

# RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 14/12/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Câmpus de São José do Rio Preto

Raquel Arantes Megid

**Quercetina como potencial bloqueador na progressão da fibrose hepática em ratos com esteatose hepática não alcoólica (EHNA): identificação de biomarcadores metabólicos terapêuticos e profiláticos**

São José do Rio Preto  
2021

Raquel Arantes Megid

**Quercetina como potencial bloqueador na progressão da fibrose hepática em ratos com esteatose hepática não alcoólica (EHNA): identificação de biomarcadores metabólicos terapêuticos e profiláticos**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Processo nº 2019/09253-5  
CNPq – Processo nº 132017/2019-9

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fatima Pereira de Souza  
Coorientador: Dr. Ícaro Putinhon Caruso

São José do Rio Preto  
2021

M497q	<p>Megid, Raquel Arantes</p> <p>Quercetina como potencial bloqueador na progressão da fibrose hepática em ratos com esteatose hepática não alcoólica (EHNA) : identificação de biomarcadores metabólicos terapêuticos e profiláticos / Raquel Arantes Megid. -- São José do Rio Preto, 2021</p> <p>68 f. : il., tabs., fotos</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto</p> <p>Orientadora: Fatima Pereira de Souza</p> <p>Coorientador: Ícaro Putinhon Caruso</p> <p>1. Biologia molecular. 2. Esteatose hepática. 3. Quercetina. 4. Metabolismo. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Raquel Arantes Megid

**Quercetina como potencial bloqueador na progressão da fibrose hepática em ratos com esteatose hepática não alcoólica (EHNA): identificação de biomarcadores metabólicos terapêuticos e profiláticos**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Processo nº 2019/09253-5  
CNPq – Processo nº 132017/2019-9

**Comissão Examinadora**

Profª Drª Fatima Pareira de Souza  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto  
Orientadora

Prof. Dr. Luiz Gustavo Araújo Gardinassi  
Universidade Federal de Goiás  
2º Examinador

Profª Drª Gislane Lelis Vilela de Oliveira  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto  
3ª Examinadora

São José do Rio Preto  
14 de junho de 2021

À minha avó Maria  
e minhas eternas saudades,  
vó Alice, vô Aníbal e vô Camilo.

## AGRADECIMENTOS

À prof. Dr<sup>a</sup> Fatima, que esteve comigo na formulação inicial da ideia do projeto e durante todas as suas fases de desenvolvimento. Por me oferecer o apoio necessário e contornar comigo os desvios dessa trajetória, buscando por soluções várias vezes ocultas. Obrigada professora, pela confiança que coloca em mim, que sempre me motiva a seguir em frente.

Ao Dr. Ícaro pela constante disposição em ajudar e atenção dada aos mínimos detalhes na pesquisa. Obrigada pelo bom convívio e pela preocupação no desenvolver da pesquisa.

Aos integrantes da comissão examinadora deste Exame de Defesa Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gislane Lelis Vilela de Oliveira, Prof. Dr. Luiz Gustavo Araujo Gardinassi e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alessandra Vidotto. Obrigada a todos vocês por aceitarem meu convite!

À Artemiza e à Maria Fernanda por caminharem comigo em trabalhos na mesma linha de pesquisa e compartilharem de mesmos anseios, preocupações e conquistas. A confiança que criamos me fortaleceu todos os dias em nossas atribuladas rotinas.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular e do Centro Multiusuário de Inovações em Biologia (CMIB), pela constante troca de conhecimento e dedicação de todos que me auxiliaram durante o desenvolvimento do projeto. Em especial, agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Fossey, à Giovana e à Jéssica que me deram apoio e incentivo para além das esferas do trabalho.

À prof. Dr<sup>a</sup> Patrícia que desde o primeiro contato me foi imensamente receptiva e ofereceu toda a infraestrutura necessária à metodologia deste projeto. Obrigada professora, por permitir que o desenvolvimento prático da pesquisa fosse possível.

Ao prof. Dr. Sebastião pelo agradável convívio e extrema dedicação e atenção com todos os alunos do Instituto. Obrigada por ensinar a cultivar a leveza no trabalho.

Ao Luís, eterno “Lois”, pelo grande apoio que me forneceu durante todo o período de experimentação com os animais, por me ensinar a respeito de técnicas e práticas em biotérios, pela constante dedicação em auxiliar a todos e por cada boa conversa.

À Viviane, que me acolheu como uma irmã e me fortaleceu a cada dia. Obrigada, Vivi, por cada um de seus ensinamentos, pelo enorme incentivo que me deu e me dá, pela confiança e pela amizade que eu levo comigo para a vida.

Ao Gustavo pela ajuda essencial na coleta e processamento das amostras biológicas dos animais, por toda a atenção e pelo carinho em ajudar.

Ao Thalles e à Simone por quem sou imensamente grata. Obrigada pelo convívio diário no biotério e por cada momento que me auxiliaram em necessidades discretas e grandes. Agradeço por cada um dos ensinamentos, pela dedicação em me acompanharem nas fases

experimentais do projeto, por estarem comigo nos momentos mais difíceis e pelas boas risadas que guardo com carinho.

À equipe do Biotério de Manutenção e Experimentação de Roedores do IBILCE pela agradável convivência e rede de suporte formada. Obrigada a todos pela boa recepção, pelo zelo e respeito pelos animais em experimento e pela ajuda coletiva em questões cotidianas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento dos meus primeiros meses de Mestrado, sob processo nº 132017/2019-9 e incentivo à minha permanência no meio acadêmico da universidade pública.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 2019/09253-5. Agradeço muito pelo reconhecimento do meu potencial como pesquisadora e pelo incentivo financeiro que torna possível o desenvolvimento experimental do projeto pelo auxílio de reserva técnica.

Aos funcionários da Seção Técnica de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (STAEPE) pela constante atenção e orientação em questões burocráticas requeridas pela FAPESP.

Ao Programa de Pós Graduação em Biofísica Molecular, em especial ao antigo coordenador do programa Prof. Dr. Sidney, por cada um dos esforços em atender às necessidades de todos os pós graduandos, pelo incentivo de aproximação entre professores, funcionários e alunos e pela carinhosa atenção com todas as linhas de pesquisa.

Aos funcionários da Seção de Pós Graduação (SPG) pelo atendimento sempre ágil, versátil e gentil. Obrigada por cada orientação e apoio que me deram!

A todos os meus professores de graduação e pós graduação, que contribuíram com seus ensinamentos teóricos e de vida à minha formação pessoal e profissional. Obrigada por fazerem da minha história mais rica em conhecimento e pensamento crítico.

Ao IBILCE por representar minha casa de graduação e pós graduação. Sou eternamente grata por todas as vivências e histórias que este lugar, que é para mim tão aconchegante e já começa a ser nostálgico, me proporcionou.

A todos os funcionários do IBILCE, que trabalham diariamente permitindo que nosso trabalho na pesquisa seja realizado em boas condições. O trabalho de vocês é fundamental para o bom funcionamento de todas as partes do Instituto, obrigada!

Às psicólogas Adriana e Carolina por me acompanharem e representarem uma base emocional potente e intensa. Obrigada por me ajudarem a entender e lidar com cada adversidade e estarem comigo. A todos que acreditaram no meu potencial em alcançar meus objetivos.

Aos meus queridos amigos parceiros de vida acadêmica e de vida Mayk, William, André e Stefanie, por segurarmos as mãos juntos durante toda nossa jornada no Mestrado. Obrigada

por cada demonstração de carinho, cada choro e desabafo, cada bate papo com café, cada comemoração de conquistas! É lindo chegar longe junto de vocês.

Ao Felipe, meu sincero companheiro e amigo em todos os momentos. Obrigada por cultivar comigo muito carinho, apoio, incentivo, força, descanso, agitação por tantos anos. Obrigada por me ajudar tanto nesta trajetória que encerro logo e em todas as outras.

À Ana Carolina, que me desperta toda a coragem que eu preciso ter. Obrigada por estar sempre muito presente na minha vida e ser cuidado, carinho, conforto, força, motivação. Você me inspira todos os dias pela mulher cientista e guerreira que é!

À Bruna, minha eterna amiga e irmã. Obrigada por compartilhar comigo cada detalhe da sua vida e por estar sempre presente na minha! Agradeço por cada um dos momentos com você e por me afirmar que eu sempre posso ir além.

À Gabriela, Jaislan e Lara pela amizade linda e tão forte que a graduação me trouxe. Obrigada por toda a confiança, o carinho, o apoio, a leveza e a certeza de que posso me sustentar com a ajuda de vocês. Obrigada por sempre estarem ao meu lado.

