



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^ª. Dr^ª. 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^a 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^a Dr^a Gislane Lelis Vilela de Oliveira, Prof. Dr. Luiz Gustavo Araujo Gardinassi e Prof^a Dr^a 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^a 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

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

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

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
mL	Mililitro
g	Gramma
h	Hora
kcal	Quilocaloria
Ltda	Limitada
mg	Miligrama
L	Litro
kg	Quilograma
°C	Grau Celsius
rpm	Rotações por minuto
p	Probabilidade de significância
μL	Microlitro
nm	Nanômetro
U	Unidade
cm³	Centímetro cúbico
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

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

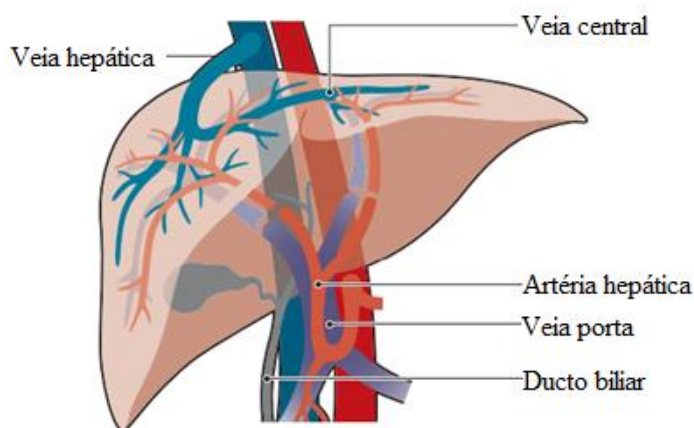
Na maioria das espécies de mamíferos, o fígado é multilobado, isto é, ramificado em grandes compartimentos individuais, como ocorre nos ratos em que o órgão é subdividido em lobo medial (38 % do peso do fígado), lobo lateral esquerdo (30 %), lobo lateral direito (22 %) e lobo caudado (8 – 10 %). O fígado 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.



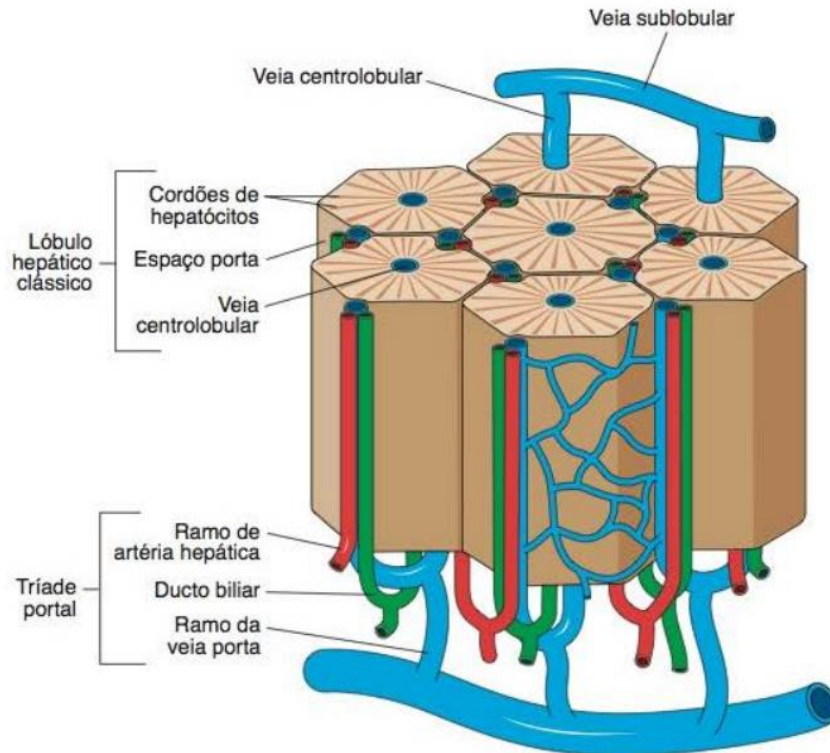
Fonte: Adaptado de FICHT & IANNACONE *et al.*, 2020.

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 μm 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).



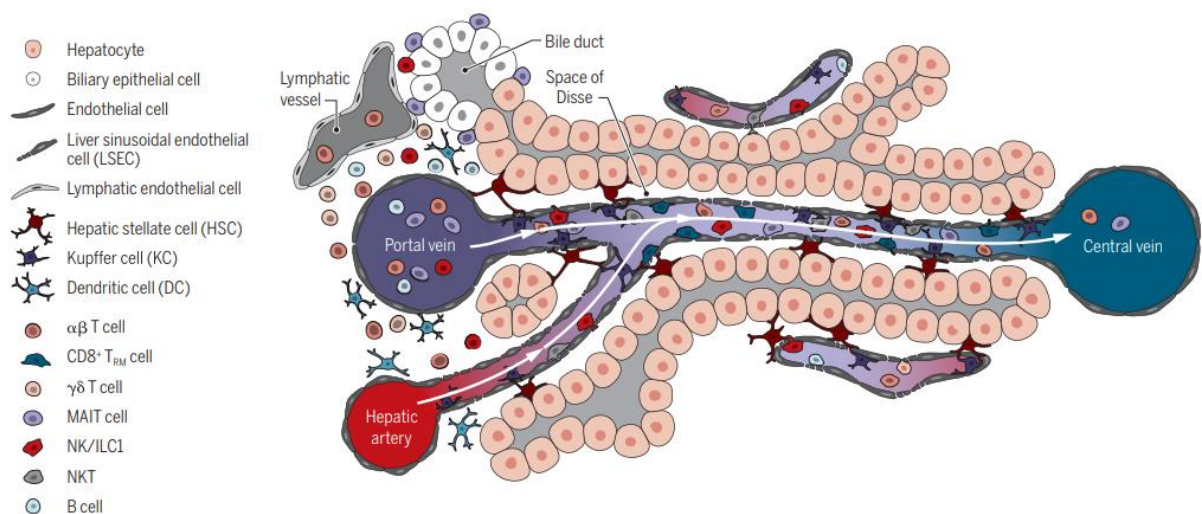
Fonte: JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013.

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 β -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

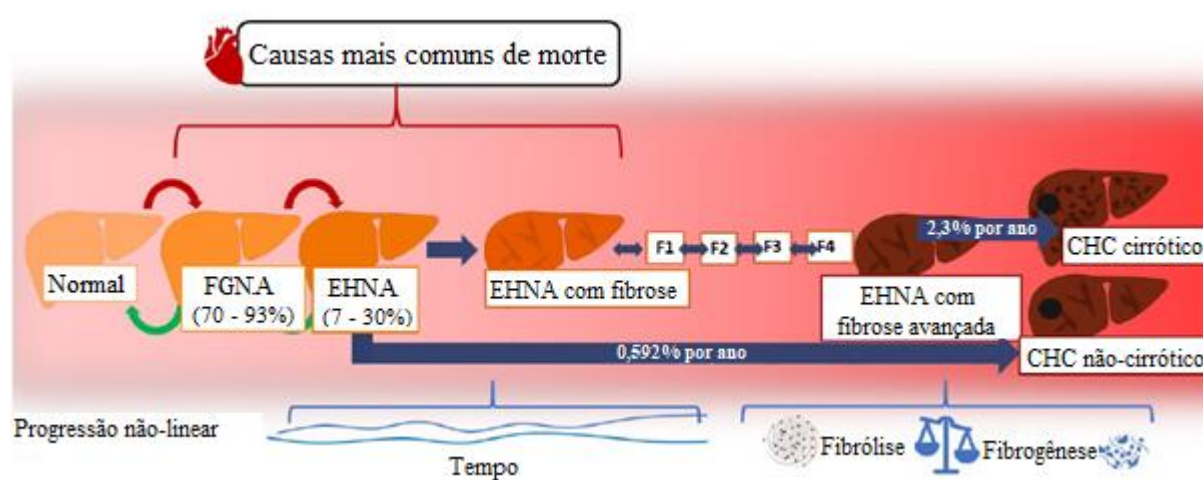
dos níveis de HDL no plasma sanguíneo (CHALASANI *et al.*, 2012; CHU *et al.*, 2018; TSUCHIDA, *et al.*, 2018; YOUNOSSI *et al.*, 2017; 2018; 2019).

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

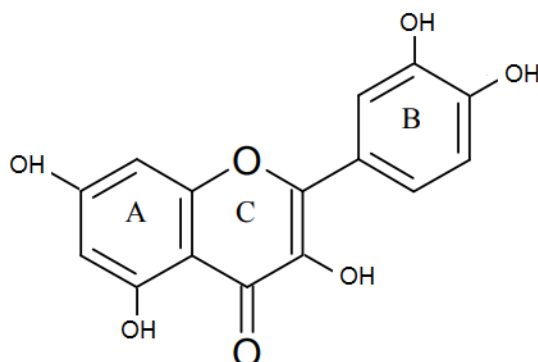
Os flavonoides constituem um grupo de compostos polifenólicos diversos em estrutura e características químicas. Ocorrem naturalmente em frutas, verduras, sementes, grãos, flores, cascas, ervas, caules, chá e vinho tinto e são parte integrante da dieta humana. São moléculas responsáveis pela explosão 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 (C₆C₃C₆) 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.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as respostas terapêutica e profilática da quercetina aplicada em ratos com esteatose hepática não alcoólica (EHNA).

2.1 Objetivos específicos

- a. Mapear e entender a o efeito antiinflamatório da quercetina na patogênese e desenvolvimento de fibrose a partir de EHNA;
- b. Avaliar os efeitos profilático e terapêutico da quercetina como tratamento ao quadro de indução de EHNA;
- c. Fazer o *screening* dos metabólitos gerados com e sem tratamento;
- d. Apontar possíveis biomarcadores para diagnóstico e profilaxia ou terapia envolvidos na modulação do processo inflamatório e no estabelecimento e progressão da fibrose a partir de EHNA;
- e. Propor dose antifibrótica da molécula.

3. COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

Este trabalho foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/IBILCE) em 02 de março de 2020, sob número de protocolo 215/2019.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e tratamento

O projeto foi desenvolvido no Biotério de Manutenção e Experimentação de Roedores (UNESP/IBILCE), sob coordenação da Prof^a Dr^a Patricia Simone Leite Vilamaior e teve como modelo experimental ratos da linhagem *Sprague-Dawley* (SD). A escolha de ratos da linhagem *Sprague-Dawley* como modelo animal experimental foi embasada na alta susceptibilidade destes organismos ao desenvolvimento de doenças associadas à síndrome metabólica, induzidas com o fornecimento de dieta hiperlipídica. Os animais foram adquiridos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), instituição fornecedora credenciada ao Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA).

Às três semanas completas de vida dos animais (21 dias), idade de desmame, estes foram separados da mãe, sexados, pesados e o início do experimento se deu com o fornecimento diário regulado de ração aos animais machos, a título de padronização, obedecendo à quantidade necessária de consumo adequado à idade destes, em semanas. O fornecimento diário de ração se manteve consistente uma vez ao dia no mesmo horário, a partir do início da 3^a semana de vida dos animais até as completas 12 semanas, totalizando 9 semanas de experimento. As quantidades fornecidas foram estabelecidas em 5 g de ração convencional a cada 100 g de peso corporal, porção suficiente ao consumo médio do animal em boas condições de saúde (TACONIC, 2004). Em caso de sobra da ração após 24h do seu fornecimento, a porção foi pesada e assim foi registrado o consumo diário total.

Tabela 1 – Quantidade (em gramas) de ração fornecida diariamente a cada animal *Sprague-Dawley*, durante o decorrer do experimento.

Semana de vida	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a	12 ^a
Peso médio corporal do macho (g)	50	100	150	200	225	250	300	325	350	175
Consumo médio diário de ração por animal (g)	2,5	5	7,5	10	11,25	12,5	15	16,25	17,5	18,75

Fonte: TACONIC, 2004.

Foram fornecidas duas diferentes rações aos animais, adequadas ao consumo de roedores, em que a primeira (ficha técnica em ANEXO A) representou uma dieta convencional e saudável aos animais. A segunda ração (ficha técnica em ANEXO B) era constituída de 15,04% de lipídios (31,52% kcal), 58,5% de carboidratos (54,49% kcal) e 15,03% de proteínas (13,99% kcal) (Rhoister Ltda, Brasil), representando uma dieta hiperlipídica deficiente em colina, de 4,3 kcal/g, apropriada à indução de esteatose hepática não alcoólica.

O delineamento do projeto contemplou cinco grupos experimentais:

- **Grupo CP – Controle padrão:** dieta padrão, não tratado (dez animais);
- **Grupo CD – Controle hiperlipídico + DEN:** dieta hiperlipídica deficiente em colina, com adição de dietilnitrosamina (DEN) na água de beber (quatro animais);
- **Grupo CH – Controle hiperlipídico:** dieta hiperlipídica deficiente em colina, não tratado (cinco animais);
- **Grupo TP – Tratamento profilático:** início simultâneo da dieta hiperlipídica deficiente em colina e tratamento com quercetina (oito animais);
- **Grupo TT – Tratamento terapêutico:** início da dieta hiperlipídica deficiente em colina e após 3 semanas, tratamento com quercetina (seis animais).

