*. New York: Springer; 2009. p.237-55.

³De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Ashton I, Clements K, Barrow SE, Secombes CJ, Rowley AF. Effects of dietary fatty acids on eicosanoid-generating capacity, fatty acid composition and chemotactic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1214(3):253–62.

Atshaves BP, Martin GG, Hostetler HA, McIntosh AL, Kier AB, Schroeder F. Liver fatty acid binding protein and obesity. *J Nutr Biochem*. 2010;21(11):1015-32.

Baião NC, Lara LJC. Oil and Fat in Broiler Nutrition. *Braz J Poult Sci*. 2005;7(3):129-41.

Bampi MI, Coutinho M. Policy for the conservation and management of jacaré (Caiman yacare) in Brazil. In: Ross JP, Godshalk R. editores. International workshop for management and trade of Caiman yacare; 2003. Gainesville, Flórida, EUA. Specialist Crocodiles Groups and Florida Museum of Natural History; 2003. p35-48.

Bauchart D. Lipid absorption and transport in ruminants. *J Dairy Sci*. 1993;76(12):3864-81.

Bauermeister AE, Pirie BJ, Sargent JR. An electron microscopic study of lipid absorption in the pyloric caeca of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) fed wax ester-rich zooplankton. *Cell Tissue Res*. 1979;200(3):475-86.

Bennett S. Intestinal absorptive capacity and site of absorption of fat under steady state conditions in the unanaesthetized rat. *Q J Exp Physiol Cogn MEd Sci*. 1964;49:210-8.

Bjorndal KA, Bolten AB. Digestive efficiencies in herbivorous and omnivorous freshwater turtles on plant diets: do herbivores have a nutritional advantage? *Physiol Zool*. 1993;66:384-95.

Blazer VS. Nutrition and disease resistance in fish. *Ann Rev Fish Diseases*. 1992;2:309-22.

Booman M, Xu Q, Rise M. Evaluation of the impact of camelina oil-containing diets on the expression of genes involved in the innate anti-viral immune response in atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Shellfish Immunol*. 2014; doi: 10.1016/j.fsi.2014.05.017.

Booth CC, Read AE, Jones E. Studies on the site of fat absorption. 1. The sites of absorption of increasing doses of ¹³¹I-labelled triolein in the rat. *Gut*. 1961a;2(1):23-31.

Booth CC, Alldis D, Read AE. Studies on the site of fat absorption. 2. Fat balances after resection of varying amounts of the small intestine in man. *Gut*. 1961b;2(2):168-74.

Borges JCS, Pressinotti LN, Gomes V, da Silva JRMC. Lipidic and proteic absorption in digestive tract of tropical fat snook (*Centropomus parallelus*, POEY 1860). *J Exp Mar Biol Ecol*. 2010;386(1-2):39–44.

Borgstrom B, Dahlqvist A, Lundh G, Sjoval J. Studies of the site of intestinal digestion and absorptive in the human. *J Clin Invest.* 1962;36(10):1521–36.

Borgstrom B. Fat digestion and absorption. *Biomembranes.* 1974;4B(0):555-620.

Bransden MP, Carter CG, Nichols PD. Replacement of fish oil with sunflower oil in feeds for atlantic salmon (*salmo salar* L.): effect on growth performance, tissue fatty acid composition and disease resistance. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2003;135(4):611-25.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Portaria nº126 de 13 de fevereiro de 1990, 1990.

Brasil. Instrução Normativa IBAMA 169, de 20 de fevereiro de 2008, 2008. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/sisbio/images/stories/instrucoes_normativas/IN_n_169_manejo_ex_situ.pdf>.

Brochu CA, Wagner JR, Jouve S, Sumrall CD, Densmore LD. A correction corrected: consensus over the meaning of *Crocodylia* and why it matters. *Syst Biol.* 2009;58(5):537-43.

Busack SD, Pandya S. Geographic variation in *Caiman crocodilus* and *Caiman yacare* (*Crocodylia:Alligatoridae*): systematic and legal implications. *Herpetologica.* 2001;57(3):294-312.

Caballero MJ, Obach A, Rosenlund G, Montero D, Gisvold M, Izquierdo MS. Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture.* 2002;214(1-4):253–71.

Caballero MJ, Izquierdo MS, Kjørsvik E, Montero D, Socorro J, Fernández AJ, Rosenlund G. Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture.* 2003;225(1-4):325–40.

Caballero MJ, Izquierdo MS, Kjørsvik E, Fernández AJ, Rosenlund G. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *J Fish Dis.* 2004;27(9):531-41.

Calder PC. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol.* 2013;75(3):645-62.

Camargo MCR, Antonioli PR, Vicente E. Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons content in different stages of soybean oils processing. *Food Chem.* 2012;135(3):937-42.

Campos ZMS. Comportamento de termorregulação, movimento, área de uso e suas implicações para o manejo do jacaré-do-pantanal (*Caiman crocodilus yacare*). [tese

(Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre)]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; 2002.

Campos Z, Mourão G, Coutinho ME. Avaliação de três modelos de manejo para o jacaré-do-Pantanal. Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, 2005 (Comunicado Técnico, 46).

Campos Z, Coutinho M, Magnusson WE. Caiman crocodilus yacare (pantanal caiman). Aestivation. Herp Rev. 2006;37(3):343-4.

Campos Z, Llobet AQ, Piña CI, Magnusson WE. Caiman yacare. In: Manolis SC, Stevenson C. editores. Crocodiles. Status survey and conservation action plan. 3rd ed. Darwin: Crocodile Specialist Group; 2010. p.23-8.

Cardell Jr RR, Badenhausem S, Porter KR. Intestinal triglyceride absorption in the rat. An electron microscopical study. J Cell Biol. 1967;34(1):123-55.

Casley-Smith JR. The identification of chylomicra and lipoproteins in tissue sections and their passage into jejunal lacteals. J Cell Biol. 1962;15:259-77.

Chau JY, Tiffany CM, Nimishakavi S, Lawrence JA, Pakpour N, Mooney JP, Lokken KL, Caughey GH, Tsois RM, Luckhart S. Malaria-associated L-arginine deficiency induces mast cell-associated disruption to intestinal barrier defenses against nontyphoidal Salmonella bacteremia. Infect Immun. 2013;81(10):3515-26.

Chiari Y, Cahais V, Galtier N, Delsuc F. Phylogenomic analyses support the position of turtles as the sister group of birds and crocodiles (Archosauria). BMC Biol. 2012;10:65.