À Letícia, que compartilhou comigo tanta confiança, abraços, risadas, incertezas, inspirações, satisfações e insatisfações pelos dias de pandemia. Obrigada por representar tanto para mim. À Amanda, que ilumina os lugares com sua chegada por seu astral tão bonito. Obrigada por deixar meus dias mais leves e ser sempre meu apoio! À Thaís, por ser presente, mesmo distante. Obrigada por todo o carinho e aconchego em me acolher desde sempre. À Luana, doce companhia que se tornou enorme na minha vida. Obrigada por ser meu ponto de apoio, confiança, respeito, paz e amor.

À minha avó Maria e minhas eternas saudades, vô Aníbal e vô Camilo. Obrigada por tanto! Os senhores representam a base de toda minha vida e é para os senhores que eu dedico este trabalho. Agradeço muito à toda minha família pela certeza de tudo vale a pena com ela.

À minha irmã Ana Clara pela conexão, por todo o carinho, confiança e apoio compartilhados. Obrigada por cada vivência, cada ensinamento, pelo orgulho em te ver voando longe e por sempre me incentivar a buscar a melhor versão de mim.

Ao meu pai Camilo, pelos esforços desmedidos em incentivar minha educação e me dedicar toda sua atenção, carinho e cuidado sempre. Obrigada por me garantir as melhores oportunidades todos os dias e ser meu melhor conselheiro.

À minha mãe Vânia, por ser a mulher que eu me espelho e me norteio. Obrigada pela confiança e por sempre incentivar meu interesse pelos estudos e pela pesquisa. Obrigada por ser sempre meu maior ponto de apoio, de paz e renovação.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Curie

(PASACHOFF, N., 1996)

## RESUMO

As doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA) descrevem um espectro de doenças crônicas do fígado mais comuns e crescentes do mundo, causadas pelo acúmulo de gordura nas células, condição denominada esteatose hepática. Estima-se que em um quinto dos pacientes ocorra progressão para o estágio mais grave da doença denominada esteato hepatite não alcoólica (EHNA), condição com processo inflamatório, lesão de hepatócitos e potencial desenvolvimento de fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular, situações com potencial necessidade de transplante hepático. A molécula quercetina, flavonoide presente na dieta humana, apresenta grande interesse farmacológico por demonstrar potencial na redução do estresse oxidativo gerado pelo desenvolvimento da doença. O objetivo deste trabalho é avaliar a resposta terapêutica e profilática da quercetina no estabelecimento de EHNA. O experimento foi realizado *in vivo* com ratos *Sprague Dawley* nos grupos **CP – Controle padrão**, que recebeu dieta convencional nutricionalmente adequada à espécie, **CD – Controle hiperlipídico + DEN**, dieta hiperlipídica para indução de EHNA e o composto hepatotóxico dietilnitrosamina (DEN), **CH – Controle hiperlipídico**, apenas dieta hiperlipídica, **TP – Tratamento profilático**, dieta hiperlipídica e simultânea administração de quercetina desde o início do experimento e **TT – Tratamento terapêutico**, dieta hiperlipídica e administração de quercetina após três semanas do início experimental. Foram realizadas avaliação do desempenho clínico animal, análise de cinética enzimática das transaminases ALT e AST, análise macroscópica e microscópica do fígado e identificação metabolômica por ressonância magnética nuclear (RMN). Os animais do **Grupo CP** demonstraram boas condições clínicas de saúde com padrões normais em todas as variáveis analisadas. O **Grupo CD** foi considerado o grupo mais agredido pela ação de DEN em conjunto à indução de EHNA por apresentar conjunto de características clínicas comuns em desarranjos hepáticos como icterícia, colúria e hipocolia, menor ganho de peso corporal e hepático, menor consumo de alimento, maiores níveis séricos de ALT e AST e presença de fibrose e cirrose hepática. Os animais dos **Grupos CH, TP e TT** apresentaram o estabelecimento de EHNA, no entanto, ambos os tratamentos com quercetina se apresentaram eficientes e promissores no sentido de impedir o estabelecimento da fibrose na condição de EHNA, protegendo o órgão contra maior degeneração e perda de funções vitais, aspecto fundamental para garantir possibilidade de reversão da patologia ao quadro clínico saudável do fígado e recuperação das suas funções comprometidas pelo acúmulo de gordura nas células.

**Palavras-chave:** Metabolismo hepático. DHGNA. EHNA. Quercetina.

## ABSTRACT

Nonalcoholic fatty liver diseases (NAFLD) describe a spectrum of the most common and growing chronic liver diseases in the world, caused by accumulating fat in cells, a condition called steatosis. It is estimated that in one-fifth of the patients there is progression to the most severe stage of the disease, called nonalcoholic steatohepatitis (NASH), condition of hepatic steatosis with inflammation process, hepatocyte damage and potential development of fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma, situations of a potential need for liver transplantation. The quercetin molecule, a flavonoid present in the human diet, has a great pharmacological interest because it demonstrates the potential to reduce oxidative stress generated by the development of the disease. This work evaluates the therapeutic and prophylactic response of quercetin in the establishment of NASH. The Sprague-Dawley rats used as an experimental *in vivo* model were organized into five groups: **Standard control (SC)**, that received a conventional diet nutritionally appropriate to the species; **Hyperlipidic control + DEN (HD)**, hyperlipidic diet for EHNA induction and the hepatotoxic compound diethylnitrosamine (DEN); **Hyperlipidic control (HC)**, hyperlipidic diet only; **Prophylactic treatment (PT)**, hyperlipidic diet and simultaneous administration of quercetin since the beginning of the experiment; and **Therapeutic treatment (TT)**, hyperlipidic diet and administration of quercetin three weeks after the experimental start. Were performed animal clinical performance evaluation, enzymatic kinetics analysis of ALT and AST transaminases, macroscopic and microscopic analysis of the liver and metabolomic identification by nuclear magnetic resonance (NMR). The animals in the **SC Group** demonstrated good clinical health conditions with normal standards in all variables analyzed. The **HD Group** was considered the group most attacked by the action of DEN together with the induction of NASH for presenting a set of common clinical characteristics in liver disorders such as jaundice, choluria and hypocholia, less body and liver weight gain, less food consumption, bigger serum ALT and AST levels and presence of fibrosis and liver cirrhosis. The animals in **HC, PT and TT Groups** presented the establishment of NASH, however, both treatments with quercetin were efficient and promising in order to prevent the establishment of fibrosis in the condition of NASH, protecting the organ against further degeneration and loss of vital functions, a fundamental aspect to guarantee the possibility of reversion of the pathology to the healthy clinical condition of the liver and recovery of its functions compromised by the accumulation of fat in the cells.

**Keywords:** Hepatic metabolism. NAFLD. EHNA. Quercetin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Macroanatomia do fígado humano recebendo suprimento sanguíneo duplo, com sangue rico em nutrientes da veia porta e sangue oxigenado da artéria hepática. O sangue sai do fígado pela veia hepática. A vesícula biliar coleta a bile produzida pelos hepatócitos e a libera no trato gastrointestinal através do ducto biliar. **20**
- Figura 2** – Representação da microanatomia do fígado: Cada lóbulo é composto por cordões de hepatócitos dispostos radialmente em relação à veia centrolobular ou central. Na periferia do lóbulo há tecido conjuntivo, no qual se encontra o espaço porta, que contém a tríade portal (arteríola, vênula e ducto biliar). **21**
- Figura 3** – Subconjuntos de células hepáticas. Hepatócitos são dispostos em cordões e produzem a bile, que é coletada pelos dutos biliares na área portal. Células endoteliais revestem os sinusoides e vasos terminais e linfáticos. As setas indicam a direção do fluxo sanguíneo. Células imunes: células estreladas hepáticas (HCS), células de Kupffer (KC), células dendríticas (DC), células T ( $\alpha\beta$ , CD8 e  $\gamma\delta$ ), células MAIT, células linfóides (NK e NKT) e células B. **22**
- Figura 4** – História natural e desenvolvimento de DHGNA e EHNA. Na constante exposição à dieta gordurosa, o órgão inicialmente em condições normais progride em 70 a 93% dos casos para fígado gorduroso não alcoólico (FGNA), primeiro estágio da doença com quadro de esteatose hepática simples. Em 7 a 30% dos casos ocorre progressão para esteato hepatite não alcoólica (EHNA), segundo estágio, em que há esteatose hepática com inflamação e lesão de hepatócitos, podendo ocorrer estabelecimento de fibrose. A partir de então pode ocorrer progressão para EHNA com fibrose simples e avançada e desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC) cirrótico ou não-cirrótico. **27**
- Figura 5** – Estrutura química da quercetina (Q). Dois anéis benzênicos representados por A e B e um anel pirano C. Radicais OH nas posições 3, 5, 7, 3' e 4'. **29**