O tratamento ao **Grupo CP – Controle padrão** consistiu apenas no fornecimento diário de ração convencional com quantidades reguladas em relação ao peso corporal dos animais. No **Grupo CD – Controle hiperlipídico + DEN**, o tratamento consistiu no fornecimento de ração hiperlipídica e dietilnitrosamina (DEN) (Sigma Chemical, IUPAC nitrosodiethylamine, Missouri, EUA), composto hepatocarcinogênio, diluído na água de beber na dose de 135 mg/L. Aos animais do **Grupo CH – Controle hiperlipídico** foi fornecida somente a ração hiperlipídica.

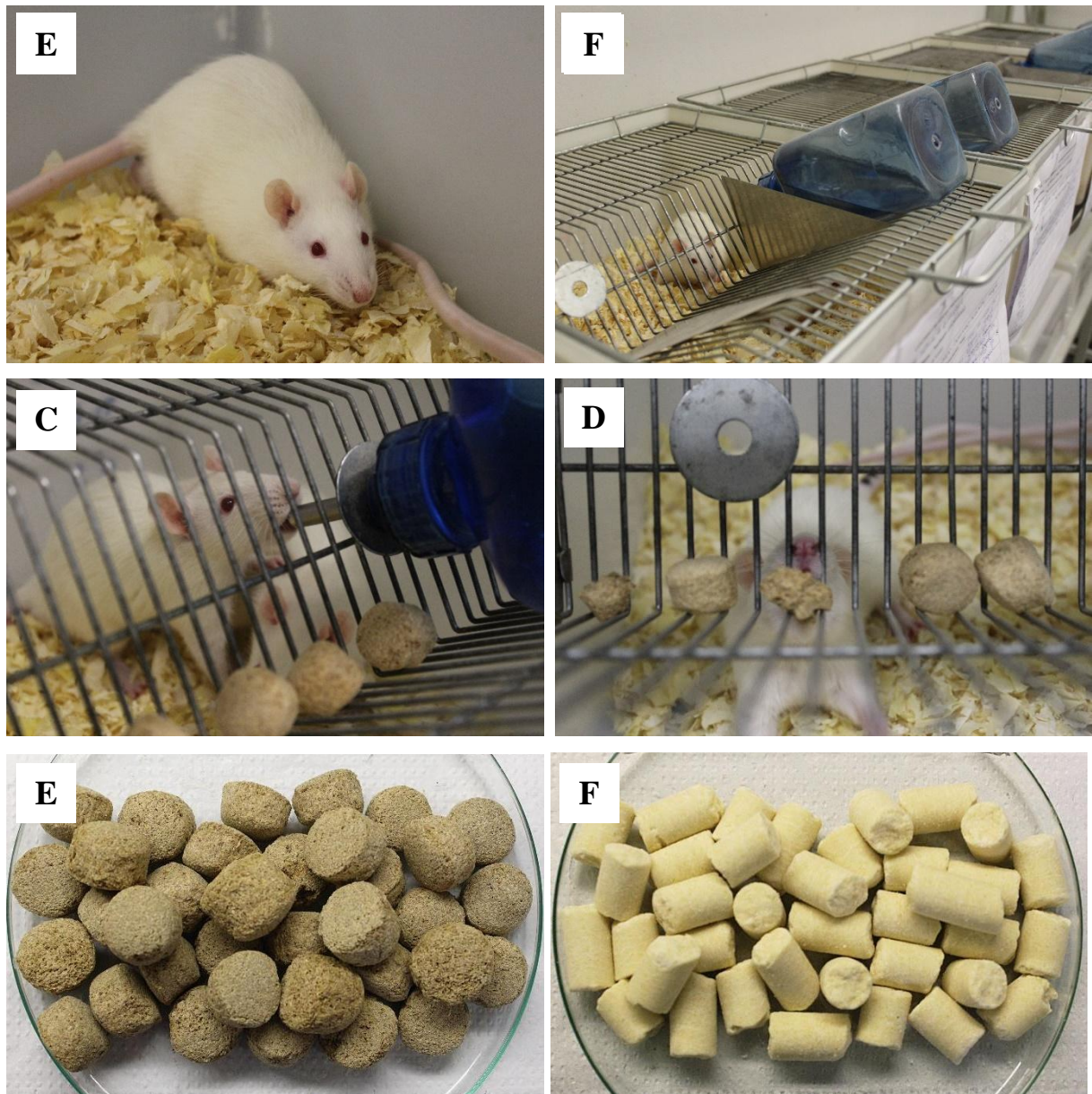
Aos Grupos **TP – Tratamento profilático** e **TT – Tratamento terapêutico**, foi fornecida ração hiperlipídica e aplicado o tratamento com quercetina aos animais, considerando os tratamentos profilático (**Grupo TP**), com intenção de estabelecer medidas preventivas para a preservação do quadro de saúde e evitar a indução de EHNA; e terapêutico (**Grupo TT**), com intenção de remediar ou tratar o estabelecimento de EHNA. A estes grupos, a quercetina (Q4951-10G - Sigma-Aldrich) foi administrada uma vez ao dia via oral através de gavagem, na dose de 10 mg/kg em carboximetilcelulose (CMC) 0,5%.

O tratamento a todos os animais consistiu na manutenção deles em gaiolas com até cinco ratos, e troca regular de cama de maravalha, a depender do tamanho e idade dos animais. Logo, os animais eram agrupados em menor número por gaiolas e a frequência de troca de maravalha aumentava, com o decorrer do tempo de experimento e aumento corporal deles. Durante todo

o experimento todos os animais foram mantidos em condições de temperatura ambiente, fornecimento livre de água e ciclos de claro e escuro de duração de 12 horas (das 7h às 19h).

Todos os animais foram mantidos em ambiente adequado à manutenção de ratos no Biotério de Manutenção e Experimentação de Roedores (UNESP/IBILCE) e tratados nos padrões adequados de variáveis experimentais e higiene, como demonstrado na **Figura 6**.

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).



Fonte: Elaborado pela autora.

Aos grupos **CP**, **CD** e **CH** não houve aplicação do tratamento com quercetina. As intervenções às gaiolas e manuseio dos animais foram realizadas apenas quando necessário, visando minimizar condutas inadequadas que provocassem reações de estresse ou diminuição do bem-estar destes. Aos grupos **TP** e **TT**, a aplicação diária de quercetina via oral por gavagem a 10 mg/kg em carboximetilcelulose 0,5% é representada na **Figura 7**.

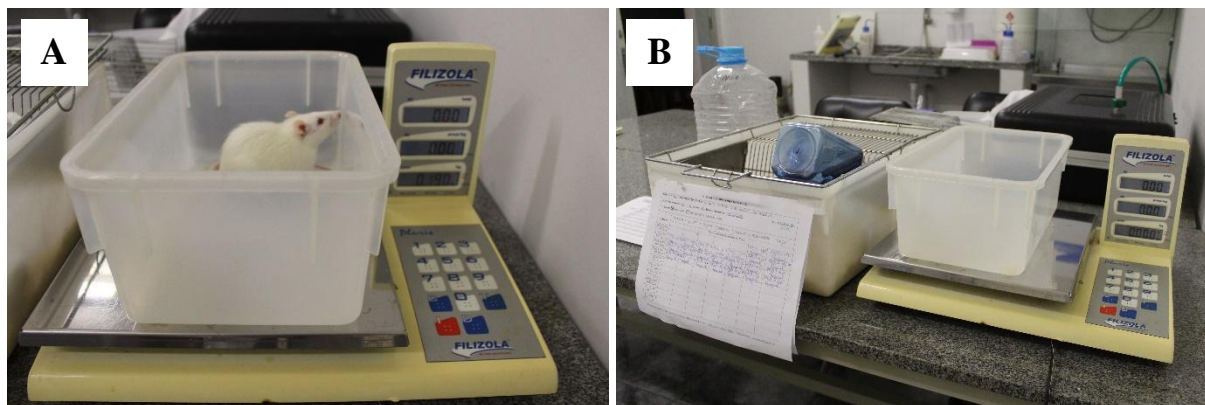
Figura 7 – Gavagem diária de quercetina a 10 mg/kg em carboximetilcelulose 0,5% administrada aos animais do **Grupo TP – Tratamento profilático** e **Grupo TT – Tratamento terapêutico**.



Fonte: Elaborado pela autora.

O ganho de peso dos animais durante o período experimental foi acompanhado pelo registro semanal do peso corporal individual de cada (**Figura 8**). Ao início do tratamento, em 21 dias de vida, os animais do grupos **CP**, **CD**, **CH**, **TP** e **TT** apresentaram peso médio semelhante, considerando a variação natural de peso entre cada animal. Ao final do experimento, foi observada distinção entre o peso médio dos animais com 84 dias de idade, conforme representado na **Tabela 2**.

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.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os animais foram individualmente identificados por marcações de caneta permanente na cauda aos 21 dias de idade e pesagens individuais foram realizadas semanalmente aos 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 e 84 dias de idade. Durante o período experimental, foi então registrado o ganho de peso dos animais e consumo médio de ração. Ao final do período experimental foram calculados: ganho de peso médio diário (GPMD), ganho de peso médio semanal (GPMS), consumo médio diário (CMD), consumo médio semanal (CMS), ganho de peso relativo (GPR), conversão alimentar (CA) e eficiência alimentar (EA), sendo:

GPMD (g) = média do ganho de peso semanal / 7 dias da semana;

GPMS (g) = média do ganho de peso semanal;

CMD (g) = consumo médio diário

CMS (g) = consumo médio semanal

GPR (%) = ((peso final – inicial) x 100) / peso inicial;

CA = consumo de ração / peso do animal;

EA (%) = (peso do animal / consumo de ração) x 100.

Esta análise foi realizada enfatizando três momentos distintos do período experimental com os animais: momento inicial, observando os valores referentes à primeira semana de experimento (dos 21 aos 27 dias de vida dos animais); intermediário, referente à quinta semana de experimento (dos 49 aos 55 dias de vida); e final, referente à nona e última semana de experimento (dos 77 aos 83 dias de vida).

Após o período experimental os animais foram eutanasiados pelo procedimento de inalação de isoflurano com aparelho de anestesia inalatória com ventilação na maleta (DL740 - DeltaLife, Brasil). Segundo a “Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA”, que se refere

aos procedimentos de eutanásia realizados em animais incluídos em atividades de ensino ou pesquisa científica, é preferível a aplicação de métodos químicos, como os inalatórios, para a eutanásia. O isoflurano é considerado o segundo anestésico inalatório mais recomendado a ratos, uma vez que apresenta rápido efeito de inconsciência ao animal e biotransformação de cerca de 0,7% ao ser humano, sendo seguro a quem o manuseia (BRASIL, 2018).

4.2 Coleta de material biológico

No momento anterior à eutanásia, os animais foram individualizados em gaiolas separadas e colheu-se 1 g de fezes de cada em tubos criogênicos, logo mergulhados em nitrogênio líquido e armazenados a - 80 °C. Este procedimento confere preservação do material biológico e é ideal para a posterior análise de metabólitos por ressonância magnética nuclear (RMN), método a ser realizado para identificação dos metabólitos presentes e análise metabolômica das amostras.

Imediatamente após o procedimento da eutanásia, até 4 mL de sangue foi armazenado a 10 °C em tubos plásticos de coleta de processamento de amostras de sangue para análise em soro, com ativador de coágulo e gel separador de fases (DHR – Daher & Daher). O sangue foi então centrifugado durante 20 min a 3000 rpm e teve as duas fases separadas. Parte do soro foi coletado em tubos criogênicos, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a - 80 °C para posterior análise de RMN; outra parte foi mantida em geladeira, à temperatura de 6 °C, para posterior análise de cinética enzimática.

Após coleta do sangue, o fígado do animal foi retirado, lavado em solução salina (NaCl 0,9%), fotografado, pesado e seccionado em fragmentos com destino a: fixação do tecido hepático em solução de paraformaldeído (PFA) e fixação em solução de Bouin, ambos para análise morfohistológica e análise metabolômica por RMN. Os fragmentos de tecido hepático destinados à análise metabolômica foram armazenados em tubos criogênicos imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido e mantidos a - 80 °C até o preparo para análises.

Para inferência do índice de adiposidade dos animais, os tecidos adiposos epididimal, visceral, e retroperitoneal que representam as três maiores porções de gordura do animal, foram bilateralmente dissecados e individualmente pesados. O índice de adiposidade (IA) foi calculado para cada animal como: $IA = 100 \times (\text{soma do peso das gorduras}) / (\text{peso corporal})$ (TAYLOR, 1996). Após registro do peso, a gordura foi descartada.