Chiasson RB. Digestive system. In: Chiasson RB. Laboratory anatomy of the alligator. Dubuque, Iowa: W.C. Brown Company; 1962. p. 36-38.

Claver JA, Quaglia AIE. Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. J Exotic Pet Med. 2009;18(2):87-97.

Clench ML, Mathias JR. The avian cecum: a review. Wilson Bull. 1995;107(1):93-121.

Coulson RA, Hernandez T. Alligator metabolism. Studies of chemical reactions in vivo. Comp Biochem Physiol B. 1983;74(1):1-182.

Coutinho M, Campos Z. Effect of habitat and seasonality on the densities of caiman in southern Pantanal, Brazil. J Trop Ecol. 1996;12(5):741-7.

Cowey CB, Sargent JR. Lipid nutrition in fish. Comp Biochem Physiol. 1977;57(B):269-73.

Crivellato E, Ribatti D. The mast cell: an evolutionary perspective. Biol Rev Camb Philos Soc. 2010;85(2):347-60.

Crocodile Specialist Group, organization. [Internet]. Darwin: Crocodile Specialist Group; c2014 [update 2014; cited 2014 jun 05]. Available from: 04/06/2014.<http://www.iucncsg.org/pages/Crocodilian-Species.html> acessado.

Danielsen EM, Hansen GH, Rasmussen K, Niels-Christiansen LL. Permeabilization of enterocytes induced by absorption of dietary fat. *Mol Membr Biol*. 2013;30(3):261–72.

Dawson WR. Reptiles as research models in comparative physiology. *J Am Vet Med A*. 1971;159(11):1653-61.

Demignot S, Beilstein F, Morel E. Triglyceride-rich lipoproteins and cytosolic lipid droplets in enterocytes: key players in intestinal physiology and metabolic disorders. *Biochimie*. 2014;96:48-55.

Denstadli V, Vegusdal A, Krogdahl A, Bake-Mckellep AM, Berge GM, Holm H, Hillestad M, Ruyter B. Lipidic absorption in different segments of the gastrointestinal tract of atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*. 2004;240(1-4):385-98.

Deplano M, Connes R, Diaz JP, Paris J. Intestinal steatosis in the farm-reared sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Disease Aquat Org*. 1989;6:121-30.

Deplano M, Diaz, JP, Connes R, Kentouri-Divanach M, Cavalier F. Appearance of lipid-absorption capacities in larvae of the sea bass *Dicentrarchus labrax* during transition to the exotrophic phase. *Marine Biol*. 1991;108(3):361-71.

Dezfuli BS, Giari L, Lui A, Squerzanti S, Castaldelli G, Shinn AP, et al. Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) expression in the intestine of *Salmo trutta trutta* naturally infected with an acanthocephalan. *Parasit Vectors*. 2012;5(1):198-205.

Diefenbach COC. Regurgitation is normal in Crocodylia. *Ciência e Cultura*. 1981;33(1):82-3.

Dixon JB. Mechanisms of chylomicron uptake into lacteals. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1207(1):E52-7.

Douglas JD, Malik N, Chon Sh, Wells K, Zhou YX, Choi AS, Joseph LB, Storch J. Intestinal mucosal triacylglycerol accumulation secondary to decreased lipid secretion in obese and high fat fed mice. *Front Physiol*. 2012;3:25.

Drover VA, Ajmal M, Nassir F, Davidson NO, Nauli AM, Sahoo D, Tso P, Abumrad NA. CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1290-7.

Duan Q, Mai K, Shentu J, Ai Q, Zhong H, Jiang Y, Zhang L, Zhang C, Guo S. Replacement of dietary fish oil with vegetable oils improves the growth and flesh quality of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *J Ocean Univ China*. 2014;13(3):445-52.

Dubois V, Breton S, Linder M, Fanni J, Fanni J, Parmentier M. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2007;109(7):710–32.

Erdal JI, Evensen O, Kkaurstad OK, Lillehaug A, Solbakken R, Thorud K. Relationship between diet and immune response in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after feeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. *Aquaculture*. 1991;98(4):363-79.

Estensoro I, Benedito-Palos L, Palenzuela O, Kaushik S, Sitjà-Bobadilla A, Pérez-Sánchez J. The nutritional background of the host alters the disease course in a fish-myxosporean system. *Vet Parasitol*. 2011;175(1-2):141–50.

Farias IP, Marioni B, Verdade LM, Bassetti L, Coutinho ME, Mendonça SHST, Vieira TQ, MAgnusson WE, Campos Z. Avaliação do risco de extinção do jacaré-do-pantanal *Caiman yacare* (Daudin, 1802) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*. 2013;31(3):21-30.

Fontagné S, Geurden I, Escaffre AM, Bergot P. Histological changes induced by dietary phospholipids in the intestine and liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture*. 1998;161(1-4):213-23.

Fox AM. Absorption of fatty acids by isolated segments of turtle small intestine. *Comp Biochem Physiol*. 1965;14(4):553-556.

Fracalossi DM, Lovell RT. Dietary lipid sources influence responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to challenge with the pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Aquaculture*. 1994;119(2-3):287-98.

Fraser R, Heslop VR, Murray FEM, Day WA. Ultrastructural studies of the portal transport of fat in chickens. *Br J Exp Pathol*. 1986;67(6):783-91.

Frazer AC. Differentiation in the absorption of olive oil and oleic acid in the rat. *J Physiol*. 1943;102(3):306-12.

Freitas JM, Bravim, F, Buss, DS, Lemos, EM, Fernandes AR, Fernandes PMB. Influence of cellular fatty acid composition on the response of *Saccharomyces cerevisiae* to hydrostatic pressure stress. *FEMS Yeast Res*. 2012;12(8):871-8.

Fu J, Gerhardt H, McDaniel JM, Xia B, Liu X, Ivanciu L, Ny A, Hermans K, Silasi-Mansat R, McGee S, Nye E, Ju T, Ramirez MI, Carmeliet P, Cummings RD, Lupu F, Xia L. Endothelial cell O-glycan deficiency causes blood/lymphatic misconnections and consequent fatty liver disease in mice. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3725-37.

Garnett S. Fatty acid nutrition of the estuarine crocodile *Crocodylus porosus*. *Comp Biochem Physiol B Comp Biochem*. 1985;81(4):1033-5.

Garnett S. Digestion, assimilation and metabolism of captive estuarine crocodiles, *Crocodylus porosus*. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1988;90(1):23–9.

Garrido MVO, Torres MVN, Equisoain MAA. Lipid absorption by enterocytes of the rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*: diet-induced changes in the endomembranous system. *Aquaculture*. 1993;110(2):161-71.