**Figura 6** – Tratamento aos animais. **A.** Modelo experimental (rato macho da linhagem *Sprague-Dawley*). **B.** Gaiolas de acomodação para roedores, dispostas lado a lado na sala de manutenção e experimentação do Biotério. **C.** Ingestão de água de beber, com fornecimento livre. **D.** Ingestão de ração padrão, com fornecimento diário regulado. **E.** Ração padrão ou convencional (Agromix). **F.** Ração hiperlipídica (Rhoster). 34

**Figura 7** – Gavagem diária de quercetina a 10 mg/kg em carboximetilcelulose 0,5% administrada aos animais do **Grupo TP – Tratamento profilático** e **Grupo TT – Tratamento terapêutico**. 35

**Figura 8** – Procedimento de pesagem corporal individual dos animais. **A.** Pesagem do animal acomodado em base de gaiola pequena. **B.** Disposição e organização do espaço de manuseio dos animais no processo de pesagem. 36

**Figura 9** – Ganho médio de peso total dos animais e desvio padrão nos **Grupos CP, CD, CH, TP** e **TT** durante período experimental. As retas representam peso corporal médio inicial e final dos animais. 43

**Figura 10** – Ganho de peso corporal e consumo médio de ração dos animais representantes dos grupos **CP** (preto), **CD** (azul claro), **CH** (verde), **TP** (azul escuro) e **TT** (vermelho) durante o período experimental. As linhas representam consumo médio em gramas de ração pelos animais, com escala em eixo y à direita e os pontos, o ganho médio de peso corporal em gramas, com escala em eixo y à esquerda. 45

**Figura 11** – Quadro clínico visível dos animais ao final do período experimental. As imagens apresentam: animais representantes dos **Grupos CP (A), CD (B), CH (C), TP (D) e TT (E e F)**. Em **CP** os animais demonstraram boas condições clínicas de saúde evidenciadas pela cor rosa da pele, excretas em padrão normal e pêlos robustos e com brilho. No grupo **CD** foram observados sintomas visíveis mais comuns em desarranjos hepáticos: icterícia, pêlos ralos, arrepiados e opacos. Em **CH** e alguns animais de **TT** os animais apresentaram perda de pêlos e em **TP** e alguns animais de **TT**, apresentaram boas condições clínicas, semelhantes a **CP**. Todos os animais que 48

ingeriram ração hiperlipídica apresentaram colúria, caracterizada pela cor escura da urina e acolia ou hipocolia, fezes de cor esbranquiçada.

**Figura 12** – Peso médio do fígado dos animais representantes dos grupos **CP, CD, CH, TP** e **TT** ao final do período experimental e desvio padrão. \*  $p < 0,05$ . **50**

**Figura 13** – Peso médio e desvio padrão das gorduras epididimal, visceral e retroperitoneal dos animais representantes dos **Grupos CP, CD, CH, TP** e **TT** ao final do período experimental. \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . **51**

**Figura 14** – Valores de atividade enzimática (U/L) de ALT e AST e desvio padrão dos grupos **CP, CD, CH, TP** e **TT**. \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . **55**

**Figura 15** – Macroscopia do fígado dos animais de ambos os grupos experimentais. **56**  
As imagens apresentam: órgão representativo dos **Grupos CP (A), CD (B), CH (C), TP (D)** e **TT (E)**.

**Figura 16** – Lâminas histológicas do tecido hepático: fixação com Bouin, coloração com HE. **Grupo CP: A.** Cordões de hepatócitos dispostos radialmente em relação a veia central (VC) posicionada no centro do lóbulo, objetiva de 10x. **B.** Hepatócitos normais, objetiva de 20x. **Grupo CD: C.** Veia central posicionada no centro do lóbulo e presença de septos fibrosos partindo do espaço porta em sentido perisinusoidal (seta). É observado o desarranjo dos hepatócitos em resposta à reorganização celular desordenada pós injúria hepática, objetiva de 10x. **D.** Esteatose predominantemente macrovesicular e hepatócitos balonizantes, objetiva de 20x. **E.** Infiltrado inflamatório misto com distribuição lobular (seta), objetiva de 8x. **F.** EHNA e cirrose hepática com nódulos de estrutura anormal circundados por fibrose, objetiva de 4x. **Grupo CH: G.** Veia central associada à fibrose e intensa atividade inflamatória. **H.** EHNA e fibrose, objetiva de 10x. **Grupo TP: I.** Veia central associada à intensa atividade inflamatória e hepatócitos sem lesão balonizante (seta), objetiva de 10x. **J.** EHNA com redução de fibrose. **Grupo TT: K.** EHNA predominante macrovesicular ao redor de veia central, objetiva de 10x. **L.** Pequeno foco de início do desenvolvimento da fibrose na região lobular, objetiva de 10x. **59**

**Figura 17** – Espectros de CPMG de RMN referentes às amostras de soro sanguíneo **62**  
(**A**) e fezes (**B**) dos animais dos **Grupos CP** (amarelo), **CD** (roxo), **CH** (verde), **TP**  
(vermelho) e **TT** (azul).

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Quantidade (em gramas) de ração fornecida diariamente a cada animal **32**  
*Sprague-Dawley*, durante o decorrer do experimento.
- Tabela 2** – Peso médio inicial e final dos animais e desvio padrão e valores de ganho **43**  
médio de peso total (GMPT) e relativo (GMPR) dos **Grupos CP, CD, CH, TP e TT**.
- Tabela 3** – Valores dos **Grupos CP, CD, CH, TP e TT** de consumo médio diário **47**  
(CMD) e desvio padrão, consumo médio semanal (CMS) e desvio padrão, ganho de  
peso relativo (GPR), ganho de peso médio semanal (GPMS), ganho de peso médio  
diário (GPMD), conversão alimentar semanal (CA) e eficiência alimentar semanal  
(EA).
- Tabela 4** – Valores do índice de adiposidade (IA) dos **Grupos CP, CD, CH, TP e** **52**  
**TT**, medidos pela soma do peso médio das gorduras epididimal, visceral e  
retroperitoneal sobre o peso corporal. É também indicado desvio padrão do peso das  
gorduras e IA.
- Tabela 5** – Valores médios e desvio padrão de alanina aminotransferase (ALT) e **54**  
aspartato aminotransferase (AST) em unidades por litro (U/L) dos **Grupos CP, CD,**  
**CH, TP e TT**.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>CA</b>	Conversão alimentar
<b>CD</b>	Controle hiperlipídico + DEN
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CH</b>	Controle hiperlipídico
<b>CHC</b>	Carcinoma hepatocelular
<b>CMC</b>	Carboximetilcelulose
<b>CMDs</b>	Corpos de Mallory-Denk
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal
<b>CP</b>	Controle padrão
<b>DC</b>	Células dendríticas
<b>DEN</b>	Dietilnitrosamina
<b>DHGNA</b>	Doença hepática gordurosa não alcoólica
<b>DMN</b>	Dimetilnitrosamina
<b>EA</b>	Eficiência alimentar
<b>EHNA</b>	Esteato hepatite não alcoólica
<b>FGNA</b>	Fígado gorduroso não alcoólico
<b>GOT</b>	Transaminase glutâmico oxalacética
<b>GPMD</b>	Ganho de peso médio diário
<b>GPMS</b>	Ganho de peso médio semanal
<b>GPR</b>	Ganho de peso relativo
<b>GPT</b>	Transaminase glutâmico pirúvica