4.2.1 Análise estatística

Os valores obtidos de peso do fígado e das gorduras foram analisados pelo teste de normalidade *Shapiro-Wilk*, escolhido por demonstrar melhor desempenho em diversas simulações de identificação do tipo de distribuição dos dados amostrais e ser ideal sua aplicação em amostras pequenas, considerando entre 4 a 30 unidades por grupo (MIOT, 2017). Aos conjuntos de dados caracterizados como distribuição normal, ou seja, aos conjuntos de dados paramétricos, foi aplicado o teste estatístico *One-Way ANOVA* e escolhido o teste de *Bonferroni* para comparação de médias (post hoc).

Aos conjuntos de dados considerados não-paramétricos, ou que não foram classificados como distribuição normal segundo o teste de normalidade, foi aplicado o teste de *Kruskal-Wallis ANOVA*. Para todos os testes, diferenças foram consideradas significativas quando o valor resultante de *p* foi menor que 0,05. Todos os testes estatísticos e gráficos foram gerados pelo software OriginPro versão 8.5.1.

4.3 Análises laboratoriais

4.3.1 Cinética enzimática

As amostras de soro sanguíneo foram destinadas à determinação cinética da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), ambas indicadoras de dano hepático. A cinética enzimática foi medida utilizando os Kits ALT/GPT LIQUIFORM (108-4/30) e AST/GOT LIQUIFORM (109-4/30) (Liquiform – Labtest Diagnóstica, Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

O tratamento das amostras foi realizado pela adição de 100 µL da amostra de soro sanguíneo em 800 µL de reagente composto de L-alanina (para ALT) ou L-aspartato (para AST) em combinação com piridoxal fosfato, coenzima derivada da vitamina B6, procedimento que evita resultados falsamente diminuídos em amostras de sangue com deficiência deste. Esta solução (solução A) foi então incubada em banho maria a 37 °C por 5 min e aguardou-se 30 min para a medição.

A cinética enzimática foi medida a 25 °C em espectrofotômetro de luz UV-visível *BioMate 3S UV-Visible Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific) a 340 nm, utilizando água destilada como amostra de referência. À cubeta de quartzo termostatizada a 37 °C foi

adicionado a solução A e 200 μ L de reagente composto de cetoglutarato e NADH. Após homogeneizar a solução, imediatamente se iniciou e registrou 10 leituras de absorvância da amostra com intervalos de 1 minuto, automatizados pelo equipamento. Este teste foi realizado em triplicata para cada amostra de soro sanguíneo e executado até 4 dias após a eutanásia dos animais, período em que a atividade enzimática de ALT e AST permanece estável, quando armazenadas entre 2 – 8 °C.

Para o cálculo dos valores de atividade enzimática (U/L), foi feita a média aritmética das medidas de absorvância em triplicata e a esta aplicada a seguinte equação, indicada pelo fabricante: $((A_1 - A_2) / 2) \times 1746$, em que A_1 = absorvância no tempo 1; e A_2 = absorvância no tempo 2. Obteve-se a média de 10 valores de $(A_1 - A_2) / 2$, relativo a 11 pontos de absorvância, e multiplicou-se este valor por 1746.

4.3.1.1 Análise estatística

Os valores de cinética enzimática foram também estatisticamente analisados pelo teste de normalidade *Shapiro-Wilk* para identificação do tipo de distribuição dos dados amostrais. Da mesma forma que descrito em 4.2.1, aos conjuntos de dados identificados como paramétricos, foi aplicado o teste estatístico *One-Way ANOVA* aos conjuntos de dados não-paramétricos, foi aplicado o teste de *Kruskal-Wallis ANOVA* e teste de *Bonferroni* como post hoc. Para ambos os testes, diferenças foram consideradas significantes se $p < 0,05$. Novamente, os testes estatísticos e gráficos foram gerados pelo software OriginPro versão 8.5.1.

4.3.2 Macroscopia e Microscopia

Aos fígados coletados de cada animal, foi realizada a identificação macroscópica e o registro fotográfico de cada órgão. O processamento do tecido hepático para análises morfohistológicas utilizou fragmentos de fígado de cerca de 1,5 cm^3 em cassetes plásticos identificados e imediatamente imersos por 24h individualmente em dois distintos fixadores: solução de paraformaldeído (PFA), preparada com 20 g de paraformaldeído, 1,14 g de dihidrogenofosfato de sódio monohidratado e 5,75 g de hidrogenofosfato dissódico anidro para 500 mL; e solução de Bouin, preparada com 75 mL de solução saturada de ácido pícrico, 25 mL de formol concentrado e 5 mL de ácido acético. Após a fixação com Bouin, o fígado foi submetido à sucessivas lavagens em álcool 70%, até a retirada do excesso de ácido pícrico, que tingem de cor amarela o material biológico.

Posteriormente, descartou-se de forma apropriada as soluções fixadoras e os cassetes com tecido hepático foram acoplados ao processador automático de tecidos de bancada semifechado (TP1020 – Leica Biosystems) e processado por 6 h, sendo imerso por dois ciclos de 1 h cada em: álcool etílico 100%, xilol e parafina líquida, nesta sequência. Em seguida, foi realizada a inclusão do tecido hepático em parafina e após seu resfriamento e solidificação, foram confeccionados cortes histológicos de 5 μ m de espessura em micrótomo manual (Leica Biosystems).

Os cortes foram distendidos em banho maria a 37 °C, pescados com lâminas silanizadas (pré tratadas com solução de silano 2,5% em acetona) e mantidos por overnight em estufa a 60 °C. Posteriormente os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise morfológica. Os cortes corados foram digitalmente registrados pelo microscópio escaneador de lâminas (BX61VS – Olympus) e analisados no software de visualização de imagens *Olyvia - Olympus Image Viewer*.

4.3.3 Metabolômica por RMN

Para processamentos das amostras biológicas, inicialmente as amostras de soro foram retiradas do armazenamento a -80°C e mantidas em gelo até descongelamento. Em seguida 200 μ L de soro foi adicionado a 400 μ L de tampão salino (0,9% NaCl e 150 μ M de DSS em 10% de D₂O). As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 13.500 g e 4° C e posteriormente 550 μ L de sobrenadante foi transferido aos tubos de 5 mm.

As amostras de fezes foram também retiradas do armazenamento a -80°C e mantidas em gelo. Após descongelamento, 70 mg de cada amostra foi transferido a um tubo com tampa e a este adicionado 700 μ L tampão fosfato (22,6 mM fosfato monobásico, 77,4 mM dibásico, pH 7,4, 150 μ M DSS e 0,01% NaN₃). As amostras foram agitadas em vórtex contínuo por 60 segundos para extração dos metabólitos e centrifugadas por 10 minutos à 16.000 g a 4° C. Posteriormente, 600 μ L do sobrenadante de cada uma das amostras foi transferido para os tubos de RMN de 5 mm.

Após processamento pré-analítico, procedeu a etapa de aquisição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para coleta e avaliação dos perfis metabólicos dos grupos experimentais. Os tubos de ressonância de 5 mm contendo as amostras de soro e fezes dos animais foram individualmente acoplados ao equipamento de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) *Brucker Avance III HD*, operado em 600MHz para o próton ¹H, Magneto

Supercondutor *UltraShieldPlus*, 54mm, de 14,095 Tesla, equipado com Criosondas *TRpleinverse TCI Cryo*. A temperatura das medidas de RMN foi ajustada em 25 °C, e a calibração foi realizada a partir dos deslocamentos químicos do metanol. Os procedimentos de tuning e matching para sintonia do equipamento, locking da frequência do D₂O e shimming de gradiente unidimensional para garantir a homogeneidade do campo magnético serão feitos automaticamente.

Para obter o perfil metabólico correspondente de cada grupo experimental, para cada amostra de soro sanguíneo e fezes foram aplicadas as sequências de pulsos padrão Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) e Overhauser effect spectroscopy (NOESY) para aquisição de espectros ¹H unidimensionais. Um total de 256 acumulações de decaimento livre de indução (*free induction decays* – FID) foi coletado para cada experimento com 32.768 pontos sobre uma extensão espectral de 20 ppm. Para as sequências de pulsos, o tempo de aquisição total foi de 1,49 s com tempo de relaxação de 5 s para CPMG e 2 s para NOESY e o comprimento do pulso de 90° para o próton, calibrado manualmente com um nível de 13 potência de 11 W.

A calibração do pulso ¹H 90° foi padronizada para uma amostra de alta concentração e esse valor padronizado utilizado nas demais amostras. O tempo de mistura da medida de NOESY foi ajustado para 100 ms e o atraso do *spin-echo* do CPMG para 400 μs (para um filtro total de T₂ de 15,6 ms), permitindo uma eficiente atenuação dos sinais de macromoléculas. Todos os FIDs foram multiplicados por uma função exponencial ponderada correspondente a um fator de alargamento de linha de 0,3 Hz, antes da transformada de Fourier.

Todos os espectros de RMN foram referenciados utilizando o composto DSS (0,25 mM, δ = 0 ppm) adicionado na amostra. A fase e linha de base dos espectros ¹H serão corrigidas automaticamente usando o software *TopSpin* versão 3.6.3 (*Bruker GmbH*). As intensidades totais dos espectros foram normalizadas como uma forma de pré-processamento dos dados.

Em adição, experimentos bidimensionais como HSQC e TOCSY serão posteriormente aplicados para determinação do assinalamento estrutural dos sinais dos metabólitos. O procedimento de identificação de metabólitos envolverá a utilização das informações proveniente de banco de dados acadêmicos e de pacote de programas como *Chenomx NMR Suite*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O delineamento experimental foi concluído com dez animais do **Grupo CP – Controle padrão**, quatro animais do **Grupo CD – Controle hiperlipídico + DEN**, cinco animais do **Grupo CH – Controle hiperlipídico**, oito animais do **Grupo TP – Tratamento profilático** e seis animais do **Grupo TT – Tratamento terapêutico**.

A variação do número de animais entre os grupos ocorreu devido à alta mortalidade dos animais modelos, o que foi identificado como dificuldade no sentido da aplicação metodológica científica inicialmente proposta. Ao total, foram à óbito trinta e três animais que apresentavam em comum o tratamento realizado pelo consumo de ração hiperlipídica e ingestão de dietilnitrosamina (DEN) na água de beber (135 mg/L), composto hepatocarcinogênio agravante do quadro de saúde, inicialmente proposto a todos os animais que ingeriram dieta hiperlipídica.

Diante esta situação, o grupo de pesquisa entende que foi necessário intervir com a suspensão do fornecimento de DEN aos animais, uma vez que este não é o agente alvo de indução do quadro de esteatose hepática e sua utilização foi inicialmente proposta para compreender a porcentagem de progressão da doença para quadros de hepatocarcinoma. Esta adaptação metodológica é pensada no sentido de garantir a sobrevivência dos animais e, em acréscimo, realizar a comparação entre grupos com e sem o fornecimento de DEN e identificar as consequências da presença deste composto no organismo vivo.

5.1 Tratamento e desempenho animal

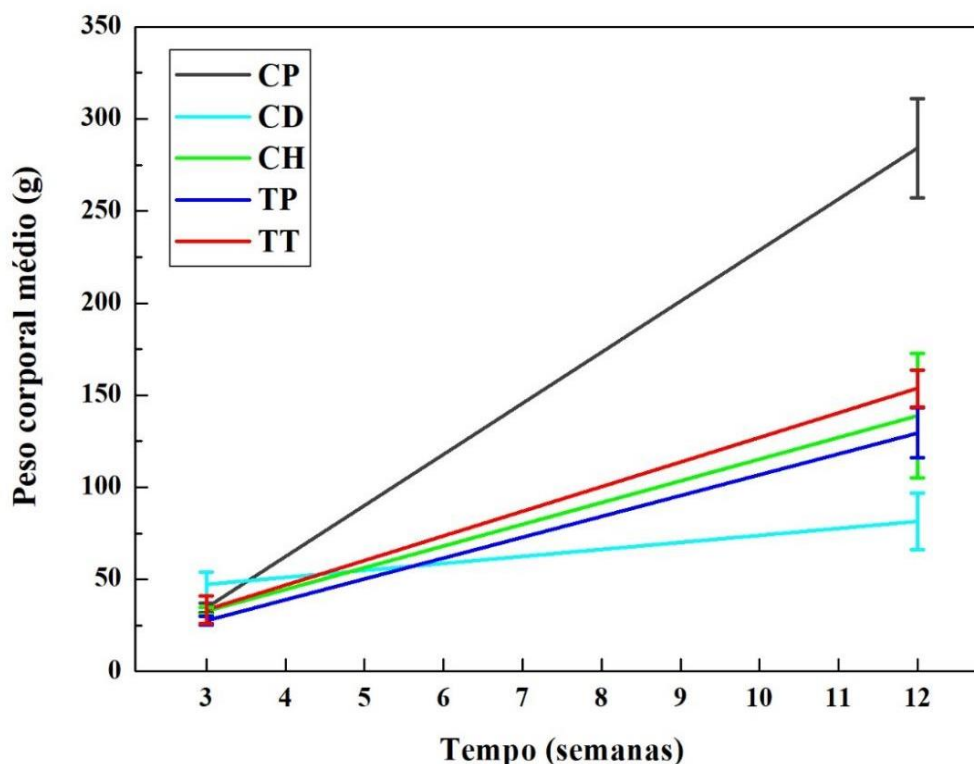
Analisando o perfil médio de ganho de peso dos animais, o **Grupo CP** apresentou crescimento padrão, e o peso final de $284 \pm 26,9$ g se aproxima do valor obtido para o grupo controle de $282 \pm 8,9$ g, segundo Lee e colaboradores (2003). O peso final foi de $81,5 \pm 15,2$ em **CD**, sendo o menor entre os grupos e $138,8 \pm 33,9$, $129,5 \pm 13,5$ e $153,7 \pm 10,0$ em **CH**, **TP** e **TT**, respectivamente, considerados intermediários. O ganho de peso dos animais durante o período experimental foi acompanhado pelo registro semanal do peso corporal individual de cada. Os valores médios de peso inicial e final e desvio padrão são apresentados na **Tabela 2**. As retas de valores absolutos de peso corporal médio inicial e final estão representadas na **Figura 9**.