Gauthier GG, Landis SC. The relationship of ultrastructural and cytochemical features to absorptive activity in the goldfish intestine. *Anat Rec.* 1972;172(4):675–701.

Geurden I, Jutfelt F, Olsen R, Sundell KS. Vegetable oil feeding history affects digestibility and intestinal fatty acid uptake in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2009;152(4):552–9.

Gholamiandehkordi AR, Timbermont L, Lanckriet A, Van Den Broeck W, Pedersen K, Dewulf J, Pasmans F, Haesenbrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathol.* 2007;36(5):375-82.

Ghosh S, DeCoffe D, Brown K, Rajendiran E, Estaki M, Dai C, Yip A, Gibson DL. Fish oil attenuates omega-6 polyunsaturated fatty acid-induced dysbiosis and infectious colitis but impairs LPS dephosphorylation activity causing sepsis. *PLOS One.* 2013;8(2):e55468.

Girons MCS. Morphology of the circulating blood cells. In: Gans C. editor. *Biology of the Reptilia*. New York: Academic Press; 1977. p. 73-91.

Glassman AB, Bennett CE, Hazen TC. Peripheral blood components in Alligator mississippiensis. *Trans Am Microsc Soc.* 1981;100(2):210-5.

Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev.* 2010;90(1):367-417.

Goudriaan JR, Dahlmans VE, Febbraio M, Teusink B, Romijn JA, Havekes LM, Voshol PJ. Intestinal lipid absorption is not affected in CD36 deficient mice. *Mol Cell Biochem.* 2002;239(1-2):199-202.

Greene CW. The fat-absorbing function of the alimentary tract of the king salmon. *Bull US Bureau Fish.* 1913;33:143-80.

Greevenbroek MMJ, Voorhout WF, Erkelens DW, Van Meer G, de Bruin TWA. Palmitic acid and linoleic acid metabolism in Caco-2 cells: different triglyceride synthesis and lipoprotein secretion. *J Lipid Res.* 1995;36(1):13-24.

Greevenbroek MMJ, Erkelens DW, Bruin TWA. Caco-2 cells secrete two independent classes of lipoproteins with distinct sensitivity: effect of the ratio of unsaturated to saturated fatty acid. *Atherosclerosis.* 2000;149(1):25-31.

Griffin BA. Lipid metabolism. *Surgery.* 2009;27(1):1-5.

Guilemeau S, Noit I, Laigneau JP, Devaud H, Petit V, Brousse N, Bouvier R, Ferkdadjji L, Besmond C, Aggerbeck LP, Bado A, Samson-Bouma ME. Decreased expression of intestinal I- and L-FABP levels in rare human genetic lipid malabsorption syndromes. *Histochem Cell Biol.* 2007;128(2):115-23.

Gump F, Beals R, Barker HG. Effect of small intestinal resection on fat absorption. *Ann Surg.* 1961;154(3):417-23.

Gump FE, Barker HG. Clinical implications of segmental differences in small intestinal fat absorption. *Surgery*. 1968;64(2):509-13.

Hammond EG, Johnson LA, White PJ, Wang T, Su C. Soybean oil. In: Shahidi F. editor. *Bailey's industrial oil and fat products*. 6th ed. New York: John Wiley & Sons; 2005. p.585.

Harbige LS. Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids*. 2003;38(4):323-41.

Hekmatdoost A, Wu X, Morampudi V, Innis SM, Jacobson K. Dietary oils modify the host immune response and colonic tissue damage following *Citrobacter rodentium* infection in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013;304(10):G917-28.

Helmstetter C, Pope RK, T'Flachebba M, Secor SM, Lignot JH. The effects of feeding on cell morphology and proliferation of the gastrointestinal tract of juvenile Burmese pythons (*Python molurus*). *Can J Zool*. 2009;87(12):1255-67.

Hermier D. Lipoprotein metabolism and fattening in poultry. *J Nutr*. 1997;127(5):805S-8S.

Hernández-Blazquez FJ, Nachi, AM, Ferri S, Ferreira N. Fat intestinal absorption in the catfish - a histochemical study in glycol methacrylate embedded tissue. *Gegenbaurs Morphol Jahrb*. 1989;135(6):941-6.

Hernández-Blazquez FJ. Absorção de lipídeos e proteínas no intestino do peixe antártico *Notothenia neglecta*. *Ultraestrutura*. 1996. [tese (Livre-docência)]. Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo; 1996.

Hernández-Blazquez FJ, Guerra RR, Kfoury Jr JR, Bombonato PP, Cogliati B, da Silva JRMC. Fat absorptive processes in the intestine of the antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844). *Polar Biol*. 2006;29(10):831-6.

Hocquette JF, Bauchart D. Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. *Reprod Nutr Dev*. 1999;39(1):27-48.

Hrbek T, Vasconcelos WR, Rebelo G, Farias IP. Phylogenetic relationships of south american alligatorids and the Caiman of Madeira River. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*. 2008;309(10):588-99.

Huchzermeyer FW. *Crocodiles: biology, husbandry and diseases*. CABI International. Wallingford; UK; 2000. 337p.

Huchzermeyer FW. Diseases of farmed crocodiles and ostriches. *Rev sci tech Off int Epiz*. 2002;21(2):265-76.

Hurwitz S, Bar A, Katz M, Sklan D, Budowski P. Absorption and secretion of fatty acids and bile acids in the intestine of the laying fowl. *J Nutr*. 1973;103(4):543-7.

Hurwitz S, Eisner U, Dubrov D, Sklan D, Risenfeld G, Bar A. Protein, fatty acids, calcium and phosphate absorption along the gastrointestinal tract of the young turkey. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 1979;62(4):847-50.

Isberg SR. Nutrition of juvenile saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*) in commercial production systems. *CAB Rev: Persp Agric, Vet Sci, Nut Nat Res*. 2007;91(2):1-11.

Jackson KG, Robertson MD, Fielding BA, Frayn KN, Williams CM. Olive oil increases the number of triacylglycerol-rich chylomicron particles compared with other oils: an effect retained when a second standard meal is fed. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(5):942-9.

Ji Y, Sakata Y, Tso P. Nutrient-induced inflammation in the intestine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011;14(4):315–21.

Jin SM, Maruch SMG, Rodrigues MARM, Pacheco P. Histologia geral dos intestinos do Caiman crocodilus yacare (Daudin, 1802) (Crocodylia:Reptilia). *Rev. Bras. Zool*. 1990;7(1-2):111–20.