<b>HCS</b>	Células estreladas hepáticas
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>IA</b>	Índice de adiposidade
<b>IBILCE</b>	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry
<b>KC</b>	Células de Kupffer
<b>LDL</b>	Lactato desidrogenase
<b>MDH</b>	Malato desidrogenase
<b>NAD</b>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
<b>NADH</b>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i> (reduzido)
<b>NAFL</b>	<i>Non-alcoholic fatty liver</i>
<b>NASH</b>	<i>Non-alcoholic steatohepatitis</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>Q</b>	Quercetina
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>SD</b>	<i>Sprague-Dawley</i>
<b>TP</b>	Tratamento profilático
<b>TT</b>	Tratamento terapêutico
<b>UNESP</b>	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>UV</b>	Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b>mL</b>	Mililitro
<b>g</b>	Gramma
<b>h</b>	Hora
<b>kcal</b>	Quilocaloria
<b>Ltda</b>	Limitada
<b>mg</b>	Miligrama
<b>L</b>	Litro
<b>kg</b>	Quilograma
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>p</b>	Probabilidade de significância
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>U</b>	Unidade
<b>cm<sup>3</sup></b>	Centímetro cúbico
<b><math>\mu</math>m</b>	Micrômetro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	19
<b>1.1</b> Fígado: aspectos estruturais, anatômicos e fisiológicos	19
<b>1.2</b> Esteato hepatite não alcoólica (EHNA)	25
<b>1.3</b> Quercetina	28
<b>2. OBJETIVOS</b>	30
<b>2.1</b> Objetivo geral	30
<b>2.2</b> Objetivos específicos	30
<b>3. COMISSÃO ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)</b>	31
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	32
<b>4.1</b> Animais e tratamento	32
<b>4.2</b> Coleta de material biológico	37
<b>4.2.1</b> Análise estatística	38
<b>4.3</b> Análises laboratoriais	38
<b>4.3.1</b> Cinética enzimática	38
<b>4.3.1.1</b> Análise estatística	39
<b>4.3.2</b> Macroscopia e Microscopia	39
<b>4.3.3</b> Metabolômica por RMN	40
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	42
<b>5.1</b> Tratamento e desempenho animal	42
<b>5.2</b> Cinética enzimática	52
<b>5.3</b> Macroscopia e Microscopia	55
<b>5.4</b> Metabolômica por RMN	61
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	63
<b>REFERÊNCIAS</b>	64
<b>ANEXO A – Ficha Técnica da Ração convencional ou padrão</b>	67
<b>ANEXO B – Ficha Técnica da Ração hiperlipídica deficiente em colina</b>	68

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Fígado: aspectos estruturais, anatômicos e fisiológicos

O fígado é a maior glândula e o maior órgão maciço dos mamíferos e desempenha alta versatilidade e complexidade funcional (ARIAS *et al.*, 2020; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). É o órgão protagonista de diversas funções fisiológicas do organismo, que podem ser resumidas em filtração e armazenagem de sangue; metabolismo de carboidratos, proteínas, gorduras, hormônios e produtos químicos estranhos; formação de bile; armazenamento de vitaminas e de ferro; e formação de fatores de coagulação (GUYTON & HALL, 2017), realizando uma complexa matriz de mais de 500 funções de processos metabólicos, sintéticos, imunológicos e de desintoxicação (BHATIA *et al.*, 2014).

Está localizado do lado direito do plano mediano na cavidade abdominal, posicionado em relação ao eixo crânio-caudal sobre o estômago, duodeno, região superior do pâncreas, rins e glândula suprarrenal e sua superfície superior ou parietal é convexa e se encaixa sob o músculo diafragma (MARTINS & NEUHAUS, 2007). Esta posição central em relação ao sistema circulatório confere ideal função ao órgão de captar, transformar e acumular metabólitos, bem como neutralizar ou inativar e eliminar medicamentos, drogas e substâncias tóxicas ao organismo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

O fígado compreende uma massa de parênquima esponjoso contínua penetrada por lacunas ou túneis, por onde se estabelecem redes de vasos. O fígado humano adulto pesa de 1.300 a 1.700 g, dependendo do sexo e do tamanho corporal e é relativamente pequeno em comparação com outras espécies por representar 2% do peso corporal, ao passo que em ratos, o fígado representa 4 – 5% do corpo (ARIAS *et al.*, 2020; BHATIA *et al.*, 2014).

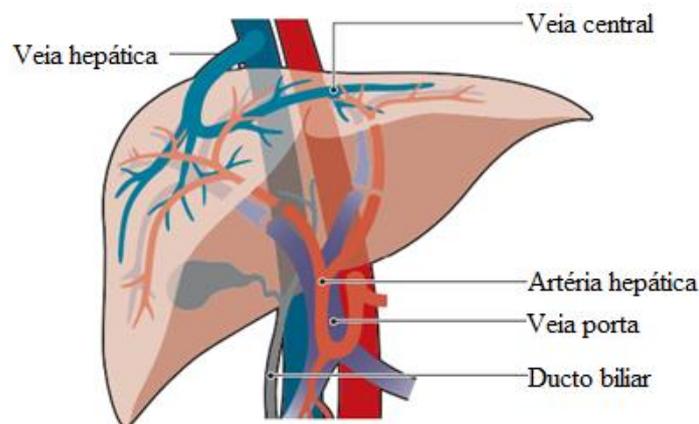
Na maioria das espécies de mamíferos, o fígado é multilobado, isto é, ramificado em grandes compartimentos individuais, como ocorre nos ratos em que o órgão é subdividido em lobo medial (38 % do peso do fígado), lobo lateral esquerdo (30 %), lobo lateral direito (22 %) e lobo caudado (8 – 10 %). O fígado humano é anatomicamente distinto dos demais mamíferos, sendo que o parênquima é contínuo e constitui dois lobos principais: direito, e esquerdo. O arranjo de seus vasos internos gera a divisão de oito segmentos parenquimatosos macrovasculares (ARIAS *et al.*, 2020; MARTINS & NEUHAUS, 2007).

O órgão é revestido pelo peritônio, com exceção da área que se adere ao diafragma e demais órgãos, e por uma cápsula delgada de tecido conjuntivo modelado, que se torna mais espessa na região denominada hilo: a porta do fígado. Nesta região, penetram no órgão a artéria

hepática e a veia porta, e saem dele os ductos hepáticos direito e esquerdo, bem como os ductos linfáticos, formando um padrão vascular único de organização (**Figura 1**) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; MONTANARI, 2016).

A maior parte dos nutrientes absorvidos pelo intestino chega ao fígado pela veia porta, que transporta entre 70 e 80% de sangue venoso do estômago, intestinos, pâncreas e baço ao fígado, sendo portanto, rico em compostos absorvidos no trato alimentar como nutrientes, substâncias tóxicas, hormônios pancreáticos e produtos da degradação da hemoglobina. A artéria hepática transporta ao fígado menor porcentagem de sangue oxigenado, carreando lipídios complexos denominados quilomícrons. Os ductos hepáticos coletam a bile produzida no fígado e o sangue do órgão é drenado pelas veias hepáticas que desembocam na veia cava inferior (ARIAS *et al.*, 2020; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; MONTANARI, 2016).

**Figura 1** – Macroanatomia do fígado humano recebendo suprimento sanguíneo duplo, com sangue rico em nutrientes da veia porta e sangue oxigenado da artéria hepática. O sangue sai do fígado pela veia hepática. A vesícula biliar coleta a bile produzida pelos hepatócitos e a libera no trato gastrointestinal através do ducto biliar.



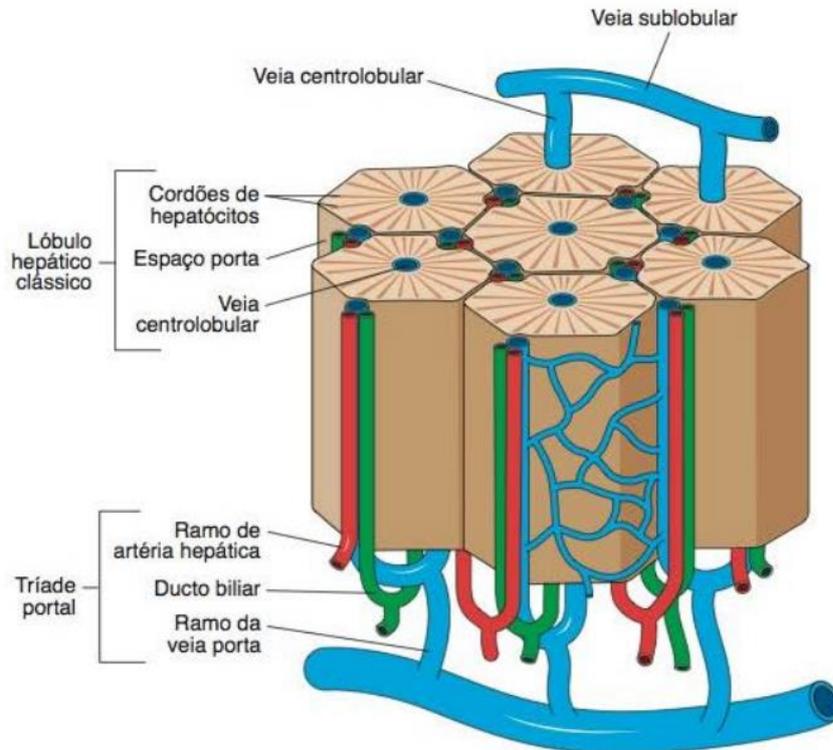
**Fonte:** Adaptado de FICHT & IANNACONE *et al.*, 2020.