Tabela 2 – Peso médio inicial e final dos animais e desvio padrão e valores de ganho médio de peso total (GMPT) e relativo (GMPR) dos **Grupos CP, CD, CH, TP e TT**.

GRUPO	Peso inicial (g)	Peso final (g)	GMPT (g)	GMPR (%)
CP	34,7 ± 2,5	284,2 ± 26,9	249,5	719,0
CD	47,5 ± 6,5	81,5 ± 15,2	34	71,6
CH	32,8 ± 2,0	138,8 ± 33,9	106	323,2
TP	27,75 ± 2,3	129,5 ± 13,5	101,75	366,7
TT	33,5 ± 7,5	153,7 ± 10,0	120,2	358,8

Fonte: Elaborado pela autora.

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.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os valores de ganho médio de peso total relativo (GPR) indicam a porcentagem de aumento do peso corporal dos animais ao longo do período experimental. O **Grupo CP**

apresentou valor de 719,0%, o maior entre os grupos, o que reflete os efeitos da ingestão de ração padrão ou convencional, considerada como alimentação nutricionalmente adequada à espécie e fornecida durante a fase de crescimento dos animais.

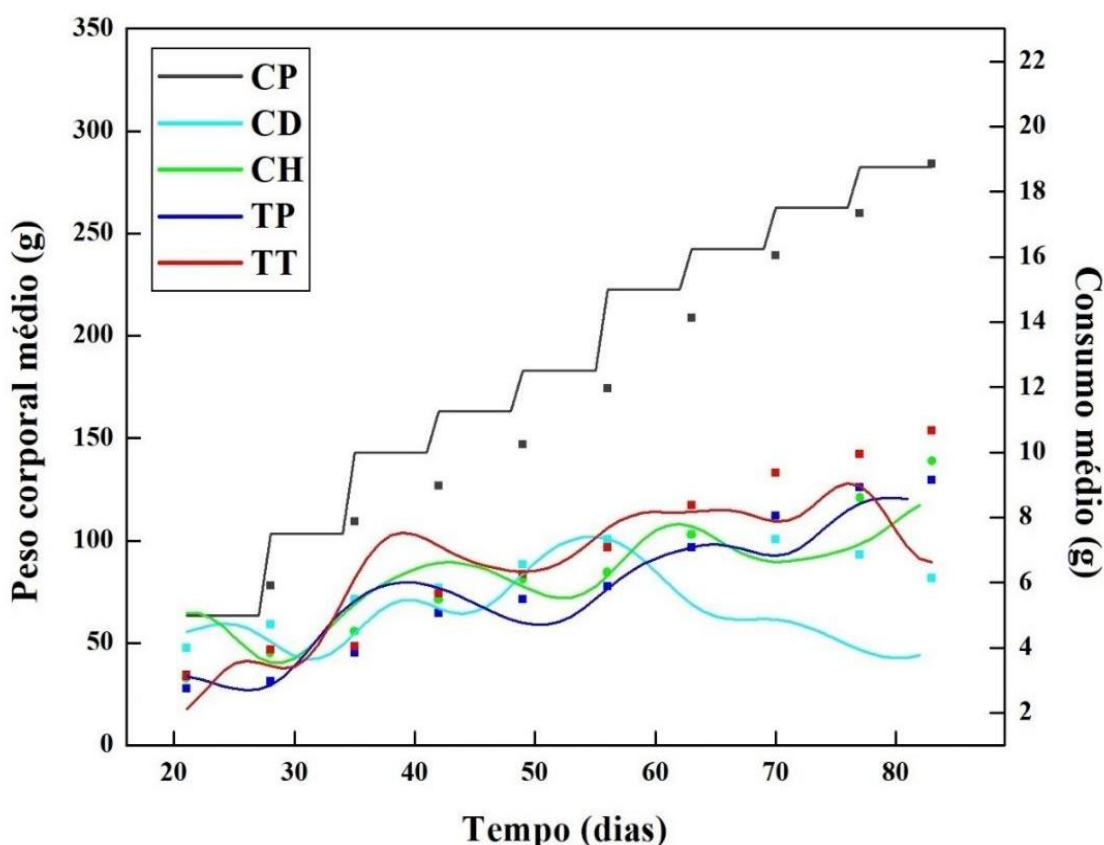
A ingestão de ração do tipo hiperlipídica conferiu aos animais dos **Grupos CD, CH, TP e TT** menores valores de GPR em relação ao valor obtido para o **Grupo CP**. Dentre estes, o **Grupo CD** apresentou menor GPR, de 71,6%, valor que pode ser associado com o efeito de DEN no organismo dos animais combinado ao de dieta hiperlipídica. O **Grupo CH** apresentou valor de GPR de 323,2%, considerado intermediário entre **CP** e **CD**, indicando, no contexto da indução de EHNA, melhora do quadro clínico e consequente maior sobrevida dos animais na ausência da ingestão de DEN.

Os Grupos **TP** e **TT** apresentaram valores de GPR de 366,7 e 358,8 % respectivamente, sendo, portanto, maiores em relação a **CH**. Isso revela os efeitos da quercetina no organismo dos animais, que inclusive foi responsável pelo maior valor de GPR quando administrada durante todo o período experimental, no tratamento profilático (**TP**) em relação ao tratamento terapêutico (**TT**). Uma vez que estes valores se apresentam mais próximos do GPR na condição normal ou saudável, estes resultados demonstram bom indicativo do tratamento com quercetina concomitante à indução de EHNA.

A taxa de ganho de peso analisada identificou no **Grupo CP** uma relação diretamente proporcional à quantidade média de consumo de ração padrão pelos animais, que se manteve em padrão linear crescente durante todo o período experimental (**Figura 10**).

O consumo da ração hiperlipídica para animais dos grupos **CD, CH, TP** e **TT** ocorreu em baixas quantidades em comparação com **CP** e em todos foi observado um padrão flutuante ao longo da duração do experimento, como representado na **Figura 10**. É provável que isso ocorra devido à maior saciedade que o consumo da dieta hiperlipídica ocasiona. O **Grupo CD** apresentou maior redução do consumo nas semanas finais do experimento, evidenciando o efeito debilitante do composto hepatotóxico dietilnitrosamina (DEN) no organismo.

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.



Fonte: Elaborado pela autora.

O desempenho de ganho de peso dos animais em relação ao consumo de alimento foi estabelecido a partir do cálculo das variáveis: ganho de peso médio diário (GPMD), ganho de peso médio semanal (GPMS), consumo médio diário (CMD), consumo médio semanal (CMS), ganho de peso relativo (GPR), conversão alimentar (CA) e eficiência alimentar (EA). Os valores apresentados (**Tabela 3**) são relativos a três momentos distintos do período experimental: inicial, referente à primeira semana de experimento, intermediário, referente à quinta semana e final, referente à nona e última semana.

Durante todo o experimento os animais do **Grupo CP** ingeriram toda a porção de ração padrão fornecida diariamente. Neste grupo, os níveis de ganho de peso (GPMD, GPMS e GPR) e consumo (CMD e CMS) foram os maiores, assim como ilustrado no gráfico representado na **Figura 10**. Nos demais grupos, os animais não ingeriram toda a porção de ração fornecida,

deixando sobras todos os dias. No momento final do experimento, os animais do **Grupo CD** apresentaram o menor consumo de ração e perda de peso representada pelos valores negativos de GPMD, GPMS e GPR, evidenciando um dos efeitos gerados pelo composto hepatotóxico dietilnitrosamina no organismo.

Os animais do **Grupo TP** apresentaram menor consumo de ração e conseqüentemente ganho de peso corporal no período inicial do experimento, possivelmente devido à reação de saciedade provocada pela ingestão diária de até 100 µL de quercetina (10 mg/kg) em carboximetilcelulose 0,5%, solução de textura viscosa. Essa suposição se faz uma vez que o valor de CMD dos animais foi 2,9 g e de GPMD $0,5 \pm 0,4$ g, sendo este um terço comparado a todos os demais grupos que ingeriram ração hiperlipídica, que apresentaram valores próximos na primeira semana: 4,4 g e $1,6 \pm 0,3$ g no **Grupo CD**, 4,6 g e $1,7 \pm 0,8$ g no **CH** e 3,6 g e $1,4 \pm 0,4$ g no **TT**.

Ao decorrer do tempo, entretanto, os animais de **TP** apresentaram aumento progressivo nos valores de consumo e ganho de peso, o que pode estar associado à melhora do quadro clínico em relação à indução de EHNA, estabelecida com o tratamento profilático de quercetina. No **Grupo TT**, no entanto, valores de GPMD, GPMS e GRP reduziram ao final do experimento, ainda que o consumo foi o maior do grupo em relação aos dois momentos anteriores. Esta redução pode estar associada a menor eficácia do tratamento terapêutico com quercetina à indução de EHNA, em relação ao profilático.

No período inicial do experimento, o **Grupo CP** apresentou menor valor de CA e maior de EA em comparação com os demais grupos, indicando que neste momento, o consumo de ração convencional ou padrão foi melhor aproveitado no organismo e convertido em peso corporal. Nos momentos conseqüentes este padrão se inverteu, de modo que **CP** apresentou maior CA e menor EA em relação aos demais grupos. Isso indica que após quatro semanas de consumo de ração hiperlipídica, os animais dos **Grupos CD, CH, TP e TT** passaram a converter maior parte da porção ingerida em peso corporal, provavelmente devido a maior densidade e conseqüentemente peso das células gordurosas em comparação com as células sem acúmulo de gordura.

Tabela 3 – Valores dos **Grupos CP, CD, CH, TP e TT** de consumo médio diário (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).

Período	Grupo	GPMD (g)	GPMS (g)	CMD (g)	CMS (g)	GPR (%)	CA	EA (%)
Inicial	CP	2,0 ± 0,2	14,0 ± 1,6	5,0	35,0	125,6	0,45	223
	CD	1,6 ± 0,3	11,5 ± 2,2	4,4	30,5	24,2	0,52	193
	CH	1,7 ± 0,8	12,4 ± 5,6	4,6	31,9	37,8	0,70	142
	TP	0,5 ± 0,4	3,5 ± 2,9	2,9	20,1	12,6	0,65	155
	TT	1,4 ± 0,4	9,7 ± 2,9	3,6	25,5	39,3	0,55	183
Interme- diário	CP	3,9 ± 0,7	27,4 ± 5,1	12,5	87,5	18,6	0,50	199
	CD	1,7 ± 0,7	12,0 ± 5,0	6,9	48,6	13,6	0,48	207
	CH	0,5 ± 0,4	3,2 ± 2,7	5,7	39,7	3,9	0,47	213
	TP	0,9 ± 0,6	6,3 ± 4,5	4,8	33,7	8,7	0,43	231
	TT	1,9 ± 1,0	13,0 ± 7,0	6,7	46,6	15,5	0,48	207
Final	CP	3,5 ± 0,5	24,2 ± 3,3	18,8	131,3	9,3	0,46	216
	CD	-1,6 ± 1,2	-11,5 ± 8,6	3,8	26,7	-12,4	0,33	305
	CH	2,6 ± 1,3	18,0 ± 9,3	7,8	54,6	14,9	0,39	254
	TP	2,0 ± 1,0	14,0 ± 7,0	8,6	60,2	2,8	0,46	215
	TT	1,6 ± 0,9	11,4 ± 6,2	7,6	53,0	8,0	0,34	290

Fonte: Elaborado pela autora.

No grupo **CP (Figura 11.A)**, todos os animais se mantiveram em boas condições clínicas de saúde durante todo o período experimental, evidenciadas pela cor rosa da pele, excretas em padrão normal de coloração e textura e pêlos robustos e com brilho.