Johnson CM, Cullen JM, Roberts MC. Morphologic characterization of castor oil-induced colitis in ponies. *Vet Pathol*. 1993;30(3):248-55.

Kang JH, Zhang WQ, Song W, Shen DY, Li SS, Tian L, Shi Y, Liang G, Xiong YX, Chen QX. Apoptosis mechanism of human cholangiocarcinoma cells induced by bile extract from crocodile. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;166(4):942-51.

Kapadia CR, Essandoh LK. Active absorption of vitamin B12 and conjugated bile salts by guinea pig ileum occurs in villous and not crypt cells. *Dig Dis Sci*. 1988;33(11):1377-82.

Kindel T, Lee DM, Tso P. The mechanism of the formation and secretion of chylomicrons. *Atheroscler Suppl*. 2010;11(1):11–6.

Kjaer MA, Vegusdal A, Berge GM, Galloway TF, Hillestad M, Kroghdahl A, Holm H, Ruyter B. Characterization of lipid transport in atlantic cod (*Gadus morhua*) when fasted and fed high or low fat diets. *Aquaculture*. 2009;288(3-4):325-36.

Kozaric Z, Petrincic Z, Kuzir S, Gjursevic E, Bazdaric B. Histochemical analyses of digestive enzymes in the intestine of adult large-scaled gurnard (*Lepidotrigla cavillone*, Lacepède, 1801). *Anat hist embryol*. 2011;40(4):314-20.

Kotzé SH, Van der Merwe NJ, Van Aswegen G, Smith GA. A light microscopical study of the intestinal tract of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*, Laurenti 1768). *Onderstepoort J Vet Res*. 1992;59(4):249-52.

Kuerschner L, Moessinger C, Thiele C. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic*. 2008;9(3):338-52.

Lance VA, Morici LA, Elsey RM, Lund ED, Place AR. Hyperlipidemia and reproductive failure in captive-reared alligators: vitamin E, vitamin A, plasma lipids,

fatty acids, and steroid hormones. *Comp Biochem Phys Part B Biochem Mol Biol*. 2001;128(2):285–94.

Lane EP, Huchzermeyer FW, Govender D, Bengis RG, Buss PE, Hofmeyr M, Myburgh JG, Steyl JCA, Pienaar DJ, Kotze A. Pansteatitis of unknown etiology associated with large-scale Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) mortality in Kruger National Park, South Africa: pathological findings. *J Zoo Wildl Med*. 2013;44(4):899-910.

Larsen RE, Buergelt C, Cardeilhac PT, Jacobson ER. Steatitis and fat necrosis in captive alligators. *J Am Vet Med Assoc*. 1983;183(11):1202-4.

Leknes IL. Eosinophilic granule cells and endocytic cells in intestinal wall of pearl gourami (*Anabantidae: Teleostei*). *Fish Shellfish Immunol*. 2007;23(4):897-900.

Levy E, Beaulieu J, Delvin E, Seidman E, Yotov W, Basque J, Ménard D. Human crypt intestinal epithelial cells are capable of lipid production, apolipoprotein synthesis, and lipoprotein assembly. *J Lipid Res*. 2000;41(1):12-22.

Levy E, Ménard D, Delvin E, Montoudis A, Geneviève JB, Nadia M, et al. Localization, function and regulation of the two intestinal fatty acid-binding protein types. *Histochem Cell Biol*. 2009;132(3):351–67.

Lignot JH, Helmstetter C, Secor SM. Postprandial morphological response of the intestinal epithelium of the Burmese python (*Python molurus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2005;141(3):280–91.

Lionarons DA, Boyler JL, Cai SY. Evolution of substrate specificity for the bile salt transporter ASBT (SLC10A2). *J Lipid Res*. 2012;53(8):1535-42.

Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese Jr RV, Ory DS, Schaffer JE. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(6):3077-82.

Luppa H. Histology of the digestive tract. In: Gans C. editor. *Biology of the Reptilia*. New York: Academic Press; 1977. p. 225-313.

Maciel FR, Logato PVR, Fialho ET, Freitas RTF, Aleixo VM. Coeficiente de digestibilidade aparente de cinco fontes energéticas para o jacaré do pantanal (*Caiman yacare*, Daudin, 1802). *Ciênc Agrotec*. 2003;27(3):675-80.

Mak HY. Lipid droplets as fat storage organelles in *Caenorhabditis elegans*: Thematic review series: Lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man. *J Lipid Res*. 2012;53(1):28-33.

Man Z, Yishu W, Peng Y, Xiaobing W. Crocodilian phylogeny inferred from twelve mitochondrial protein-coding genes, with new complete mitochondrial genomic sequences for *Crocodylus acutus* and *Crocodylus novaeguineae*. *Mol Phylogenet Evol*. 2011;60(1):62-7.

Mansbach CM, Dowell R. Effect of increasing lipid loads on the ability of the endoplasmic reticulum to transport lipid to the Golgi. *J Lipid Res*. 2000;41(4):605-12.

Mansbach II CM, Gorelick F. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II - Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;293(4):G645-50.

Martino RC, Cyrino JEP, Portz L, Trugo LC. Performance and fatty acid composition of surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) fed diets with animal and plant lipids. *Aquaculture*. 2002;209(1-4):233-46.

Mateo MR, Roberts ED, Enright FM. Inflammation induced by subcutaneous turpentine inoculation of young american alligators (*Alligator mississippiensis*). *Am J Vet Res*. 1984;45(9):1870-5.

Mawe GM, Hoffman JM. Serotonin signalling in the gut - functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(8):473-86.

McCauley WJ. The gross anatomy of the lymphatics system of *Alligator mississippiensis*. *Am J Anat*. 1956;99(2):189-209.

McMenamin PG e Polla E. 2013. mast cells are present in the choroid of the normal eye in most vertebrate classes. *Veterinary Ophthalmology*. 16(1):73-78.

McNeil, NI, Cummings JH, James WPT. Short chain fatty acid absorption by the human large intestine. *Gut*. 1978;19(9):819-22.

Menoyo D, López-Bote CJ, Obach A, Bautista JM. Effect of dietary fish oil substitution with linseed oil on the performance, tissue fatty acid profile, metabolism, and oxidative stability of atlantic salmon. *J Anim Sci*. 2005;83(12):2853-62.

Miller MR, Nichols PD, Carter CG. n-3 oil sources for use in aquaculture - alternatives to the unsustainable harvest of wild fish. *Nutr Res Rev*. 2008;21(2):85-96.