As diversas funções do fígado são executadas por um tecido multicelular estruturalmente complexo com uma angioarquitetura única. Existem dois principais tipos celulares no fígado: as células biliares, também chamadas de colangiócitos e os hepatócitos. Os colangiócitos produzem a bile e formam os canais que constituem o sistema biliar, que drena o parênquima e garante o fluxo adequado permanente da bile, considerada altamente tóxica, para a vesícula biliar. Os hepatócitos medem 20 a 30  $\mu\text{m}$  de diâmetro e são as células

parenquimatosas mais valiosas do tecido hepático, devido a capacidade de realizarem as funções metabólicas mais complexas do organismo dos mamíferos. (ARIAS *et al.*, 2020).

Os hepatócitos estão agrupados em placas interconectadas, denominadas lóbulos hepáticos: unidades estruturais e funcionais básicas do fígado (**Figura 2**). Cada lóbulo apresenta uma massa de tecido de forma cilíndrica ou poligonal de 0,7 a 2 milímetros de diâmetro, uma veia na região centrolobular ou central e dispostos radialmente a esta, vários cordões de hepatócitos enfileirados. Entre um lóbulo e outro, nas regiões denominadas espaços porta, se encontra um ramo da artéria hepática (arteríola), um ramo da veia porta (vênula) e um ducto biliar, conjunto caracterizado como tríade portal, além de vasos linfáticos. O fígado humano é constituído de 50 mil a 100 mil lóbulos individuais com três a seis espaços porta por lóbulo (GUYTON & HALL, 2017; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; MONTANARI, 2016).

**Figura 2** – Representação da microanatomia do fígado: Cada lóbulo é composto por cordões de hepatócitos dispostos radialmente em relação à veia centrolobular ou central. Na periferia do lóbulo há tecido conjuntivo, no qual se encontra o espaço porta, que contém a tríade portal (arteríola, vênula e ducto biliar).



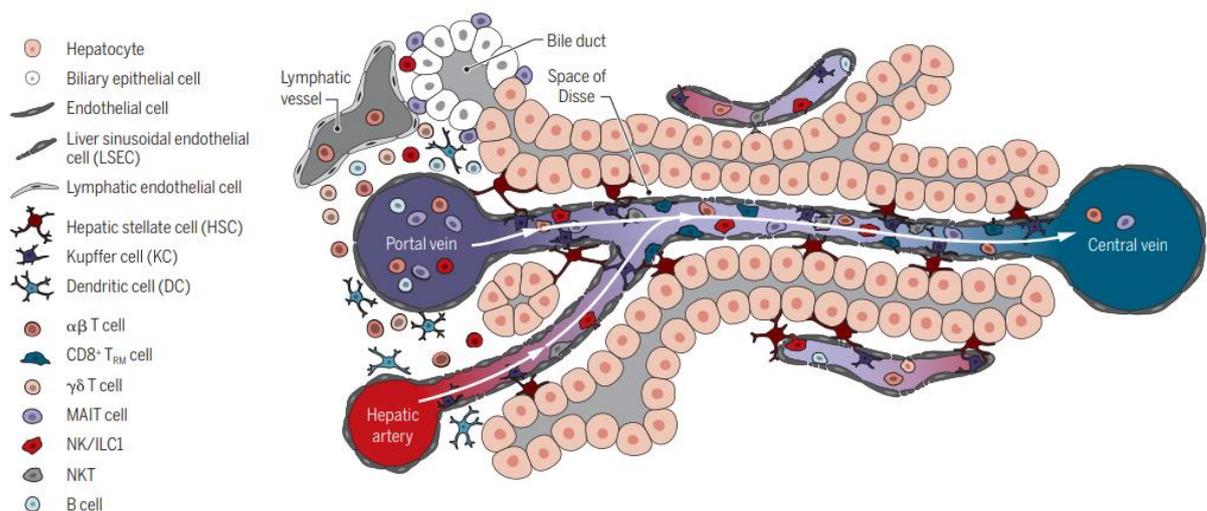
Fonte: JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013.

Os vasos da tríade portal ramificam-se em vasos distribuidores, preenchendo o lóbulo por inteiro (**Figura 3**). As arteríolas e vênulas hepáticas, que transportam o sangue para o

fígado, abrem-se nos capilares sinusoides situados entre os cordões de hepatócitos e estes desembocam na veia central (MONTANARI, 2016). A constituição dos sinusoides por uma camada descontínua de células endoteliais permite uma troca fisiologicamente importante de macromoléculas entre a corrente sanguínea e os hepatócitos, e vice-versa, além da troca gasosa. A bile sintetizada por estas células é escoada nos canalículos biliares que convergem para o ducto biliar e posteriormente para a vesícula biliar (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

No fígado, além dos hepatócitos, estão presentes os miofibroblastos como as células estreladas hepáticas, ou células de Ito, que representam a principal fonte de fatores de crescimento, fibras reticulares e citocinas e armazenam substâncias específicas como vitamina A. A presença de quase todos os subtipos de linfócitos e células dendríticas tornam o fígado um dos maiores órgãos do sistema imunológico. Os macrófagos residentes do órgão, denominadas células de Kupffer, filtram o sangue desempenham sua função imunorreguladora tradicional, fagocitando hemácias velhas, bactérias, vírus e material particulado no fígado (ARIAS *et al.*, 2020; MONTANARI, 2016).

**Figura 3** – Subconjuntos de células hepáticas. Hepatócitos são dispostos em cordões e produzem a bile, que é coletada pelos dutos biliares na área portal. Células endoteliais revestem os sinusoides e vasos terminais e linfáticos. As setas indicam a direção do fluxo sanguíneo. Células imunes: células estreladas hepáticas (HCS), células de Kupffer (KC), células dendríticas (DC), células T ( $\alpha\beta$ , CD8 e  $\gamma\delta$ ), células MAIT, células linfóides (NK e NKT) e células B.



Fonte: FICHT & IANNACONE *et al.*, 2020.

O fígado é considerado uma interface entre o sistema digestivo e o sangue, uma vez que desempenha papel fundamental no processamento e armazenamento de nutrientes absorvidos no trato digestivo, que são posteriormente encaminhados e utilizados por outros órgãos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Participa, portanto, da manutenção da homeostase do organismo como um filtro sanguíneo bidirecional – pois faz a filtração do sangue sistêmico e do sangue que transporta nutrientes e compostos tóxicos absorvidos no trato gastrointestinal – e ativo – uma vez que atua metabolizando a maioria dos compostos nutricionais e neutralizando e removendo compostos tóxicos de forma rápida, como diversos fármacos incluindo antibióticos, hormônios esteróides, tiroxina e outras substâncias como o cálcio (ARIAS *et al.*, 2020; GUYTON & HALL, 2017).

Além de inativar e metabolizar muitas substâncias tóxicas, medicamentos e drogas, o fígado desempenha um papel essencial no metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas (ARIAS *et al.*, 2020). Embora a maioria das células corporais metabolize gordura, certos aspectos do metabolismo lipídico ocorrem, em sua maior parte, no fígado (GUYTON & HALL, 2017). Os quilomícrons que chegam ao fígado são degradados em ácidos graxos e glicerol e a partir destas moléculas, ocorre a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos de cadeias médias e curtas, proporcionando fonte energética para outras funções corporais; síntese de grande quantidade de colesterol, fosfolipídios e a maioria das lipoproteínas; e síntese ou conversão de gordura a partir de proteínas e carboidratos (BRANDÃO, 2017; GUYTON & HALL, 2017; MONTANARI, 2016).

Aproximadamente 80% do colesterol produzido nos hepatócitos é convertido em ácido cólico e este em sais biliares, que são secretados e juntamente com água, bilirrubina, colesterol, ácidos graxos, lectina e íons como sódio, potássio, cálcio, cloro e bicarbonato, constituem a bile. A bile é um fluido alcalino essencial na digestão e absorção de gorduras secretado em quantidades que variam de 600 a 1200 mL por dia e após secreção, é armazenada na vesícula biliar até que se torne necessária à digestão, momento em que é despejada internamente no duodeno, região do intestino delgado, e ocorre a emulsificação das partículas gordurosas, que se tornam menores, o que permite a ação de digestão pelas lipases pancreáticas (ARIAS *et al.*, 2020; BRANDÃO, 2017; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; MONTANARI, 2016).

No metabolismo de carboidratos o fígado desempenha importante papel na manutenção da concentração normal da glicose sanguínea, ou controle da glicemia, realizando as funções de armazenamento de grandes quantidades de glicogênio e quando necessário conversão deste em glicose; gliconeogênese, que representa o processo de produção de glicose a partir de

moléculas diferentes de carboidratos; e conversão de galactose e frutose em glicose (BRANDÃO, 2017; GUYTON & HALL, 2017).