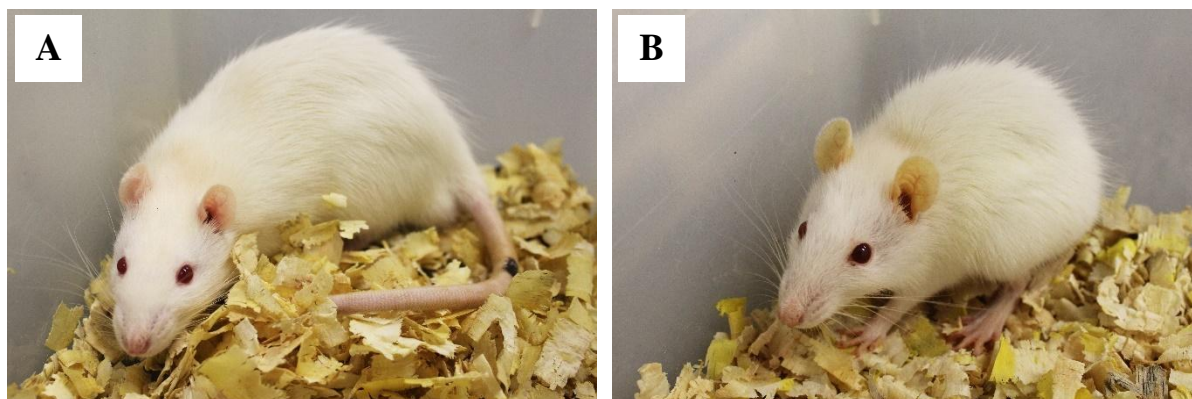
Os animais no grupo **CD (Figura 11.B)** apresentaram ao final do experimento um forte quadro de debilidade e alguns dos sintomas visíveis mais comuns em desarranjos hepáticos e hepatopatias (BRANDÃO, 2017). Foi observado em todos estes animais icterícia, consequência

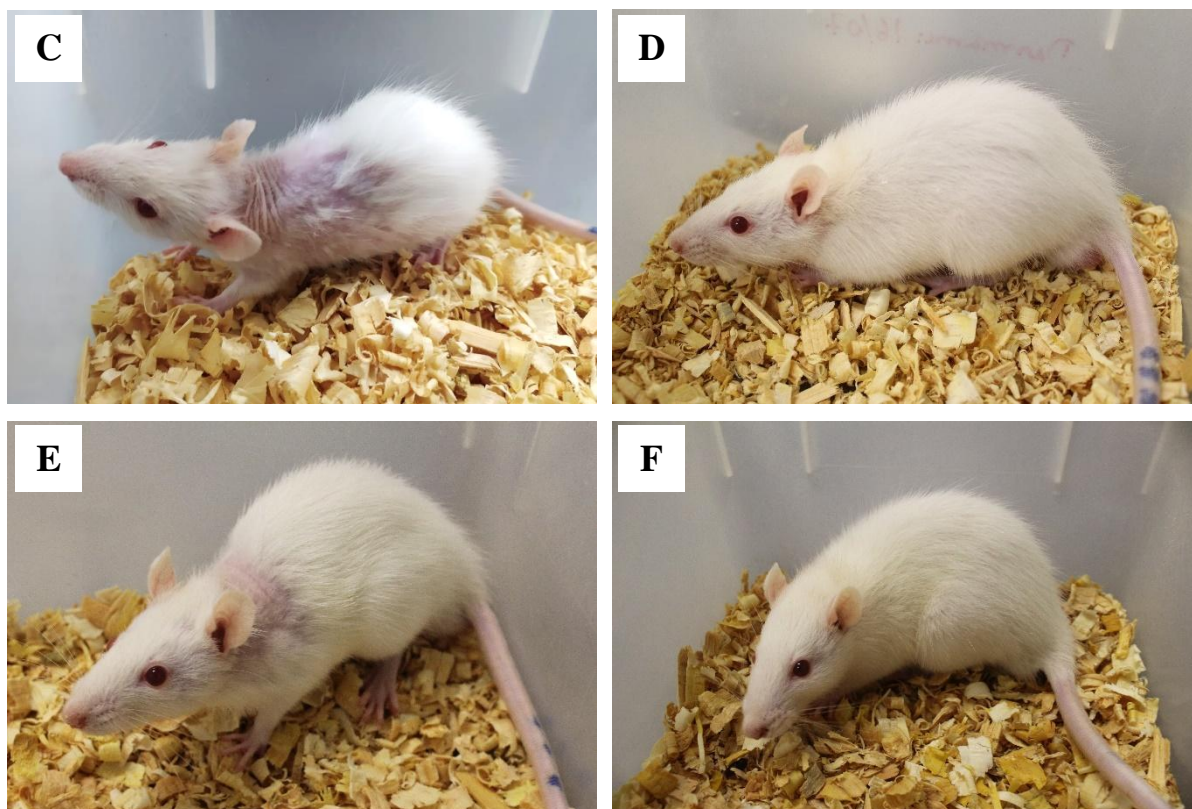
do acúmulo de bilirrubina lipossolúvel no plasma, que se deposita nas membranas celulares dos tecidos quando em excesso, caracterizando a cor amarelada na pele, principalmente nas orelhas, cauda e patas, além de pêlos ralos, arrepiados e opacos.

Os animais do **Grupo CH (Figura 11.C)** também atingiram fortes características de debilidade física, no entanto, apresentaram melhor quadro clínico em relação a **CD**. Estes animais apresentaram perda de pêlos principalmente da região dorsal próxima do pescoço.

Os dois grupos tratados com quercetina apresentaram melhores condições clínicas em relação a todos os demais grupos de dieta hiperlipídica. No **Grupo TP (Figura 11.D)** 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 (**Figura 11.E**) apresentaram perda de pêlos na região dorsal, como visto em **CH** e outros, as características descritas para **TP (Figura 11.F)**. Todos os animais que ingeriram ração hiperlipídica apresentaram colúria, caracterizada pela cor escura da urina e acolia ou hipocolia, fezes de cor esbranquiçada.

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





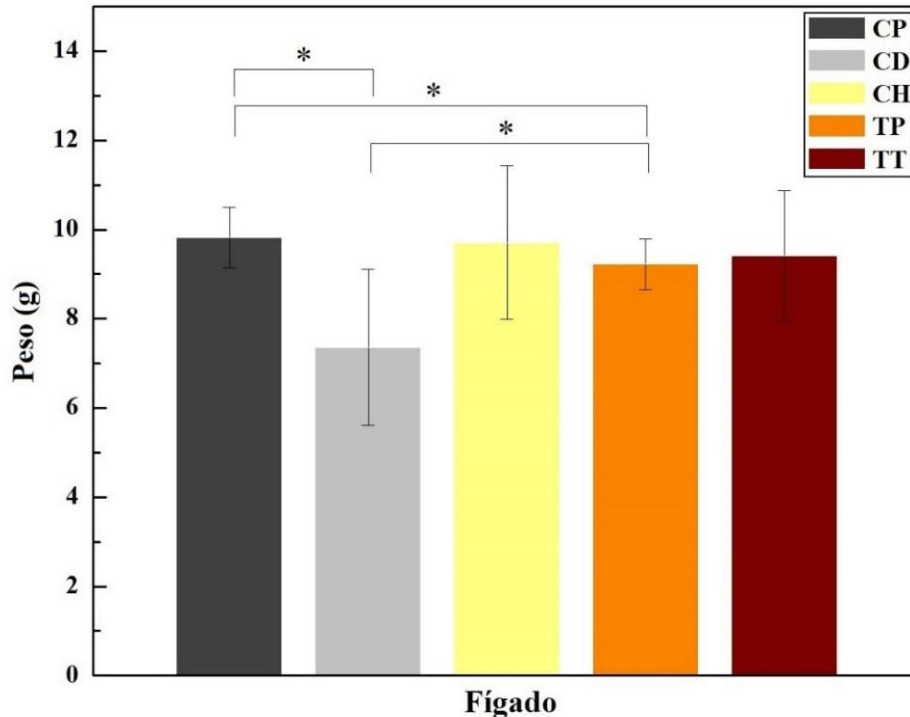
Fonte: Elaborado pela autora.

Além de consumo alimentar e ganho de peso corporal dos animais, foram coletados e analisados valores de peso do fígado dos animais e das gorduras coletadas para inferir índice de adiposidade: epididimal, visceral e retroperitoneal. De acordo com o teste de normalidade *Shapiro-Wilk* aplicados aos dados, os valores de peso do fígado foram classificados como não paramétricos. Logo, foi aplicado o teste estatístico *Kruskal-Wallis* ANOVA. Os resultados são apresentados na **Figura 12**.

No grupo **CP** o peso médio do fígado dos animais foi de $9,8 \pm 0,7$ g, semelhante ao valor de $10,57 \pm 0,53$ g obtido para o grupo controle segundo Lee e colaboradores (2003), indicando um padrão de normalidade. No grupo **CD**, o valor foi de $7,4 \pm 1,7$ g, representando diferença significativa ($p = 0,03$), o que indica que o tratamento com a dieta hiperlipídica e DEN causa além de redução do peso corporal, redução do peso do fígado.

Os animais dos grupos **CH**, **TP** e **TT** apresentaram peso médio do fígado de $9,7 \pm 1,7$ g, $9,2 \pm 0,6$ g e $9,4 \pm 1,4$ g, respectivamente, sem diferença significativa entre si. Estatisticamente, o **Grupo TP** apresentou menor do peso do fígado em relação a **CP**, com $p = 0,02$, e maior peso em relação a **CD**, com $p = 0,02$.

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. * $p < 0,05$.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os conjuntos amostrais de peso das gorduras epididimal, visceral e retroperitoneal foram classificados como dados paramétricos conforme indicado pelo teste de normalidade *Shapiro-Wilk*. Aplicando o teste ANOVA para dados paramétricos e utilizando o teste de Bonferroni para comparação de médias, foi identificada diferença significativa entre os grupos para as três variáveis coletadas, em que se observou um padrão de valores mais altos no **Grupo CP** e mais baixos no **Grupo CD**. Os resultados são apresentados na **Figura 13**.

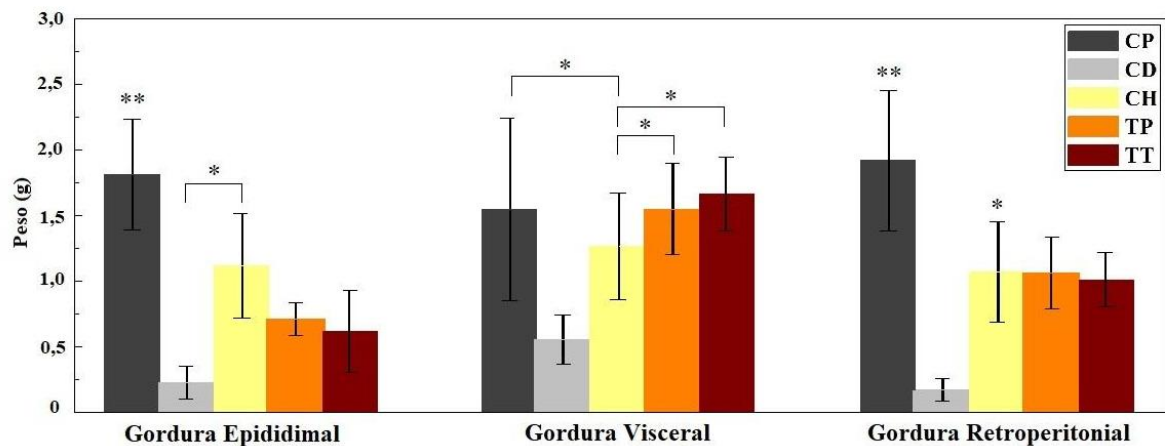
O peso médio da gordura epididimal dos animais dos **Grupos CP, CD, CH, TP e TT** foi, respectivamente, de $1,8 \pm 0,4$ g, $0,2 \pm 0,1$ g, $1,1 \pm 0,4$ g, $0,7 \pm 0,1$ g e $0,6 \pm 0,3$ g. Neste conjunto de dados, o **Grupo CP** foi significativamente maior em relação aos demais, apresentando $p < 0,01$. Os **Grupos CD e CH** também apresentaram diferença, com $p = 0,006$.

Em relação ao peso de gordura visceral, as médias resultantes foram de $1,5 \pm 0,7$ g em **CP**, $0,5 \pm 0,2$ g em **CD**, $1,3 \pm 0,4$ g em **CH**, $1,5 \pm 0,3$ g em **TP** e $1,7 \pm 0,3$ g em **TT**. A análise estatística identificou diferença entre o **Grupo CH** e os **Grupos CP** ($p = 0,03$), **TP** ($p = 0,03$) e **TT** ($p = 0,02$). Isso indica que a porção de gordura visceral dos animais dos grupos em tratamento com quercetina foi similar à condição saudável desta variável, representada no

Grupo CP, podendo ser um indicativo de controle da condição patológica de EHNA e de eficácia dos tratamentos profilático e terapêutico com quercetina.

Os valores de peso médio de gordura retroperitoneal dos **Grupos CP, CD, CH, TP e TT** foram $1,9 \pm 0,5$ g, $0,2 \pm 0,09$ g, $1,1 \pm 0,4$ g, $1,1 \pm 0,3$ g e $1,0 \pm 0,2$ g, respectivamente. Assim como observado para gordura epididimal, para estes dados o **Grupo CP** foi identificado como significativamente maior em relação aos demais, com $p < 0,01$. Além disso, o **Grupo CH** também apresentou diferença em relação aos demais, com $p < 0,05$.

