

Universidade Federal de Juiz de Fora
Mestrado em Saúde

Marcella Martins Terra

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA QUERCETINA SOBRE O FÍGADO E RIM DE
RATOS WISTAR COM SÍNDROME METABÓLICA INDUZIDA**

Juiz de Fora

2013

Marcella Martins Terra

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA QUERCETINA SOBRE O FÍGADO E RIM DE
RATOS WISTAR COM SÍNDROME METABÓLICA INDUZIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, área de concentração: Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vera Maria Peters
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª Hélydy Sanders Pinheiro

Juiz de Fora

2013

Marcella Martins Terra

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA QUERCETINA SOBRE O FÍGADO E RIM DE
RATOS WISTAR COM SÍNDROME METABÓLICA INDUZIDA**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Saúde, área de
concentração: Saúde Brasileira, da
Universidade Federal de Juiz de Fora,
como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre.

Aprovada em 05/08/2013

Prof^ª. Dr^ª. Ana Eliza Andreazzi

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof^ª. Dr^ª. Helady Sanders Pinheiro

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof^ª. Dr^ª. Taiza Stumpp Teixeira

Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Aos meus pais pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional. A Professora Vera M. Peters sem a qual não teria sido possível ter alcançado este objetivo em minha vida

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ser fonte inesgotável de força e amor.

À professora Dr^a. Vera Maria Peters pela orientação, total confiança depositada em mim desde minha chegada ao CBR, por todo incentivo e dedicação em transmitir seus conhecimentos, por nunca medir esforços em me ajudar a realizar nosso trabalho. Posso dizer que grande parte do que me tornei, é graças à senhora.

À professora Dr^a. Martha de Oliveira Guerra, pela paciência e constante apoio, sempre disposta a orientar e ensinar de forma magnífica.

À professora Dr^a. Helady Sanders Pinheiro, pela colaboração imprescindível na realização desse trabalho, orientação e por contribuir para o meu crescimento profissional.

À professora Dr^a. Taiza Stump por nos receber tão bem em seu laboratório e estar sempre disposta a contribuir.

Ao Hussen por total dedicação na realização do nosso trabalho, pela disposição em dividir as dificuldades, e pela amizade.

Ao Pedro que sempre me incentivou, apoiou e cobrou para que concluísse mais essa etapa. Por toda cumplicidade, paciência, amor e carinho.

À Leda pelos conselhos, auxílio na realização da imunohistoquímica, amizade e companheirismo. Ao Léo por estar sempre perto, disposto a ajudar com incentivo constante.

Aos amigos do CBR: Lorena, Ana Paula, Paulinho, Evelise, Luiz, Flavia, Paulo Matola, Julieta, José Carlos, Leila, Dayana, Maycon, Aline Presto, Aline Quiossa, Claudinha, Jéssica, Renato, Bárbara, Vinicius e Jasmin que tanto me ajudaram cada um à sua maneira. Ao suporte imprescindível dos funcionários do Biotério: Clemilson, Bruno, José Wilson, Marco, João e Luiz Carlos.

Ao professor Dr. Roberto Sotto-Maior pela orientação na captura e processamento das imagens, que promoveram enriquecimento ao estudo.

Ao Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental - Disciplina de Nefrologia, Depto. de Medicina Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, e a Marina Burgos por terem disponibilizado material e orientação na realização da imunohistoquímica.

Ao Centro de Biologia da Reprodução (CBR/UFJF), pelo fornecimento das instalações, laboratórios, modelo experimental, funcionários e toda a logística para o desenvolvimento do projeto.

Às Redes Mineiras TOXIFAR e Bioterismo - FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

A CAPES pela concessão da bolsa.

À Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal e Juiz de Fora, pela colaboração e auxílio na participação de congressos.

A toda minha família que mesmo de longe, sempre me apoiaram a concluir mais essa conquista.

A todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram na realização deste trabalho.

Os meus sinceros agradecimentos!

Resumo

A Síndrome Metabólica (SM) caracteriza-se por acúmulo central de gordura, hipertensão arterial e hipertrigliceridemia. Estudos epidemiológicos e clínicos têm confirmado que a SM está relacionada ao aumento da morbidade e mortalidade em virtude de sua associação ao processo inflamatório e a patologias como a doença cardiovascular, diabete *mellitus*, dislipidemias, doença renal crônica e esteatose hepática. Pela diversidade de fatores causadores ou contribuintes da SM o tratamento farmacológico ideal não está bem definido. A quercetina por apresentar ação antioxidante, antiinflamatória e vasodilatadora, poderia ser uma alternativa no tratamento das comorbidades que compõem a SM. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito da quercetina no fígado e rim de ratos Wistar com SM induzida por dieta hiperlipídica. Ratos Wistar machos foram distribuídos, em três grupos (n=10) que receberam respectivamente: C-dieta padrão; SM-ração hiperlipídica e SMQ-ração hiperlipídica + 10mg/kg/ dia de solução de quercetina, via oral, a partir dos dois meses de idade. Receberam água e ração *ad libitum*. Avaliaram-se, semanalmente, peso corporal e pressão arterial da cauda. Ao final do experimento, aos seis meses, foram realizados teste oral de tolerância a glicose. Os animais foram anestesiados (xilazina: 10mg/kg e quetamina: 90mg/kg, i.p.) para medida direta da PA. Em seguida, foram exsanguinados e eutanasiados por deslocamento cervical, removeram-se e pesaram-se os rins, fígado, gordura retroperitoneal e epididimária esquerda. Foi feita dosagem sérica de Glicose, Triglicérides, Colesterol, AST, ALT e γ -GT ; Creatinina urinaria, Clearance e morfometria da área e volume glomerular por Hematoxilina-Cromotrope. A presença de fibrose renal foi avaliada pela coloração picrosírius sob luz polarizada. Por análises imuno-histoquímica quantificaram-se as células dos tecidos renais que expressavam marcadores de fator pró-fibrótico (TGF- β 1) e miofibroblastos (α -SMA). Os procedimentos foram aprovados pelo CEUA-UFJF (Protocolo nº010/2011). A dieta hiperlipídica promoveu a SM, caracterizada por acúmulo central de gordura, hipertensão arterial, hiperglicemia e hipertrigliceridemia. Houve aumento nos níveis de AST, bem como na expressão de TGF- β 1 e porcentagem de fibrose por picrosírius. A administração crônica diária da quercetina em modelo experimental de SM induzida por dieta hiperlipídica não reduziu a pressão arterial, não alterou o perfil nutricional, metabólico e histomorfológico renal dos animais, apesar de atenuar a expressão dos marcadores de fibrose.