Em relação ao metabolismo de proteínas, o fígado é capaz de promover a desaminação de aminoácidos, necessária para serem utilizados como fonte energética; conversão de amônia, tóxica ao organismo, em uréia; formação de 90% das proteínas plasmáticas como a albumina sérica, bilirrubina e outras proteínas carreadoras; e interconversões entre os diversos aminoácidos e síntese a partir destes de compostos como aminoácidos não essenciais, (BRANDÃO, 2017; GUYTON & HALL, 2017).

O fígado exerce um importante papel no metabolismo do ferro, sendo que a maior parte deste mineral disponível nos líquidos corporais interage de forma reversível com a proteína apoferritina, presente nos hepatócitos, se tornando a ferritina. Quando necessário, a ferritina libera o ferro e os níveis de ferro circulante se equilibram adequadamente (BRANDÃO, 2017; GUYTON & HALL, 2017; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Ocorre ainda no fígado o armazenamento das vitaminas A, principal vitamina armazenada em grandes quantidades, D e B12 (BRANDÃO, 2017; GUYTON & HALL, 2017).

Além disso, o fígado sintetiza grande parte de substâncias sanguíneas que constituem a cascata de coagulação, como a protrombina, e fatores II, VII, IX e X, todos metabolicamente dependentes de vitamina K, fibrinogênio e globulina aceleradora. É no fígado também que ocorre a metabolização da bilirrubina, caracterizada como um pigmento verde-amarelo insolúvel em água, formada a partir da degradação da hemoglobina durante a fagocitose de hemácias velhas pelos macrófagos do próprio fígado, baço e da medula óssea. A bilirrubina é captada pelos hepatócitos e conjugada com o ácido glicurônico por ação da enzima glicuroniltransferase, resultando em glicuronato de bilirrubina, molécula solúvel em água, portanto capaz de ser corretamente eliminada pela urina ou fezes (BRANDÃO, 2017; GUYTON & HALL, 2017).

Apesar de ter um ritmo lento de renovação celular, o fígado apresenta uma capacidade de regeneração extraordinária, sendo que alguns animais apresentam restauração completa de perda de tecido hepático, capacidade consideravelmente restrita nos humanos. O órgão pode ser lesionado como consequência da presença de diversos agentes como etanol, fármacos, drogas, agentes químicos, infecções virais (hepatites) e doença hepática autoimune (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Nas condições de doenças hepáticas como fibrose, inflamação ou infecções virais, o processo regenerativo do fígado fica seriamente comprometido e a função hepática se deteriora (GUYTON & HALL, 2017).

O fígado regenerado é geralmente bem organizado, exibindo o arranjo lobular típico e, conseqüentemente, função normalizada. No entanto, quando os hepatócitos são repetidamente agredidos por determinado fator a longo prazo, sua multiplicação é seguida de um aumento significativo na quantidade de tecido conjuntivo e ocorre a formação de nódulos celulares em arranjo desordenado, como uma fibrose difusa, o que caracteriza o processo de cirrose. A cirrose é progressiva e irreversível, podendo levar à falência do órgão e conseqüentemente ao óbito (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

As doenças hepáticas e a conseqüente perda da função do fígado representam um enorme desafio clínico que se torna progressivamente mais sério ao passo do surgimento de novos fatores como a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e esteato hepatite não alcoólica (EHNA) e uma população mundial com grande incidência de quadro clínico de hepatites em risco de progressão para carcinoma hepatocelular (BHATIA *et al.*, 2014).

Nos casos de insuficiência hepática, o transplante de fígado é indicado como o tratamento primário e a única terapia que mostrou alterar diretamente a mortalidade, o que se torna limitado devido à escassez de órgãos disponíveis para transplantes, mesmo com o constante desenvolvimento de avanços cirúrgicos neste sentido. A improbabilidade de que os procedimentos de transplante de fígado isoladamente atendam à crescente demanda, dá destaque para a busca por terapias alternativas com potencial de prevenção ou tratamento às disfunções hepáticas (BHATIA *et al.*, 2014).

## **1.2 Esteato hepatite não alcoólica (EHNA)**

As doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA) representam um termo usado para descrever um espectro de doenças do fígado causadas pelo acúmulo de gordura nas células (YOUNOSSI *et al.*, 2019). São consideradas as doenças hepáticas crônicas mais comuns e crescentes do mundo, com incidência em crianças, adolescentes e adultos (TSUCHIDA, *et al.*, 2018; YOUNOSSI *et al.*, 2017; 2018; 2019).

DHGNA são definidas pela presença de gordura no fígado, quadro identificado como esteatose hepática, que é estabelecida no organismo sem causas secundárias de acúmulo de gordura como consumo significativo de álcool, uso de medicamentos esteatogênicos ou distúrbios hereditários. A maior incidência de DHGNA está associada a fatores de risco metabólico como obesidade, hipertensão, resistência à insulina, diabetes mellitus e dislipidemia, caracterizada pela elevação dos níveis de colesterol e triglicerídeos ou diminuição

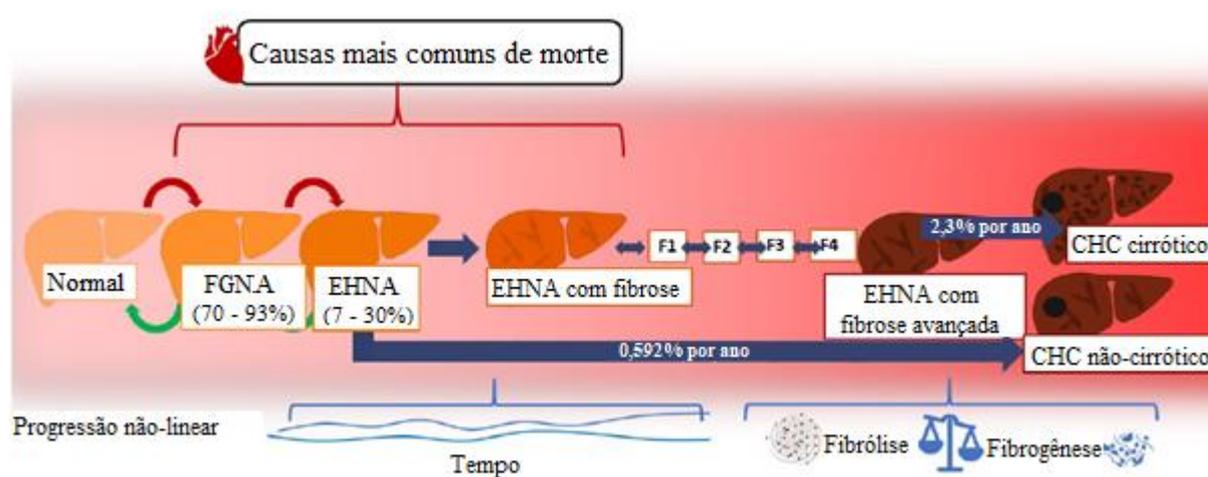
dos níveis de HDL no plasma sanguíneo (CHALASANI *et al.*, 2012; CHU *et al.*, 2018; TSUCHIDA, *et al.*, 2018; YOUNOSSI *et al.*, 2017; 2018; 2019).

Estas disfunções metabólicas que promovem a instalação da doença, estão diretamente relacionadas ao padrão da dieta ocidental, que corresponde ao alto consumo de carne vermelha processada, laticínios com alto teor de gordura e açúcares (KOBORI *et al.*, 2010), o que sustenta o aumento mundial de DHGNA concomitante ao aumento da prevalência de obesidade (TSUCHIDA, *et al.*, 2018; YOUNOSSI *et al.*, 2019). Além de dieta pouco equilibrada, a fisiopatologia da DHGNA envolve fatores ecológicos, genéticos, epigenéticos e metabólicos como, atividade física limitada, além da alta ingestão de energia, sendo assim considerada multifatorial (CHU *et al.*, 2018).

O estabelecimento e progressão de DHGNA ocorre em dois estágios no fígado. O primeiro é denominado fígado gorduroso não alcoólico (FGNA), em inglês *non-alcoholic fatty liver* (NAFL), em que a esteatose hepática é considerada simples por não apresentar evidência de lesão hepatocelular. Após diagnóstico, a maioria das pessoas permanece neste estágio de desenvolvimento da doença ao longo da vida. No entanto, estima-se que 20% das pessoas apresentam progressão para o segundo estágio, devido ao aumento da resposta inflamatória do tecido hepático ao processo de lipotoxicidade. O segundo estágio é denominado esteato hepatite não alcoólica (EHNA), em inglês *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH), em que há esteatose hepática com inflamação e lesão de hepatócitos, podendo ocorrer estabelecimento de fibrose (CHALASANI, 2012; YOUNOSSI *et al.*, 2017; 2018; 2019).