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. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.



Fonte: Elaborado pela autora.

Aplicando aos dados de peso das gorduras epididimal, visceral e retroperitoneal a equação que estabelece o índice de adiposidade ($IA = 100 \times (\text{soma do peso das gorduras}) / (\text{peso corporal})$), o valor médio indicado foi de $1,86 \pm 0,4$ % para **CP**, $1,23 \pm 0,3$ % para **CD**, $2,42 \pm 0,3$ % para **CH**, $2,55 \pm 0,4$ % para **TP** e $2,13 \pm 0,4$ % para **TT** (**Tabela 5**).

Conforme demonstraram Taylor e Phillips (1996), o valor do índice de adiposidade referente a ratos em tratamento com dieta hiperlipídica variou de 3,9 a 18,6 %, sendo estes maiores em comparação aos valores obtidos em ambos os grupos. Isso indica que os valores de IA resultantes dos grupos são relativamente pequenos, indicando baixa porção de gordura corporal. No grupo **CP**, isso pode ser explicado como uma consequência do efeito do consumo da dieta convencional pelos animais, com composição e quantidades adequadas de lipídios. No grupo **CD**, o valor de IA se apresentou ainda menor em relação ao do grupo **CP**. É provável que isso ocorra devido ao efeito do baixo consumo de ração hiperlipídica pelos animais e pela ingestão de DEN. Os Grupos **CH, TP e TT** apresentaram entre os grupos, maiores valores de

índice de adiposidade, evidenciando assim os efeitos da dieta rica em lipídios no organismo, ainda que estes grupos tenham apresentado menor consumo e ganho de peso em relação a **CP**.

Tabela 4 – Valores do índice de adiposidade (IA) dos **Grupos CP, CD, CH, TP e 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.

GRUPO	Gordura			Soma	Peso corporal (g)	IA (%)
	Epididimal	Visceral	Retroperitoneal			
CP	1,81±0,4	1,55±0,7	1,92 ± 0,5	5,28±1,2	284,2±26,9	1,86±0,4
CD	0,22±0,1	0,56±0,2	0,17±0,09	0,96±0,1	81,5±15,2	1,23±0,3
CH	1,11±0,4	1,27±0,4	1,07±0,4	3,45±1,1	138,8±33,9	2,42±0,3
TP	0,71±0,1	1,55±0,3	1,06±0,3	3,33±0,7	129,5±13,5	2,55±0,4
TT	0,62±1,4	1,67±0,3	1,01±0,2	3,29±0,7	153,7±10,0	2,13±0,4

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Cinética enzimática

A determinação da cinética enzimática tem como princípio as reações específicas das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). A reação catalisada por ALT ocorre com a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é em seguida reduzido a lactato pela enzima lactato desidrogenase (LDH) enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD, como é representado na reação em duas etapas:



A reação catalisada por AST é semelhante a este processo, entretanto ocorre com a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato, em que há formação de glutamato e oxalacetato. O oxalacetato é reduzido a malato por ação da enzima malato desidrogenase (MDH), e assim como na reação acima, a coenzima NADH é oxidada a NAD:

I. L-Aspartato + Cetogluturato → AST → Oxalacetato + L-Glutamato

II. Oxalacetato + NADH → MDH → NAD + Malato

A cinética enzimática é então monitorada pelo efeito fotométrico a 340 nm da oxidação do NADH, que é diretamente proporcional à atividade ALT e AST. A velocidade da reação é indicada por várias medidas de absorbância ao longo do tempo, e devido ao consumo de substratos pela enzima e consequente oxidação de NADH, resulta em uma reta descendente.

Aplicando a equação $((A_1 - A_2) / 2) \times 1746$, como indicado pelo fabricante dos kits, sendo que $A_1 - A_2$ representa a diferença média entre os valores de absorbância obtidos a cada minuto, foram obtidos os seguintes valores de atividade enzimática de ALT: $19,9 \pm 0,9$ U/L no **Grupo CP**, $53,2 \pm 1,3$ U/L no **CD**, $27,7 \pm 1,2$ U/L no **CH**, $43,9 \pm 1,8$ U/L no **TP** e $38,3 \pm 1,0$ U/L no **TT**. Os valores de AST foram $45,57 \pm 1,2$ U/L, $52,4 \pm 2,0$ U/L, $54,5 \pm 3,3$ U/L, $53,8 \pm 0,6$ U/L e $58,3 \pm 2,5$ U/L nos **Grupos CP, CD, CH, TP e TT**, respectivamente. Estes resultados estão representados na **Tabela 5**.

Em condições adequadas de tratamento e alimentação, roedores apresentam níveis séricos de ALT e AST naturalmente mais elevados em comparação ao de humanos, sendo que o limite mais baixo de ALT em humanos, de 7 U/L para mulheres e 9 U/L para homens, é significativamente menor que o apresentado pela linhagem *Sprague Dawley*, de 14 U/L em fêmeas e 19 U/L em machos. Da mesma forma, o limite inferior de nível sérico de AST é de 15 U/L em humanos e 59 U/L em *Sprague Dawley* (HE *et al.*, 2017).

Considerando os animais machos, o **Grupo CP** apresentou menor nível sérico de ALT, representando padrão de normalidade em relação aos demais. De acordo com o intervalo de referência adequado de 19 a 47 U/L em machos *Sprague Dawley* (HE *et al.*, 2017), exclusivamente o **Grupo CD** ultrapassou esta faixa de normalidade com o maior valor médio sérico de ALT obtido. O **Grupo CH** apresentou segundo menor nível sérico de ALT e os **Grupos TP e TT**, valores maiores em relação a este, sendo maior no **Grupo TP**, em que houve uso contínuo prolongado de quercetina como tratamento aos animais. Este efeito pode estar associado à repetição diária de gavagem nos animais, que provoca aumento transitório das transaminases hepáticas devido ao estresse gerado, condição indicada principalmente quando níveis de AST em *Sprague Dawley* são maiores que de ALT (HE *et al.*, 2017).

Os valores séricos de AST obtidos se mantiveram dentro do intervalo de referência de 59 a 139 U/L, ainda que apresentando variações entre os grupos. Neste sentido, o **Grupo CP** apresentou menor valor, considerado mais adequado à condição normal, seguido dos valores obtidos nos **Grupos CD, TP, CH e TT**. Altos valores séricos de AST em **TP e TT** demonstram

também indicativo de aumento transitório da eszima devido ao estresse gerado por procedimentos de manuseio dos animais (HE *et al.*, 2017).

Tabela 5 – Valores médios e desvio padrão de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) em unidades por litro (U/L) dos **Grupos CP, CD, CH, TP e TT**.

Transaminase hepática	GRUPO				
	CP	CD	CH	TP	TT
ALT (U/L)	19,9 ± 0,9	53,2 ± 1,3	27,7 ± 1,2	43,9 ± 1,8	38,3 ± 1,0
AST (U/L)	45,57 ± 1,2	52,4 ± 2,0	54,5 ± 3,3	53,8 ± 0,6	58,3 ± 2,5

Fonte: Elaborado pela autora

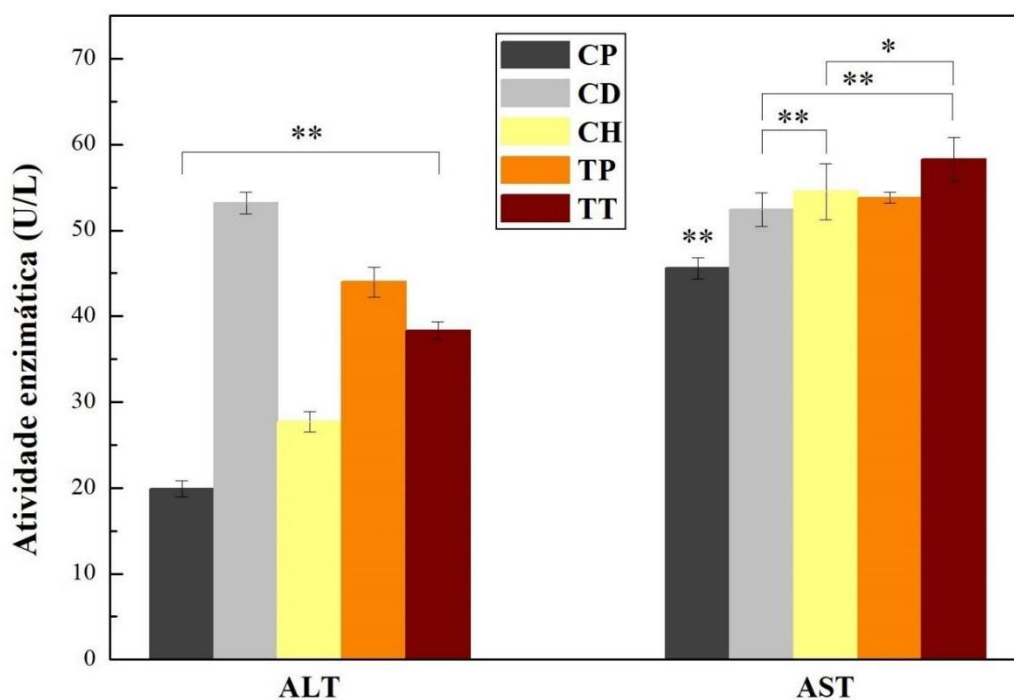
Os valores de cinética enzimática em U/L foram analisados pelo teste de normalidade *Shapiro-Wilk* e os conjuntos de dados de ambas as enzimas estudadas foram considerados não paramétricos. Foi então executado o teste de *Kruskal-Wallis* ANOVA, para dados não paramétricos, que na análise dos valores de ALT indicou diferença significativa entre todos os grupos, com $p < 0,01$ (**Figura 14**).

Aos valores de AST, o **Grupo CP** foi identificado como significativamente menor em relação aos demais, com $p < 0,01$. O **Grupo CD** apresentou diferença em relação ao **CH** ($p = 0,008$) e **TT** ($p = 0,0008$). Os animais dos **Grupos CH e TT** também foram considerados diferentes, com $p = 0,014$ (**Figura 14**).

No grupo **CP**, os valores obtidos de atividade enzimática U/L são próximos da normalidade segundo Lee e colaboradores (2003). Se aproximam do grupo controle analisado neste estudo, em que os valores de ALT e AST foram, respectivamente $15 \pm 2,7$ e $65,5 \pm 6,5$ U/L. O grupo **CD** apresentou mais altos níveis séricos das transaminases hepáticas, especialmente referente à ALT, que indicam lesão hepática celular (LEE *et al.*, 2003).

O índice AST/ALT, empregado no diagnóstico diferencial das hepatopatias, apresenta valor de 2,29 no **Grupo CP**, 0,98 no **CD**, 1,97 no **CH**, 1,22 no **TP** e 1,52 no **TT**. Estes valores indicam que a esteatose hepática não alcoólica não foi instalada nos animais do grupo **CP** e a manifestação da doença é altamente provável no grupo **CD**, uma vez que grandes indícios disso são apontados com valores de AST/ALT inferiores a 1 (ZAMIN, 2002). Nesta definição, os Grupos **CH, TP e TT** não se enquadram no quadro clínico patológico de EHNA, no entanto, todas estas suposições apenas foram confirmadas após análise morfohistológica do fígado dos animais.

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



Fonte: Elaborado pela autora.