Montali RJ. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *J Comp Pathol*. 1988;99(1).

Montero D, Kalinowski T, Obach A, Robaina L, Tort L, Caballero MJ, Izquierdo MS. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture*. 2003;225(1-4):353-370.

Moura WL, Oliveira LW, Egami MI. Aspectos ultraestruturales de trombocitos, eosinofilos y heterofilos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodilia). 1997;15(2):201-8.

Moura WL, Matsushima ER, Oliveira LW, Egami MI. Aspectos morfológicos e citoquímicos dos glóbulos sangüíneos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodilia). *Braz J Vet Res Anim Sci*. 1999;36(1).

Mourão G, Coutinho M, Mauro R, Campos Z, Tomás W, Magnusson W. Aerial surveys of caiman, marsh deer, and pampas deer in the Pantanal Wetland of Brazil. *Biol Conserv*. 2000;92(2):175-83.

Mourente G, Good JE, Bell JG. Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oil in diets for european sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E2 and F2alpha, immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquacult Nutr.* 2005; 11(1):25-40.

Mourente G, Good JE, Thompson KD, Bell JG. Effects of partial substitution of dietary fish oil with blends of vegetable oils, on blood leucocyte fatty acid compositions, immune function and histology in european sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Br J Nutr.* 2007;98(4):770-79.

Mowat AM, Bain CC. Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *J Innate Immunol.* 2011;3(6):550-64.

Mullaney B, Ashrafi K. Regulation of *C. elegans* fat uptake and storage by acyl-CoA synthase-3 is dependent on NR5A family nuclear hormone receptor nhr-25. *Cell Metab.* 2005;12(4):398-410.

Nachi AM, Hernandez-Blazquez FJ, Barbieri RL, Leite RG, Ferri S, MT Phan. Intestinal histology of a detritivorous (iliophagous) fish *Prochilodus scrofa* (characiformes, prochilodontidae). *Ann des Sci Nat - Zool et Biol Animale.* 1998;19(2):81-8.

Noaillac-Depeyre J, Gas N. Fat absorption by the enterocytes of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cell Tissue Res.* 1974;155(3):353-65.

Noaillac-Depeyre J, Gas N. Electron microscopic study on gut epithelium of the tench (*Tinca tinca* L.) with respect to its absorptive functions. *Tissue & Cell.* 1976;8(3):511-30.

Noaillac-Depeyre J, Gas N. Structure and function of intestinal epithelial cells in the perch (*Perca fluviatus* L.) *Anat Rec.* 1979;195(4):621-7.

Nogueira-Filho SLG, Nogueira SSC. Produção e comercialização da carne e de subprodutos na região sudeste do Brasil. *Rev Econ do Nordeste.* 2000;31(2):188-95.

Noyan A, Lossow WJ, Brot N, Chaikoff IL. Pathway and form of absorption of palmitic acid in the chicken. *J Lipid Res.* 1964;5:538-41.

Ockner RK, Pittman JP, Yager JL. Differences in the intestinal absorption of saturated and unsaturated long chain fatty acids. *Gastroenterology.* 1972;62(5):981-92.

Oliva-Teles A. Nutrition and health of aquaculture fish. *J Fish Dis.* 2012;35(2):83-108.

Oliveira LW, Moura WL, Matushima ER, Egami MI. Características citoquímicas morfológicas y ultraestructurales de eosinófilos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodilia). *Rev Chil Anat.* 1998;16(2):245-54.

Olsen RE, Henderson RJ, Ringo E. The digestion and selective absorption of dietary fatty acids in arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Aquacult Nutr.* 1998;4(1):13-21.

Olsen RE, Myklebust R, Kaino T, Ringo E. Lipid digestibility and ultrastructural changes in the enterocytes of Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) fed linseed oil and soybean lecithin. *Fish Physiol Biochem*. 1999;21(1):35-44.

Olsen RE, Myklebust R, Ringø E, Mayhew TM. The influences of dietary linseed oil and saturated fatty acids on caecal enterocytes in Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.): a quantitative ultrastructural study. *Fish Physiol Biochem*. 2000;22(3):207–16.

Olsvik PA, Torstensen BE, Berntssen MHG. Effects of complete replacement of fish oil with plant oil on gastrointestinal cell death, proliferation and transcription of eight genes' encoding proteins responding to cellular stress in atlantic salmon *Salmo salar* L. *J Fish Biol*. 2007;71(2):550-68.

Osthoff G, Hugo A, Bouwman H, Buss P, Govender D, Joubert CC, et al. Comparison of the lipid properties of captive, healthy wild, and pansteatitis-affected wild Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2010;155(1):64–9.

Ottaviani G, Tazzi A. The lymphatic system. In: Gans C. editor. *Biology of Reptilia*. New York: Academic Press; 1977. p. 315-462.

Palacios A e Catalá, a. The palmitic acid binding properties of cytosolic proteins located in the villus and crypt zones of bovine intestinal mucosa. *Vet Res Comm*. 1991;15(6):437-442.

Park JH, Rhee PL, Kim HS, Lee JH, Kim, YH, Kim JJ, Rhee JC. Mucosal mast cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2006;21(1):71-8.

Pickova J e Morkore T. 2007. Alternate oils in fish feeds. *Eur J Lipid Sci Technol*. 109(3):256-263.

Poirier H, Degrace P, Niot I, Bernard A, Besnard P. Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP). *Eur J Biochem*. 1996;238(2):368–73.

Pol A, Gross SP, Parton RG. Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins and sites. *J Cell Biol*. 2014;204(5):635–46.

Ramírez M, Amate L, Gil A. Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Hum Dev*. 2001;65:S95-S101.

Reese AM. The histology of the enteron of the Florida alligator. *Anat Rec*. 1913;7(4):105-29.

Reite OB. The mast cell nature of granule cells in the digestive tract of the pike, *Esox lucius*: similarity to mammalian mucosal mast cells and globule leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology*. 1996;6(5):363-69.

Reite OB, Evensen O. Inflammatory cells of teleostean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish Shellfish Immunol*. 2006;20(2):192–208.

Renner R. Site of fat absorption in the chick. *Poultry Science*. 1965;44(3):861-64.

Rodrigues HG, Vinolo MAR, Magdalon J, Fujiwara H, Cavalcanti DMH, Farsky SHP, et al. Dietary free oleic and linoleic acid enhances neutrophil function and modulates the inflammatory response in rats. *Lipids*. 2010;45(9):809–19.