A EHNA pode ser definida como um excesso de gordura hepática, na qual o fígado possui ao menos 5% dos hepatócitos com gotas lipídicas que excedem de 5 a 10% o peso do órgão nos pacientes (DAMASO, 2006; YOUNOSSI *et al.*, 2019). É considerada a forma mais grave de DHGNA, uma vez que está associada ao potencial para progredir aos quadros clínicos de doença hepática avançada. Neste sentido, EHNA pode estimular lesão hepática e fibrose em 20 a 40% dos casos, em que 10% destes progride para cirrose e 2 a 12% desenvolvem carcinoma hepatocelular (CHC), situação que apresenta potencial necessidade de transplante hepático (**Figura 4**) (TSUCHIDA, *et al.*, 2018; MARRA *et al.*, 2013; YOUNOSSI *et al.*, 2019).

**Figura 4** – História natural e desenvolvimento de DHGNA e EHNA. Na constante exposição à dieta gordurosa, o órgão inicialmente em condições normais progride em 70 a 93% dos casos para fígado gorduroso não alcoólico (FGNA), primeiro estágio da doença com quadro de esteatose hepática simples. Em 7 a 30 % dos casos ocorre progressão para esteato hepatite não alcoólica (EHNA), segundo estágio, em que há esteatose hepática com inflamação e lesão de hepatócitos, podendo ocorrer estabelecimento de fibrose. A partir de então pode ocorrer progressão para EHNA com fibrose simples e avançada e desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC) cirrótico ou não-cirrótico.



Fonte: Adaptado de YOUNOSSI *et al.*, 2019.

A prevalência mundial de DHGNA é estimada em 25% e de EHNA na faixa de 1,5 a 6,45% da população adulta, com a prevalência global em pessoas com diabetes mellitus tipo 2 de 55,5%, indicando maior risco de estabelecimento da doença pela disfunção metabólica prévia. O risco também é significativamente maior em pessoas com obesidade, hipertensão e dislipidemia. (YOUNOSSI *et al.*, 2019).

A nível continental, a prevalência de EHNA representa 31,8% da população no Oriente Médio, 30,5% na América do Sul, 27,4% na Ásia, 24,1% na América do Norte, 23,7% na Europa, 17,1% na Austrália e 13,5% na África. Uma projeção sobre a prevalência da doença feita com países da Europa, Ásia e América do Norte estima valores crescentes de manifestação da doença até 2030, com aumento de 63% de EHNA, 168% de cirrose, 137% de carcinoma hepatocelular e 178% de mortes relacionadas ao fígado, indicando aproximadamente 800 mil mortes, o que equivale ao dobro em relação a 2020 (YOUNOSSI *et al.*, 2019).

Atualmente o tratamento da doença consiste na mudança de hábitos alimentares e implementação de práticas de exercício físico ao paciente, abordagem que apresenta baixa

porcentagem de sucesso. Outros tipos de intervenção incluem agentes hipoglicêmicos orais, vitamina E, hipolipemiantes e cirurgia bariátrica (YOUNOSSI *et al.*, 2019). No entanto, ainda não existem intervenções farmacêuticas aprovadas estabelecidas que visem manter controle da EHNA com tratamentos de prevenção ou cura, o que coloca a doença como um desafio no foco da saúde pública, considerando sua alta prevalência e estimativas crescentes. Neste cenário, a busca e investigação referente a estratégias de combate à sua instalação e progressão, preferencialmente com a utilização de compostos naturais e pouco invasivos, se torna fundamental e urgente.

### 1.3 Quercetina

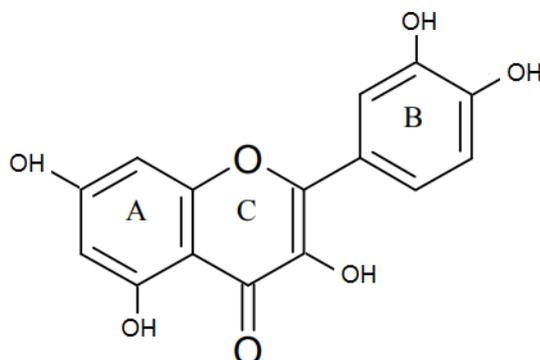
Os flavonoides constituem um grupo de compostos polifenólicos diversos em estrutura e características químicas. Ocorrem naturalmente em frutas, verduras, sementes, grãos, flores, cascas, ervas, caules, chá e vinho tinto e são parte integrante da dieta humana. São moléculas responsáveis pela explosão outonal de cores, bem como os vários tons de amarelo, laranja e vermelho nas flores e nos alimentos (COOK & SAMMAN, 1996; MIDDLETON, 2000).

As atividades bioquímicas dos flavonoides, seus metabólitos e a classificação dos grupos dependem de suas propriedades químicas. Estruturalmente, os flavonoides são substâncias polifenólicas de baixo peso molecular compostas por um esqueleto de difenil propano (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>) com dois anéis benzênicos ligados a um anel pirano (BEHLING *et al.*, 2004).

Os flavonoides são compostos de grande interesse científico por apresentarem dentre outras, as propriedades antiinflamatória, anticancerígena, antibacteriana, antiviral, antialérgica, e antioxidante, que atuam no bloqueio de radicais livres, como o composto quercetina (COOK & SAMMAN, 1996).

A quercetina (Q) (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona) (**Figura 5**) é o principal flavonoide presente na dieta humana e o seu consumo diário estimado varia entre 50 e 500 mg, equivalente a 95% do total dos flavonóides ingeridos. Os alimentos de fonte majoritária são cebola, maçã e brócolis (BEHLING *et al.*, 2004).

**Figura 5** – Estrutura química da quercetina (Q). Dois anéis benzênicos representados por A e B e um anel pirano C. Radicais OH nas posições 3, 5, 7, 3' e 4'.



**Fonte:** adaptado de BEHLING *et al.*, 2004.

A quercetina na dieta é metabolizada no intestino e no fígado, acumulando-se gradualmente no fígado e depois no rim e outros órgãos. Assim, o fígado é um órgão importante afetado pelo consumo habitual de uma dieta rica em quercetina (BEHLING *et al.*, 2004). Estudos demonstraram que a ingestão oral de quercetina melhora da capacidade antioxidativa hepática, protegendo contra a perda de peso corporal e hepático causado pela administração do agente hepatotóxico cancerígeno dimetilnitrosamina (DMN) e impedindo o aumento dos níveis séricos das enzimas alanina e aspartato aminotransferase (ALT e AST) e bilirrubina, indicativos de dano hepático (LEE *et al.*, 2003).

A administração oral de quercetina também demonstrou redução do acúmulo de gordura no fígado e melhora dos parâmetros sistêmicos relacionados à síndrome metabólica em camundongos alimentados com uma dieta ocidental, rica em lipídios e açúcares. Isso está provavelmente ligado à diminuição do estresse oxidativo hepático entre outros fatores como a redução da expressão de genes relacionados à esteatose (KOBORI *et al.*, 2010).

A quercetina demonstra efeitos muito promissores a respeito do tratamento e prevenção de injúrias hepáticas, tornando interessante e necessária a avaliação de seu potencial bloqueio da progressão de fibrose hepática no estabelecimento de EHNA, uma vez que ainda não há conclusões específicas a respeito desta condição patológica.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os animais do **Grupo CP** demonstraram boas condições de saúde clínica por apresentarem valores regulares de ganho de peso corporal, consumo de alimento e proporção de gorduras, além de sintomas físicos considerados normais, como cor rosa da pele, excretas em padrão normal e pêlos robustos com brilho. O grupo apresentou também índices de normalidade indicando saúde hepática, evidenciada por peso regular do fígado, menores valores de atividade das transaminases ALT e AST no sangue, aspectos macroscópicos e histológicos do fígado normais após o período de tratamento com alimentação convencional regulada, representando nutrição equilibrada e adequada para a espécie.

O **Grupo CD** foi considerado o grupo mais agredido pela ação de DEN em conjunto à indução de EHNA por apresentar conjunto de características clínicas comuns em desarranjos hepáticos como icterícia, colúria e hipocolia, pêlos ralos, arrepiados e opacos, menor índice de ganho de peso corporal e perda de peso ao fim do experimento, menor ganho de peso do fígado, menor consumo de alimento, maiores níveis séricos de ALT e AST e presença de fibrose e cirrose hepática.