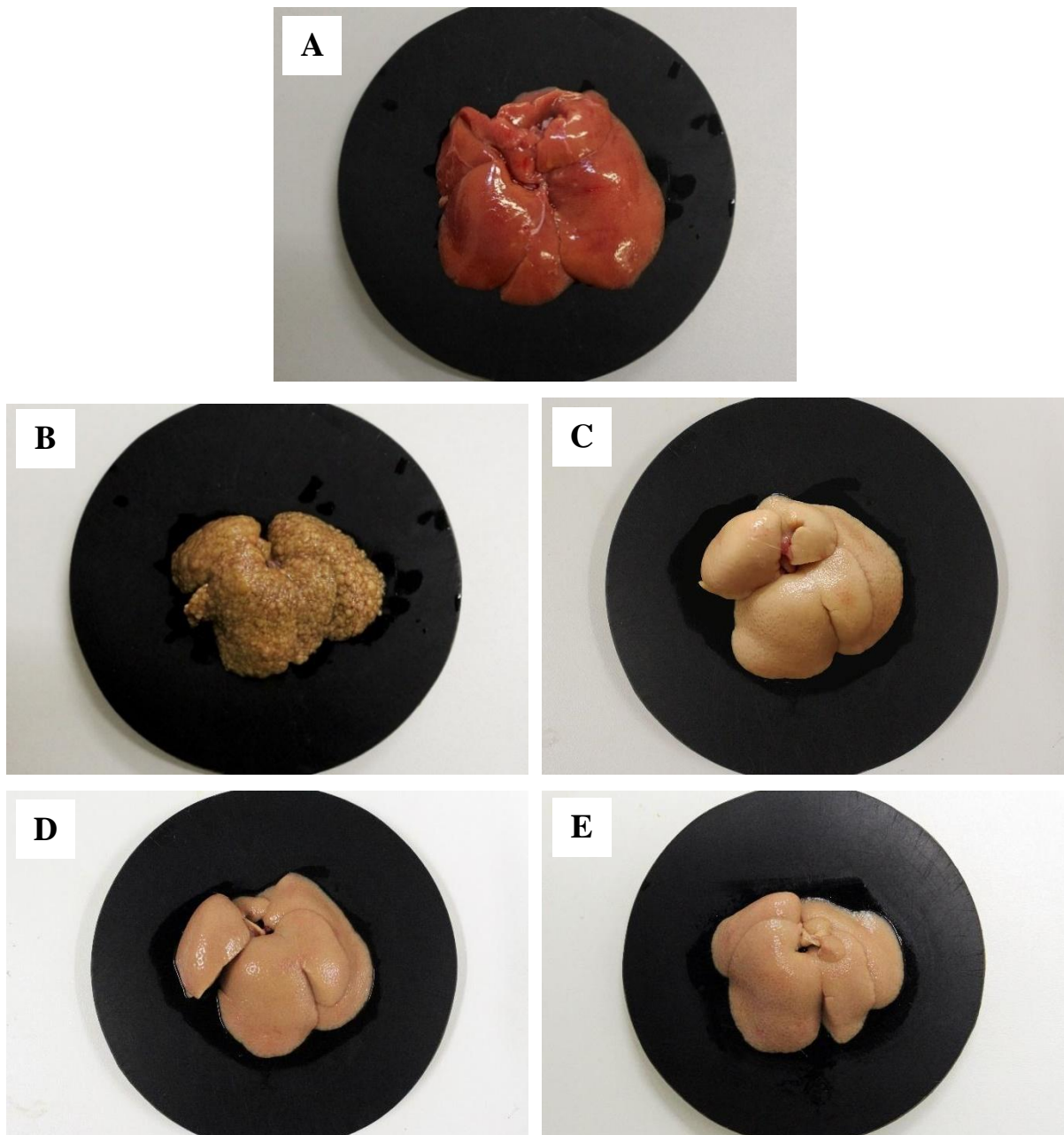
5.3 Macroscopia e Microscopia

A coleta do fígado dos animais foi realizada imediatamente após o procedimento de eutanásia. Considerando análise macroscópica, o fígado dos animais do **Grupo CP (Figura 15.A)** foi considerado um órgão saudável em padrões comuns de anatomia e morfologia, por apresentar lobos normais, forte cor vermelha, tamanho normal e peso regular de $9,8 \pm 0,7$ g.

O fígado dos animais do **Grupo CD (Figura 15.B)** no entanto, apresentou forte cor amarelada e o órgão preenchido por muitos nódulos de aspecto firme ou fibroelástico, indicando grave comprometimento do tecido por esta condição patológica. Os lobos hepáticos do **Grupo CD** se demonstraram normais e houve redução do peso médio para $7,4 \pm 1,7$ g.

Os animais dos **Grupos CH, TP e TT (Figura 15.C, 15.D e 15.E)** apresentaram fígado macroscopicamente semelhante entre si, pela aparência pálida do órgão, distoando da cor vermelha natural do tecido, e também da amarela, presente em **CD**. O fígado apresentou consistência mole, como mais próxima da condição normal e peso médio regular de $9,7 \pm 1,7$ g em **CH**, $9,2 \pm 0,6$ g em **TP** e $9,4 \pm 1,5$ em **TT**.

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



Fonte: Elaborado pela autora.

Em relação ao processamento histológico do fígado, foram obtidos melhores resultados de fixação do tecido hepático com a utilização de Bouin. As lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina (HE) evidenciaram no **Grupo CP** o tecido constituído por hepatócitos de formato poligonal e morfologicamente normais formando cordões radiais como composição de cada lóbulo hepático. É possível identificar a presença dos vasos anatomicamente normais como a veia central no centro dos lóbulos.

No **Grupo CD** foi possível identificar histologicamente o estabelecimento de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), uma vez que por estimativa visual, mais de 5% dos hepatócitos foram acometidos sendo, portanto, clinicamente significativa. Em adição, a presença de injúria do tipo balonizante nos hepatócitos e inflamação infiltrada nos lóbulos que compõem o tecido classifica a condição clínica observada nos animais em esteatose hepática não alcoólica (EHNA) (BEDOSSA *et al.*, 2012).

A esteatose foi identificada predominantemente como do tipo macrovesicular, lesão característica de EHNA, em que uma grande gotícula de gordura ocupa o citoplasma celular, deslocando o núcleo e as organelas para os limites celulares. Em menor incidência, houve o estabelecimento também da esteatose do tipo microvesicular, onde há presença de pequenas gotículas lipídicas e núcleo na região central da célula (BROWN & KLEINER, 2016).

A presença das gotas lipídicas no interior celular provocou a degeneração do tipo balão nos hepatócitos de animais do **Grupo CD**, caracterizadas como células balonizantes, em que perdem seu formato poligonal e passam a ser distendidas e esféricas. Esta alteração gera disfunção dos microtúbulos e alteração da secreção proteica (BROWN & KLEINER, 2016).

Ainda no **Grupo CD**, foi observado que os hepatócitos não se dispõem radialmente em relação à veia central no lóbulo, como no **Grupo CP**. Há um arranjo aleatório das células, indicando reorganização celular após injúria e danos causados ao fígado (BROWN & KLEINER, 2016). Foi identificada a presença de tecido conjuntivo em arranjo de septos fibrosos entremeando a arquitetura desorganizada dos lóbulos hepáticos. Comumente, foi observado que os septos partem do espaço porta e se dispõem entre os lóbulos hepáticos, subdividindo-os, quais são denominados pseudolóbulos e os torna não-funcionais.

Os septos fibrosos densos são desenvolvidos no processo de cicatrização em resposta à determinado dano hepático constante, portanto crônico. O estabelecimento deste tipo de fibrose que preenche o fígado de forma difusa, altera a arquitetura hepática e eventualmente também sua função na tentativa de regeneração dos hepatócitos, causa insuficiência hepática e hipertensão porta e é caracterizado como cirrose hepática (ANDRADE, 2005). A cirrose é então caracterizada pela substituição difusa da estrutura hepática normal por nódulos de estrutura anormal circundados por fibrose e é o estado final comum de processos patológicos de diversas etiologias, que incluem as disfunções metabólicas como EHNA (IIDA *et al.*, 2005). Portanto, os animais do **Grupo CD** apresentaram o desenvolvimento de cirrose.

Além disso, foi identificada a presença de infiltrados inflamatórios mistos com distribuição lobular, predominantemente próxima aos espaços porta. O infiltrado lobular presente em EHNA é composto principalmente por uma mistura de linfócitos CD4 e CD8 com

agregados de células de Kupffer espalhados, denominados microgranulomas (BROWN & KLEINER, 2016).

De acordo com o algoritmo histopatológico de Bedossa e colaboradores (2012) o fígado dos animais do **Grupo CD** foi identificado como característico de EHNA, sendo distinto de DHGNA pela presença de esteatose e por apresentar as seguintes classificações: balonamento em grau 1 (presença de aglomerados de hepatócitos com forma arredondada e citoplasma claro, geralmente reticulado) e inflamação lobular em grau 1 (presença de 2 focos de inflamação em aumento de 20x).

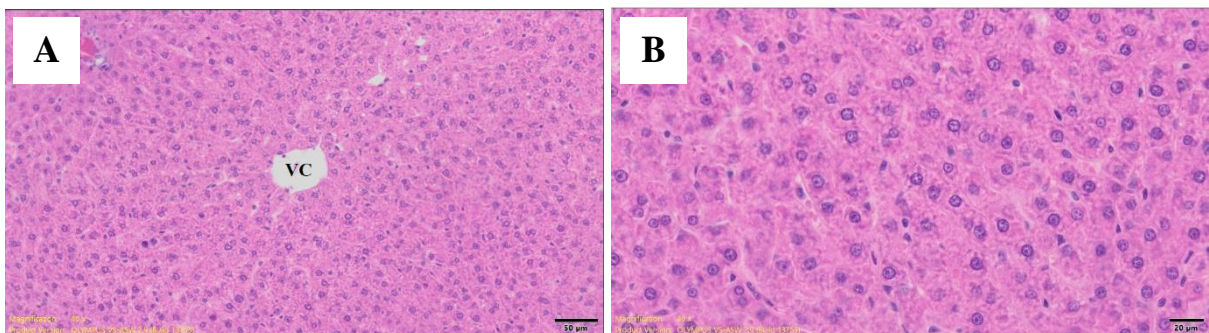
O tecido hepático dos animais representantes dos **Grupos CH, TP e TT** também apresentou estabelecimento de EHNA pela presença de esteatose macrovesicular, na maior extensão hepática e lesões balonizantes em parte dos hepatócitos. Foi identificada a presença de septos fibrosos e focos de infiltrados inflamatórios em **CH**, sendo menos frequentes na extensão tecidual em relação ao **Grupo CD** e mais em relação aos **Grupos TP e TT**, em que os animais foram tratados com quercetina.

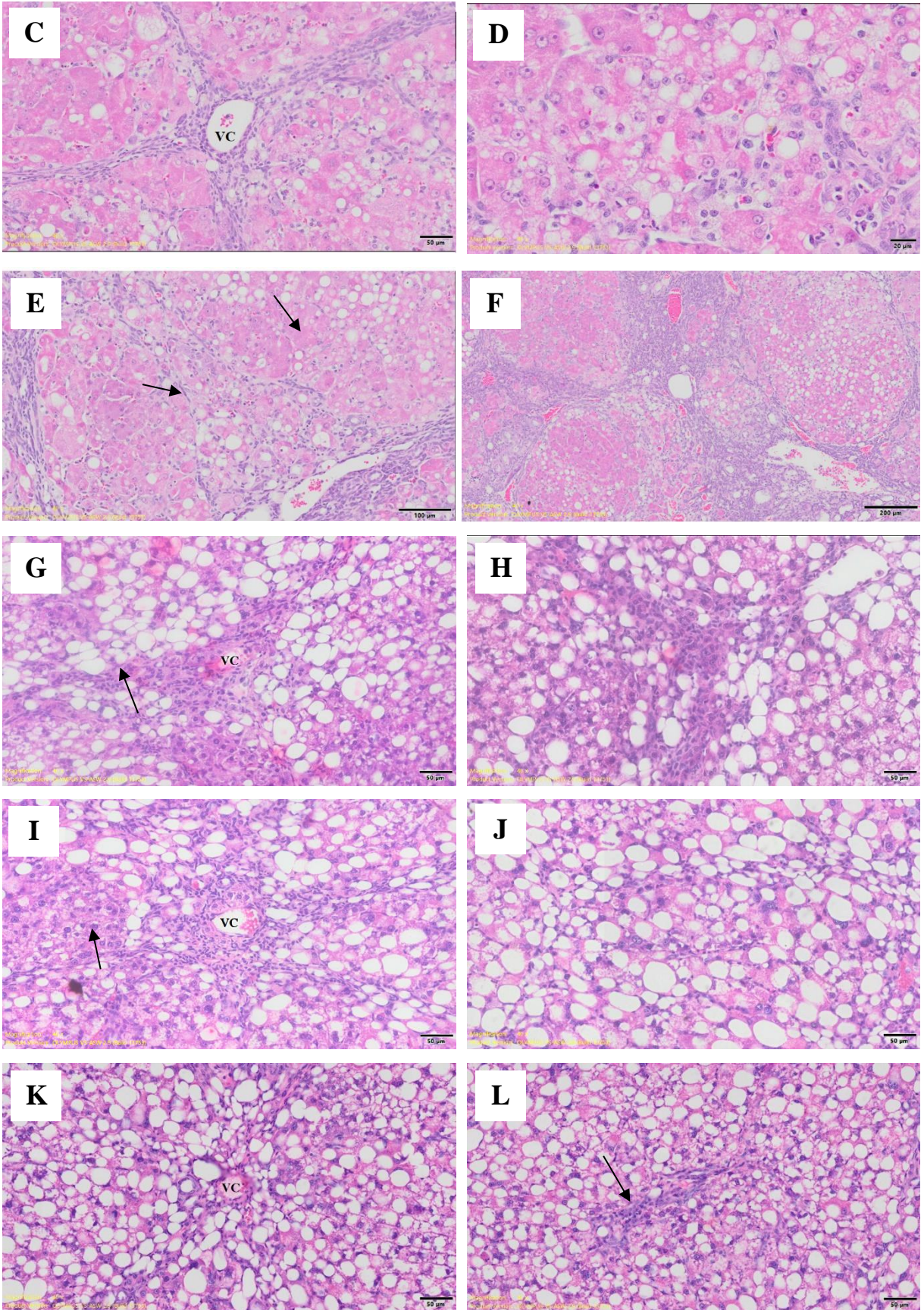
No **Grupo TP**, em que a quercetina como tratamento foi administrada aos animais desde o início do experimento, não foi identificada fibrose na maior parte da extensão tecidual, principalmente relacionadas aos espaços porta. Observou-se pequenos focos de início do desenvolvimento da fibrose na região lobular de alguns animais, considerando as variações normais de características histológicas entre cada organismo. O tecido hepático apresentou nos espaços porta intensa atividade inflamatória pela presença de células imunes, que precede o desenvolvimento da fibrose, sendo possível associar este efeito à ação da quercetina como molécula antifibrótica na indução de EHNA, uma premissora suposição. Além disso, foi possível observar a preservação de quantidade considerável de hepatócitos sem injúria do tipo balinizante e, portanto, de morfologia normal.