Rodríguez MA, Clavijo LA, López O, Gerardino A, Ceballos C, Arboleda JJ, Silva M, Guerrero PH. Avances em la nutrición de *Caiman crocodilus*. In: Working Meeting of the Crocodile Specialist Group, 13., Santa Fé, 1996. Proceedings. Gland: IUCN - The World Conservation Union, 1996. p.347-54.

Romão M, Santos ALQ, Lima FC, De Simone SS, Silva JMM, Hirano LQ, Vieira LG, Pinto JGS. Anatomical and Topographical Description of the Digestive System of *Caiman crocodilus* (Linnaeus 1758), *Melanosuchus niger* (Spix 1825) and *Paleosuchus palpebrosus* (Cuvier 1807). *Int J Morphol*. 2011;29(1):94-9.

Rosenfeld G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Günwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan*. 1947;20:329-34.

Rösch R, Segner H. Development of dry food for larvae of *Coregonus lavaretus* L. 1. Growth, food digestion and fat absorption. *Aquaculture*. 1990;91(1-2):101-15.

Sakr SW, Haourigui M, Paul JL, Soni T, Vachter D, Cirard-Globa A. Fatty acid composition of an oral fat load affects chylomicron size in human subjects. *Br J Nutr*. 1997;77(1):19-31.

Santos SA, Pinheiro MS, Silva RA. Efeitos de diferentes dietas naturais no desenvolvimento inicial de *Caiman crocodilus yacare* (Crocodylia Alligatoridae). *Rev Soc Bras Zoot*. 1993;22(03):406-12.

Santos SA, Pinheiro MS, Silva RA, Fernandez GH. Composição química corporal de *Caiman crocodilus yacare*. *Rev Bras Biol*. 1994;54(4):611-16.

Santos SA, Nogueira MS, Pinheiro MS, Campos Z, Magnusson WE, Mourão GM. Diets of caiman *crocodilus yacare* from different habitats in the Brazilian Pantanal. *Herpetological J*. 1996;6:111-17.

Santos SA. Dieta e nutrição de crocodilianos. Corumbá: EMBAPA-CPAP, 1997. 59p. (Embrapa-CPAP. Documentos, 20).

Sarasquete MC, Polo A, Yúfera M. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture*. 1995;130(1):79-92.

Sargent JR, Tacon AGJ. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proc Nutr Soc*. 1999;58(2):377-83.

Scudamore CL, Jepson MA, Hirst BH, Miller HR. The rat mucosal mast cell chymase, RMCP-II, alters epithelial cell monolayer permeability in association with altered distribution of the tight junction proteins ZO-1 and occludin. *Eur J Cell Biol*. 1998;75(4):321-30.

Secor SM. Digestive physiology of the burmese python: broad regulation of integrated performance. *J Exp Biol.* 2008;211(24):3767-74.

Sener E, Yildiz M, Savas E. Effect of vegetable protein and oil supplementation on growth performance and body composition of russian sturgeon juveniles (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833) at low temperatures. *Turk J Fish Aquat Sci.* 2005;6:23-7.

Sheldon Jr WM, Blazer VS. Influence of dietary lipid and temperature on bactericidal activity of channel catfish macrophages. *J Aquatic Animal Health.* 1991;3(2):87-93.

Shields HM, Bates ML, Bass NM, Best CJ, Alpers DH, Ockner RK. Light microscopic immunocytochemical localization of hepatic and intestinal types of fatty acid-binding proteins in rat small intestine. *J Lipid Res.* 1986;27(5):549-57.

Shim J, Moulson CL, Newberry EP, Lin MH, Xie Y, Kennedy SM, Miner JH, Davidson NO. Fatty acid transport protein 4 is dispensable for intestinal lipid absorption in mice. *J Lipid Res.* 2009;50(3):491-500.

Singh A, Balint JA, Edmonds RH, Rodgers JB. Adaptive changes of the rat small intestine in response to a high fat diet. *Biochim Biophys Acta.* 1972;260(4):708-15.

Sire MF, Lutton C, Vernier JM. New views on intestinal absorption of lipids in teleostean fishes: an ultrastructural and biochemical study in the rainbow trout. *J Lipid Res* 1981;22(1):81–94.

Sklan D. Digestion and absorption of lipids in chicks fed triglycerides or free fatty acids: synthesis of monoglycerides in the intestine. *Poult Sci.* 1979;58(4):885-9.

Sklan D, Geva A, Budowski P, Hurwitz S, Centre V, Dagan B. Intestinal absorption and plasma transport of lipids in chicks and rats. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.* 1984;78(3):507–10.

Sklan D, Meir D, Noy Y. Chick small intestine brush border contains lipase and phospholipase activity. *Br Poult Sci.* 1999;40(3):392-6.

Song W, Shen DY, Kang JH, Li SS, Zhan HW, Shi Y, Xiong YX, Liang G, Chen QX. Apoptosis of human cholangiocarcinoma cells induced by ESC-3 from *Crocodylus siamensis*. *World J Gastroenterol.* 2012;18(7):704-11.

St John JA, Braun EL, Isberg SR, Miles LG, Chong AY, Gongora J, Dalzell P, Moran C, Bed'Hom B, Abzhanov A, et al. Sequencing three crocodilian genomes to illuminate the evolution of archosaurs and amniotes. *Genome Biol.* 2012;13(1):415.

Stacy NI, Alleman AR, Sayler KA. Diagnostic hematology of reptiles. *Clin Lab Med.* 2011;31(1):87–108.

Staton MA, Edwards HM, Brisbin Jr IL, Joanen T, McNease L. Essential fatty acid nutrition of the american alligator (*Alligator mississippiensis*). *J Nut.* 1990a;120(7):674-85.

Staton MA, Edwards Jr HM, Brisbin Jr IL, Joanen T, McNease L. Protein and energy relationships in the diet of the american alligator (*Alligator mississippiensis*). J Nut. 1990b;120(7):775-85.

Staton MA, Edwards HM, Brisbin Jr IL, McNease LE, Joanen T. Dietary energy sources for the american alligator, *Alligator mississippiensis* (Daudin). Aquaculture. 1990c;89(3-4):245-61.

Staton MA, Edwards Jr HM, Brisbin Jr IL, Joanen T, McNease L. The influence of environmental temperature and dietary factors on utilization of dietary energy and protein in purified diets by alligators, *Alligator mississippiensis* (Daudin). Aquaculture. 1992;107(4):369-81.

Starck JM, Beese K. Structural flexibility of the intestine of burmese python in response to feeding. J Exp Biol. 2001;204(2):325–35.