Os animais do **Grupo CH** também apresentaram o estabelecimento de EHNA, demonstrando fortes características de debilidade física, no entanto, apresentaram melhor quadro clínico em relação a **CD**, assim como indicado pelos padrões de ganho de peso, consumo e níveis séricos das transaminases.

Os dois grupos tratados com quercetina apresentaram melhores condições clínicas em relação a todos os demais grupos que receberam dieta hiperlipídica. No **Grupo TP** todos os animais apresentaram corpo coberto de pêlos e comportamento natural, sem processo de debilidade física, quadro clínico mais próximo ao de **CP**. No **Grupo TT** alguns animais representantes apresentaram perda de pêlos na região dorsal próxima do pescoço, como visto em **CH** e outros, as características descritas para **TP**. Os níveis séricos de ALT foram mais altos nos **Grupos TP** e **TT**, o que pode estar associado à repetição diária de gavagem nos animais, que provoca aumento transitório das transaminases hepáticas devido ao estresse gerado.

A análise histológica concluiu que ambos os tratamentos, profilático e terapêutico, com quercetina se apresentaram eficientes e promissores no sentido de impedir o estabelecimento da fibrose na condição de EHNA, protegendo o órgão contra maior degeneração e perda de funções vitais, aspecto fundamental para garantir possibilidade de reversão da patologia ao quadro clínico saudável do fígado e recuperação das suas funções comprometidas pelo acúmulo de gordura nas células.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, Zilton A. **Regressão da fibrose hepática**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 38(6), 514-520. 2005.
- ARIAS, Irwin M., ALTER, Harvey J., BOYER, James L., COHEN, David E., SHAFRITZ, David A., THORGEIRSSON, Snorri S., WOLKOFF, Allan W. **The Liver: Biology and Pathobiology**. 6ª Edição. Editora John Wiley & Sons Ltd, 2020.
- BEDOSSA P, POITOU C, VEYRIE N, BOUILLOT JL, BASDEVANT A, PARADIS V, TORDJMAN J, CLEMENT K. **Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients**. Hepatology. 2012.
- BHATIA, S. N., Underhill, G. H., Zaret, K. S., & Fox, I. J. **Cell and tissue engineering for liver disease**. Science translational medicine vol. 6, 245. 2014.
- BEHLING, Estela Beatriz; SENDÃO, Milena Cristina; FRANCESCATO, Heloisa Della Coletta; ANTUNES, Lusânia Maria Greggi; BIANCHI, Maria de Lourdes Pires. **Flavonóide Quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas**. Alimentos e Nutrição, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292. 2004.
- BRANDÃO, JULIELLY A. ANDRADE. **Fígado e Vias Biliares**. Estudo Complementar em Gastroenterologia: Aspectos Anatômicos e Clínicos. Liga de Gastroenterologia – Ligastro, Capítulo VIII. 2ª Edição, 2017.
- BRASIL, Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Diário Oficial da União nº 36, Seção 1, pág. 5 de 22/02/2018. Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. **Baixa a diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA**. Brasília, DF, Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, 15 de fevereiro de 2018.
- BROWN, Gregory Thomas; KLEINER, David E. **Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis**. Metabolism: clinical and experimental vol. 65, 8. 2016.
- CHALASANI N., YOUNOSSI Z, LAVINE J. E., et al. **The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology**. Gastroenterology, 142:1592–1609. 2012.
- CHU H.; WILLIAMS B.; SCHNABL B. **Gut microbiota, fatty liver disease, and hepatocellular carcinoma**. Liver Res, 2(1):43-51. 2018.
- COOK, N. C.; SAMMAN, S. **Flavonoids — Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources**. The Journal of Nutritional Biochemistry, 1996.

DAMASO, ANA R; TOCK, Lian; TUFIK, Sérgio; PRADO, Wagner L.; STELLA, Sérgio G.; FISBERG, Mauro; CINTRA, Isa P.; CARANTI, Danielle A.; SIQUEIRA, Kãli O.; NASCIMENTO, Cláudia M.; OYAMA, Lila M.; LEDERMAN, Henrique M.; CRISTOFALO, Dejaldo; ANTUNES, Hanna K.; COMPARONI, Aniella; SANTOS, Luana C.; MELLO, Marco T. **Tratamento multidisciplinar reduz o tecido adiposo visceral, leptina, grelina e a prevalência de esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) em adolescentes obesos.** Rev Bras Med Esporte, Niterói, v. 12, n. 5, p. 263-267. 2006.

FICHT, Xenia; IANNACONE, Matteo. **Immune surveillance of the liver by T cells.** Science Immunology, vol. 5, edição 51, 2351. 2020

GUYTON, ARTHUR C.; HALL, JOHN E. **Tratado de Fisiologia Médica.** 13ª Edição. Editora Elsevier, 2017.

HE, Qili; SU, Guoming; LIU, Keliang; ZHANG, Fangcheng; JIANG, Yong; GAO, Jun; LIU, Lida; JIANG, Zhongren; JIN, Minwu; XIE, Huiping. **Sex-specific reference intervals of hematologic and biochemical analytes in Sprague-Dawley rats using the nonparametric rank percentile method.** Plos One, 2017.

IIDA, Vivian Helena; SILVA, Thiago Junqueira A. da; SILVA, Aloísio Souza F. da; SILVA, Luiz Fernando F. da; ALVES, Venancio A. F. **Cirrose hepática: aspectos morfológicos relacionados às suas possíveis complicações. Um estudo centrado em necropsias.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 41(1), 29-36. 2005.

JUNQUEIRA, LC; CARNEIRO, J. **Histologia Básica. Texto e Atlas.** 12ª Edição. Rio de Janeiro: Grupo Editorial Nacional - Guanabara Koogan, 2013.

KOBORI M, MASUMOTO S, AKIMOTO Y, OIKE H. **Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice.** Mol Nutr Food Res, 55(4):530-540. 2010.

LEE, E.S. *et al.* **The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats.** J. Pharm. Pharmacol., London, v. 55, n. 8, p. 1169-1174, 2003.

MARTINS, Paulo Ney Aguiar; NEUHAUS, Peter. **Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat.** Liver International, v 27, n 3, p. 384 – 392, 2007.

MARRA F, LOTERSZTAJN S. **Pathophysiology of NASH: perspectives for a targeted treatment.** Current Pharmaceutical Design. 2013.

MIDDLETON, Elliot Jr; KANDASWAMI, Chitan; THEOHARIDES, Theoharis C. **The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer.** Pharmacological Reviews, 2000.

MIOT, Hélio Amante. **Avaliação da normalidade dos dados em estudos clínicos e experimentais.** Jornal Vasculiar Brasileiro, Porto Alegre, v. 16, n. 2, p. 88-91, jun. 2017.

MONTANARI, TATIANA. **Histologia Texto, atlas e roteiro de aulas práticas.** 3ª Edição. Porto Alegre. Edição do autor, 2016.

PASACHOFF, Naomi. **Marie Curie: And the Science of Radioactivity**. Oxford University Press, p 21. 1996.

TACONIC. **Sprague-Dawley Rat. Preferred for safety and efficacy, surgical modifications and reproductive studies** – Physiological data (p 5). 11 p. 2004.

TAYLOR, BENJAMIN A.; PHILLIPS, SANDRA J. **Detection of Obesity QTLs on Mouse Chromosomes 1 and 7 by Selective DNA Pooling**. *Genomics* 34, 389–398, article n° 03021996, 1996.

TSUCHIDA, T.; LEE, Y. A.; FUJIWARA, N.; YBANEZ, M.; ALLEN, B.; MARTINS, S.; FRIEDMAN, S. L. **A simple diet- and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer**. *Journal of Hepatology*, 69 (2), 385–395. 2018.

YOUNOSSI ZM, STEPANOVA M, RAFIQ N, HENRY L, LOOMBA R, MAKHLOUF H, *et al.* **Nonalcoholic steatofibrosis independently predicts mortality in nonalcoholic fatty liver disease**. *Hepatol Commun*, 1:421-428. 2017.

YOUNOSSI Z, ANSTEE QM, MARIETTI M, HARDY T, HENRY L, ESLAM M, *et al.* **Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention**. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 15:11-20. 2018.

YOUNOSSI, ZOB AIR M.; HENRY, LINDA. **The Global Burden of Non-alcoholic Steatohepatitis**. *Archivos Cubanos de Gastroenterología*, [S.l.], v. 1, n. 1. 2019.

ZAMIN Jr., Idilio, MATTOS, Angelo Alves de, PERIN, Christiano, & RAMOS, Gabriel Zatti. (2002). **A importância do índice AST/ALT no diagnóstico da esteatohepatite não-alcoólica**. *Arquivos de Gastroenterologia*, 39(1), 22-26.