Ainda que a quercetina foi administrada como tratamento terapêutico no **Grupo TT**, os resultados obtidos foram semelhantes aos de **TP**, em destaque pela redução considerável de fibrose no tecido hepático, com exceção de pequenos focos de início do desenvolvimento da fibrose em alguns animais. Neste grupo, a esteatose macrovesicular foi predominante na extensão total do tecido, no entanto foi também observada a preservação de parte dos hepatócitos sem lesões, em menor quantidade em relação ao **Grupo TP**, possivelmente pelo menor tempo de tratamento e por este ter início após estabelecimento de EHNA nos animais. Foram também observadas regiões de intensa atividade inflamatória, indicando proteção ao desenvolvimento da fibrose em consequência à EHNA estabelecida.

Assim, a análise histológica hepática dos **Grupos TP e TT** concluiu que 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. As imagens do tecido hepático estão apresentadas na **Figura 16**.

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.





Fonte: Elaborado pela autora.

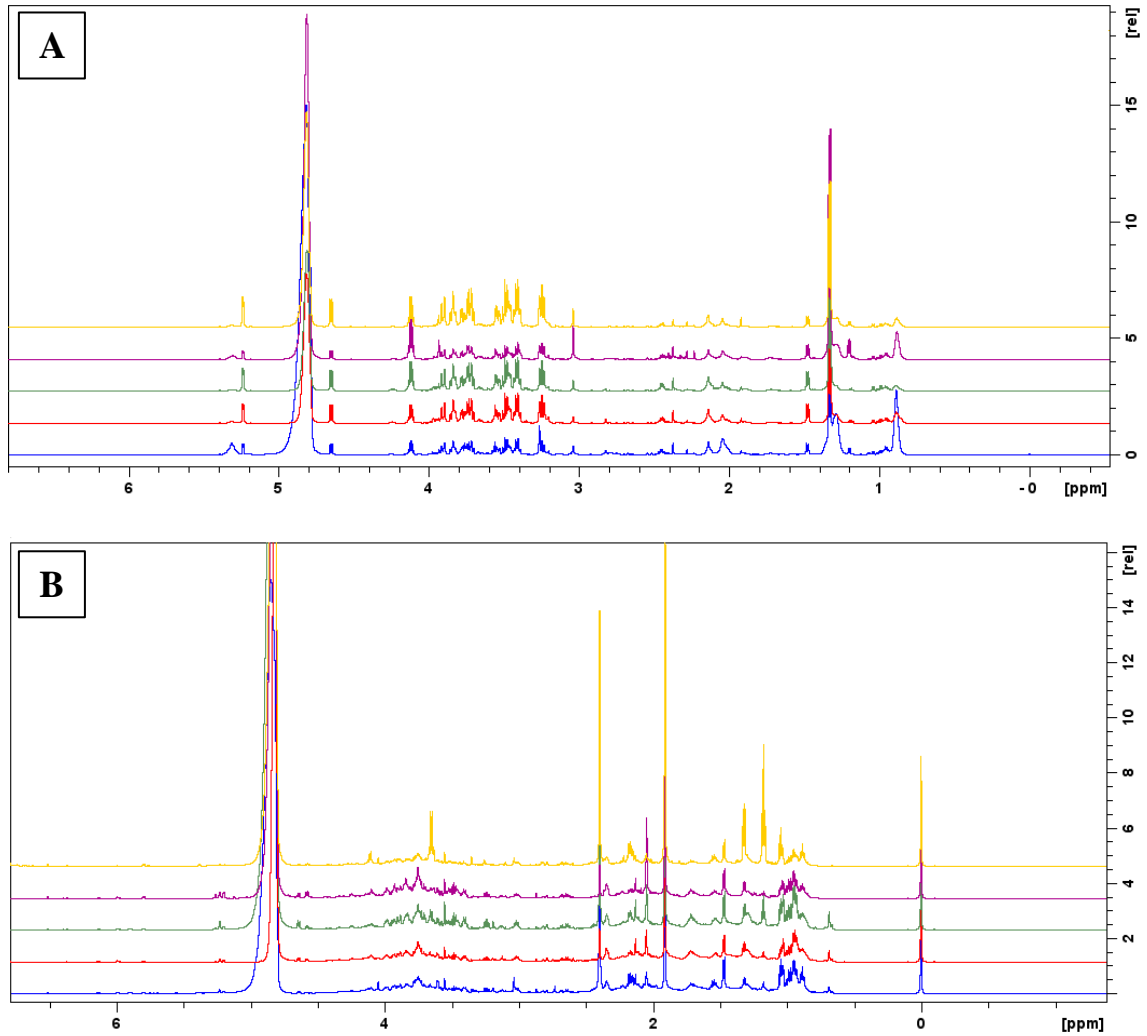
5.4 Metabolômica por RMN

Os espectros unidimensionais de CPMG (**Figura 17**) e NOESY foram coletados a partir das amostras de soro sanguíneo e fezes dos animais. A fim de ilustração, cada espectro das imagens corresponde a um animal do grupo para representação dos grupos experimentais. Os resultados de CPMG apresentaram, diferenças consistentes dos espectros entre os grupos para amostras de soro sanguíneo em 0,8, 1,3, 1,4, 1,9 a 2,4, 3,0 a 4,1, 4,6, 4,8 e 5,2 ppm e para amostras de fezes em 0,8 a 2,3, 3,0 a 3,7 e 4,8 ppm.

Experimentos bidimensionais como HSQC e TOCSY serão posteriormente aplicados para determinação do assinalamento estrutural dos sinais dos metabólitos presentes nas amostras. O procedimento de identificação de metabólitos envolverá a utilização das informações proveniente de banco de dados acadêmicos e de pacote de programas como *Chemomx NMR Suite*.

A análise de metabólitos por RMN é muito promissora por ter como objetivo a identificação de biomarcadores metabólicos de diagnóstico que estejam envolvidos na progressão da EHNA para fibrose hepática ou cirrose e que respondam à modulação e alteração do processo inflamatório no fígado pelo uso contínuo da quercetina. A partir deste *screening* de metabólitos, será possível elucidar melhor a via metabólica associada ao desenvolvimento da doença e propor formas de detecção não invasivas desta, ainda não propostas, uma vez que este mecanismo se dá através de coleta de biópsia hepática. Além disso, os resultados podem contribuir para o futuro desenvolvimento de mecanismos de profilaxia e tratamento de EHNA, sendo, portanto, de extrema relevância.

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



Fonte: Elaborado pela autora.

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 Vascular 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.

ANEXO A – Ficha Técnica da Ração convencional ou padrão

AGROMIX LABMIX RATOS E CAMUNDONGOS

Indicação: RAÇÃO EXTRUSADA PARA ANIMAIS DE LABORATORIO (Ratos, camundongos e hamsters de laboratorio.) Produto indicado para ser autoclavado

Composição básica do produto:

Acido fólico; BHT (Hidróxido de tolueno butilado); Biotina; Calcario Calcítico; Cloreto de Sódio (Sal Comum), Dextrina; Farelo de Arroz; Farelo de Soja*; Farelo de Trigo; Farinha de carne e ossos; Farinha de peixe; Feno de Gramíneas; Fosfato Bicalcico; Iodato de Calcio; Lisina; Metionina; Cloreto de colina; Milho Integral Moido*; Niacina; Oleo de Soja degomado; Óxido de magnésio; Pantotenato de Calcio; Selenito de sodio; Sulfato de Cobalto; Sulfato de Cobre; Sulfato de Ferro; Sulfato de Manganês; Sulfato de Zinco; Vitamina A; Vitamina B1; Vitamina B12; Vitamina B2; Vitamina B6; Vitamina D3; Vitamina E; Vitamina K3. Especies doadora de genes: Zea Mays e/ou bacillus thuringiensis

MODO de USAR:

Oferecer a vontade. Consumo aproximado: camundongos 4 a 5 g/dia; ratos 12 a 30 g/ dia dependendo do tamanho e espécie; hamster 10 a 14 g/dia. Uso proibido na alimentação de ruminantes

NÍVEIS DE GARANTIA POR kg DO PRODUTO

Acido fólico (Mínimo) 12,00 mg/kg, BHT antioxidante (Mínimo) 100,00 mg/kg Biotina(Mínimo) 0,12 mg/kg, Calcio (Mínimo) 12,00 g/kg, Calcio (Maximo) 14,00 g/kg; Cobalto (Mínimo) 2,00 mg/kg; Cobre (Mínimo) 30,00 mg/kg; colina(Mínimo) 1600,00 mg/kg, Extrato Etéreo (Mínimo) 40,00 g/kg; Ferro (Mínimo) 183,00 mg/kg; Fosforo (Mínimo) 8000,00 mg/kg; Iodo (Mínimo) 1,00 mg/kg; Lisina (Mínimo) 12,50 g/kg; magnésio(Mínimo) 500,00 mg/kg; Manganês (Mínimo) 110,00 mg/kg; Materia Fibrosa (Máximo) 55,00 g/kg; Materia mineral (Máximo) 100,00 g/kg; Metionina (Mínimo) 3.400,00 mg/kg; niacina(Mínimo) 210,00 mg/kg, Pantotenato de Calcio (Mínimo) 80,00 mg/kg; Proteina Bruta (Mínimo) 230,00 g/kg; Selenio(Mínimo)0,20 mg/kg; Sódio (Mínimo) 1.600,00 mg/kg; Umidade (Máximo) 125,00 g/kg; Vitamina A (Mínimo) 25.000,00 UI/kg; Vitamina B1 (Mínimo) 12,50 mg/kg; Vitamina B12 (Mínimo) 40,00 mcg/kg; Vitamina B2 (Mínimo) 12,00 mg/kg; Vitamina B6 (Mínimo) 20,00 mg/kg; Vitamina D3 (Mínimo) 4000,00 UI/kg; Vitamina E (Mínimo) 80,00 UI/kg; Vitamina K3 (Mínimo) 6,5,00 mg/kg; Zinco (Mínimo) 100,00 mg/kg.

Datas de fabricação:

Lote :

Data de validade:

MODO de CONSERVAÇÃO

Eventuais Substitutos:

Girassol, Feno de alfafa,

Farelo de germen de milho.

Armazenar em lugar seco arejado, sobre estrado, afastado de parede, e devidamente embalado.

PRAZO de VALIDADE: 180 dias após data de fabricação, observada condições de conservação Produto Isento de registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - RTPI

AGROMIX IND. E COM.de ALIM. Ltda.

Rodovia Carlos Tonani SP 333, Km 121,05 -

Chácara Sta. Clara - Caixa Postal 507 Cep:14890-500

Telefax: (16) 3202 25 95 Jaboticabal-SP

CNPJ: 55.278.220 / 0001-73 - I.E: 391.021.685.117

INDUSTRIA BRASILEIRA - MARCA REGISTRADA

PESO LIQUIDO 20 kg



ANEXO B – Ficha Técnica da Ração hiperlipídica deficiente em colina

RHOSTER



Dieta Hiperlipídica M deficiente em Colina

RH19576

Perfil Calórico	%	% kcal
Proteína	15,03	13,99
Carboidrato	58,5	54,49
Gordura	15,04	31,52
Colina 207,41mg/kg	***	***
Dieta 4,3kcal/g	***	***

*Dieta Purificada para Indução de Obesidade e Esteatose Hepática.

*Produzida em Pellet - pacotes de 1kg

*Quantidade mínima 3kg

*Prazo de Entrega: até 15 dias úteis

Ingredientes

Caseína Láctea, Amido de Milho, Amido Dextrinizado, Óleo de Soja, Gordura Animal, Colesterol Sigma, Celulose, Mix Mineral RH9502*, Mix Vitamínico RH9503**, Sacarose P.A., Tert-Butilhidroquinona (TBHQ) Sigma-Aldrich.

Mais Informações

*Mix Mineral AIN-93M

**Mix Vitamínico AIN-93

***Resultados calculados a partir da análise de um determinado lote fabricado.

Produzida em pellet ou pó

RHOSTER INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA.

Av.Ministro Antonino Vieira do Amaral, 1556 - Cx.P.46 - Jd.Salete - Araçolaba da Serra/SP - CEP: 118190-000

Fones: (15) 3281-3037 / (15) 3281-4748 - CNPJ 00.984.204/0001-04 - Inscr.Estadual 178.070.220.114