Starck JM, Beese K. Structural flexibility of the small intestine and liver of garter snakes in response to feeding and fasting. J Exp Biol. 2002;205(10):1377–88.

Starck JM, Hasan G, Rahmaan A. phenotypic flexibility of structure and function of the digestive system of Japanese quail. J Exp Biol. 2003;206(11):1887–97.

Starck JM, Cruz-Neto AP, Abe AS. Physiological and morphological responses to feeding in broad-nosed caiman (*Caiman latirostris*). J Exp Biol. 2007;210(12):2033–45.

Stevens L. Lipids and their metabolism. In: Stevens L. Avian biochemistry and molecular biology. Cambridge: Cambridge University Press; 2004. p. 46-64.

Storch J, Thumser AEA. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. Bioch Biophys Acta. 2000;1486:28-44.

Sukhotnik I, Gork AS, Chen M, Drongowski RA, Coran AG, Harmon CM. Effect of a high fat diet on lipid absorption and fatty acid transport in a rat model of short bowel syndrome. Pediatr Surg Int. 2003;19(5):385-90.

Suzuki T, Mochizuki K, Goda T. Localized expression of genes related to carbohydrate and lipid absorption along the crypt-villus axis of rat jejunum. Biochim Biophys Acta. 2009;1790(12):1624-35.

Tanaka M. Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae. IV - Changes in the epithelium related to fat absorption in the anteromedian part of the intestine after feeding. Jap J Ichthyol. 1972;19(1):15-25.

Thompson KD, Tatner MF, Henderson RJ. Effects of dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acid ratio on the immune response of atlantic salmon, *Salmo salar* L. Aquacult Nutr. 1996;2(1):21–31.

Tocher DR. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. Rev Fish Sci. 2003;11(2):107-84.

Townsend KL, Lorenzi MM, Widmaier EP. High-fat diet-induced changes in body mass and hypothalamic gene expression in wild-type and leptin-deficient mice. *Endocrine*. 2008;33(2):176-88.

Tso P, Balint JA, Rodgers JB. Effect of hydrophobic surfactant (Pluronic L-81) on lymphatic lipid transport in the rat. *Am J Physiol*. 1980;239(5):G348-53.

Tso P, Nauli A, Lo CM. Enterocyte fatty acid uptake and intestinal fatty acid-binding protein. *Biochem Soc Trans*. 2004;32(1):75-8.

Turan A, Mahmood A. The profile of antioxidant systems and lipid peroxidation across the crypt-villus axis in rat intestine. *Dig Dis Sci*. 2007;52(8):1840-4.

Úran PA, Gonçalves AA, Tiverne-Thiele JJ, Schrama JW, Verreth JA, Rombout JH. Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol*. 2008;25(6):751-60.

Úran PA, Schrama JW, Rombout JH, Taverne-Thiele JJ, Obach A, Koppe W, Verreth JA. Time-related changes of the intestinal morphology of atlantic salmon, *Salmo salar* L., at two different soybean meal inclusion levels. *J Fish Dis*. 2009;32(9):733-44.

Van der Walt M, Huchzermeyer FW, Steyn HC. Salmonella isolated from crocodiles and other reptiles during the period 1985-1994 in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res*. 1997;64(4):277-83.

Verdade LM. O programa experimental de criação do Jacaré-de-Papo-Amarelo (*Caiman latirostris*) da ESALQ/USP: histórico e perspectivas. *Anais da Reunião anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. 2001;(38):559-64. [Reunião anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia; 2001; Piracicaba].

Verdade LM. A exploração da fauna silvestre no Brasil: jacarés, sistemas e recursos humanos. *Biota Neotropica*. 2004;4(2):5-17.

Vicente-Neto J, Bressan MC, Faria PB, Vieira JO, Cardoso MG, Glória MBA, Gama LT. Fatty acid profiles in meat from Caiman yacare (*Caiman crocodilus yacare*) raised in the wild or in captivity. *Meat Sci*. 2010;85(4):752-8.

Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Staton C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr Rev*. 2010;68(5):280-9.

Wallach JD, Hoessle C. Steatitis in captive crocodilians. *J Am Vet Med Assoc*. 1968;153(7):845-7.

Wanstall ST, Robotham PWJ, Thomas JS. Pathological changes induced by *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) in the gut of rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson. *Z Parasitenkd*. 1986;72(1):105-114.

Weisiger RA, Zucker SD. Transfer of fatty acids between intracellular membranes: roles of soluble binding proteins, distance, and time. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;282(1):G105-15.

Wilde PJ, Chu BS. Interfacial & colloidal of lipid digestion. *Adv Colloid Interface Sci.* 2011;165(1):14-22.

Wilfling F, Haas JT, Walther TC, Jr RV. Lipid droplet biogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2014;29(C):39-45.

Xu G, Elsey RM, Lance VA, Javors B, Chen TS, Salen G, Tint GS. A study on biliary ductal system and bile fistula in the american alligator, *Alligator mississippiensis*. *J Exp Zool.* 1997;279(6):554-561.

Yamada J, Campos VJ, Kitamura N, Pacheco AC, Yamashita T, Yanaihara N. An immunohistochemical study of the endocrine cells in the gastrointestinal mucosa of the Caiman latirostris. *Arch Histol Jpn.* 1987;50(2):229-41.

Yuen BB, Wong CK, Woo NY, Au DW. Induction and recovery of morphofunctional changes in the intestine of juvenile carnivorous fish (*Epinephelus coioides*) upon exposure to foodborne benzo[a]pyrene. *Aquat Toxicol.* 2007;82(3):181-94.

Zayas AMA, Rodríguez HA, Galoppo GH, Stoker C, Durando M, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. Hematology and blood biochemistry of young healthy broad-snouted caimans (*Caiman latirostris*). *J Herpet.* 2011;45(4):516–24.

APÊNDICE – Análises estatísticas

Tabela A1: Médias e desvios-padrão das lesões ocorrentes no epitélio de revestimento da mucosa intestinal após tratamento com óleo de soja.

	Duod. Cont.	Jej. Cran. Cont.	Jej. Caud. Cont.
Number of values	2	2	2
Mean (%)	17,50	0,0	0,0
Std. Deviation	24,75	0,0	0,0

	Duod. óleo 24h	Jej. Cran. óleo 24h	Jej. Caud. óleo 24h
Number of values	4	4	4
Mean (%)	27,39	0,0	3,150
Std. Deviation	23,08	0,0	2,572

	Duod. óleo 48h	Jej. Cran. óleo 48h	Jej. Caud. óleo 48h
Number of values	4	4	4
Mean (%)	34,95	1,563	1,830
Std. Deviation	27,52	3,125	3,660

	Duod. óleo 72h	Jej. Cran. óleo 72h	Jej. Caud. óleo 72h
Number of values	4	4	4
Mean (%)	2,650	1,315	13,36
Std. Deviation	3,157	2,630	24,48

Tabela A2: Teste *post hoc* de significância estatística da quantificação das lesões intestinais após absorção de óleo de soja.

Kruskal-Wallis test

P value	0,0493
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	12
Kruskal-Wallis statistic	19,73

Dunn's Multiple Comparison Test:

Diferentes tratamentos e segmento intestinal semelhante

	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
Duod. Cont. vs Duod. óleo 24h	-6,125	No	ns
Duod. Cont. vs Duod. óleo 48h	-12,75	No	ns
Duod. Cont. vs Duod. óleo 72h	4,25	No	ns
Duod. óleo 24h vs Duod. óleo 48h	-6,625	No	ns
Duod. óleo 24h vs Duod. óleo 72h	10,38	No	ns
Duod. óleo 48h vs Duod. óleo 72h	17	No	ns

Jej. Cran. Cont. vs Jej. Cran. óleo 24h	0	No	ns
Jej. Cran. Cont. vs Jej. Cran. óleo 48h	-4,625	No	ns
Jej. Cran. Cont. vs Jej. Cran. óleo 72h	-4,125	No	ns
Jej. Cran. óleo 24h vs Jej. Cran. óleo 48h	-4,625	No	ns
Jej. Cran. óleo 24h vs Jej. Cran. óleo 72h	-4,125	No	ns
Jej. Cran. óleo 48h vs Jej. Cran. óleo 72h	0,5	No	ns

Jej. Caud. Cont. vs Jej. Caud. óleo 24h	-11,38	No	ns
Jej. Caud. Cont. vs Jej. Caud. óleo 48h	-5,125	No	ns
Jej. Caud. Cont. vs Jej. Caud. óleo 72h	-10	No	ns
Jej. Caud. óleo 24h vs Jej. Caud. óleo 48h	6,25	No	ns
Jej. Caud. óleo 24h vs Jej. Caud. óleo 72h	1,375	No	ns
Jej. Caud. óleo 48h vs Jej. Caud. óleo 72h	-4,875	No	ns

Segmento intestinal diferente e tratamento semelhante

	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
Duod. Cont. vs Jej. Cran. Cont.	12,75	No	ns
Duod. Cont. vs Jej. Caud. Cont.	12,75	No	ns
Jej. Cran. Cont. vs Jej. Caud. Cont.	0	No	ns

Duod. óleo 24h vs Jej. Cran. óleo 24h	18,88	No	ns
Duod. óleo 24h vs Jej. Caud. óleo 24h	7,5	No	ns
Jej. Cran. óleo 24h vs Jej. Caud. óleo 24h	-11,38	No	ns

Duod. óleo 48h vs Jej. Cran. óleo 48h	20,88	No	ns
Duod. óleo 48h vs Jej. Caud. óleo 48h	20,38	No	ns
Jej. Cran. óleo 48h vs Jej. Caud. óleo 48h	-0,5	No	ns

Duod. óleo 72h vs Jej. Cran. óleo 72h	4,375	No	ns
Duod. óleo 72h vs Jej. Caud. óleo 72h	-1,5	No	ns
Jej. Cran. óleo 72h vs Jej. Caud. óleo 72h	-5,875	No	ns

Tabela A3: Médias e desvios-padrão da proporção de enterócitos PCNA positivos após absorção de óleo de soja.

	Duod. óleo 24h	Duod. Cont.
Number of values	10	10
Mean (%)	20,96	15,53
Std. Deviation	11,42	7,380
KS normality test		
KS distance	0,1803	0,1696
P value	> 0.10	> 0.10
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns

	Jej. Caud. óleo 24h	Jej. Cont.
Number of values	10	10
Mean (%)	26,29	27,99
Std. Deviation	8,525	11,74
KS normality test		
KS distance	0,1772	0,2398
P value	> 0.10	> 0.10
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns

	I.G. óleo 24h	I.G. Cont.
Number of values	10	5
Mean (%)	46,50	32,38
Std. Deviation	18,22	8,714
KS normality test		
KS distance	0,1838	0,1665
P value	> 0.10	> 0.10
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns

Tabela A4: Teste *post hoc* de significância estatística para as diferenças das proporções de enterócitos PCNA positivos após absorção de óleo de soja.

One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	8,009				
R squared	0,4497				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	9,294				
P value	0,0979				
P value summary	ns				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
ANOVA Table					
	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	5597	5	1119		
Residual (within columns)	6849	49	139,8		
Total	12450	54			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Duod. óleo 24h vs Duod. Cont.	5,428	1,027	No	ns	-7.678 to 18.53
Jej. Caud. óleo 24h vs Jej. Caud. Cont.	-1,698	0,3211	No	ns	-14.80 to 11.41
I.G. óleo 24h vs I.G. Cont.	14,12	2,180	No	ns	-1.934 to 30.17

ANEXO (continua) – Autorização para utilização de animais silvestres em atividades com finalidade científica

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 30509-1	Data da Emissão: 30/08/2011 16:18
Dados do titular	
Nome: Ricardo Moraes Borges	CPF: 307.677.838-24
Título do Projeto: Absorção de lipídeos e proteínas pelo intestino de jacaré-do-pantanal Caiman yacare (Daudin, 1802)	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de tecidos e envio para laboratório de histologia na USP e na UNEMAT	09/2011	12/2014
De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.			

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CACERES	MT	COOCRIJAPAN	Fora de UC
2	CACERES	MT	UNEMAT campus Caceres	Fora de UC
3	SAO PAULO	SP	ICB/USP	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Caiman yacare

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Répteis)	Animal morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão
---	-------------------------------	---

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SAO PAULO	
2	UNEMAT Universidade do Estado de Mato Grosso	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 55574869

Página 1/2

ANEXO (continuação) – Autorização para utilização de animais silvestres em atividades com finalidade científica

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 30509-1	Data da Emissão: 30/08/2011 16:18
Dados do titular	
Nome: Ricardo Moraes Borges	CPF: 307.677.838-24
Título do Projeto: Absorção de lipídeos e proteínas pelo intestino de jacaré-do-pantanal <i>Caiman yacare</i> (Daudin, 1802)	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 55574869

Página 2/2