Palavras chave: Síndrome metabólica; Rato Wistar; Quercetina; Fígado; Rim.

Abstract

Metabolic syndrome (MS) is characterized by increased visceral fat, hypertriglyceridemia and hypertension. Epidemiological and clinical studies have confirmed that MS is associated with increased morbidity and mortality due to its association with inflammation and diseases such as cardiovascular disease, diabetes *mellitus*, dyslipidemia, chronic kidney disease and hepatic steatosis. Based on the diversity of factors causing or contributing to MS the ideal pharmacological treatment is not well defined. Due to quercetin antioxidant, anti-inflammatory and vasodilatory properties, it could be an alternative for treatment of MS comorbidities. This study aimed to evaluate the effect of quercetin in the liver and kidney of rats with MS diet-induced. Male Wistar rats were divided into three groups (n = 10): C-standard diet; MS-high-fat diet and MSQ-high-fat diet + 10mg/kg / day of quercetin solution orally administered in two months old rats. Water and food was received ad libitum. Body weight and tail blood pressure was assessed weekly. At the end of the experiment, at six months, tests were performed to evaluate oral glucose tolerance. The animals were anesthetized (xylazine: ketamine and 10mg/kg: 90mg/kg, ip) for direct measurement of blood pressure. Then, they were exsanguinated and euthanized by cervical dislocation, kidney, liver, epididymal and retroperitoneal fat left were removed and weighed. Serum glucose, triglycerides, cholesterol, AST, ALT and γ -GT; urinary creatinine was measured; Clearance and morphometry of the area and volume glomerular hematoxylin-Cromotrope stain. The presence of renal fibrosis was evaluated by picrosirius stain under polarized light. For immunohistochemical analyzes were quantified the expression of pro-fibrotic factor (TGF- β 1) and myofibroblasts (α -SMA) makers in kidney tissue cells. The procedures were approved by CEUA-UFJF (Protocol No. 010/2011). We observed that high fat diet promoted MS, characterized by central fat accumulation, hypertension, hyperglycemia and hypertriglyceridemia. In addition an increase in the levels of AST as well as the expression of TGF- β 1 and percentage of fibrosis by picrosirius was observed. Chronic daily administration of quercetin in an experimental model of SM induced by high fat diet did not reduce blood pressure, did not affect the nutritional and metabolic and histomorphological profile of the animals, despite of attenuate the expression of markers of fibrosis.

Keywords: Metabolic syndrome; Wistar Rat; Quercetin; Liver; Kidney.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. <i>Caracterização da Síndrome metabólica</i>	15
2.2. <i>Síndrome Metabólica e comorbidades</i>	16
2.2.1 <i>Obesidade</i>	17
2.2.2 <i>Hiperinsulinemia e intolerância à glicose</i>	18
2.2.3 <i>Processo inflamatório crônico</i>	18
2.2.4 <i>Dislipidemia</i>	19
2.2.5 <i>Outros Fatores Associados a SM</i>	19
2.3. <i>Doença renal e hepática como consequências da SM</i>	20
2.3.1 <i>Alterações Renais</i>	20
2.3.2 <i>Alterações Hepáticas</i>	22
2.4. <i>Tratamento</i>	24
2.4.1 <i>Flavonóides</i>	25
3. HIPÓTESE	30
4. OBJETIVO	31
4.1. <i>Objetivo geral</i>	31
4.2. <i>Objetivos Específicos</i>	31
5. MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1. <i>Animais</i>	32
5.2. <i>Procedimento Experimental</i>	32
5.3. <i>Caracterização da SM</i>	34
5.3.1. <i>Aumento do peso corporal</i>	34
5.3.2. <i>Acúmulo de gordura abdominal</i>	35
5.3.3. <i>Pressão arterial</i>	35
5.3.3.1. <i>Método indireto</i>	35
5.3.3.2. <i>Método direto</i>	35
5.3.4. <i>Lipídeos</i>	36
5.3.5. <i>Teste de tolerância oral à glicose</i>	37
5.4. <i>Peso dos órgãos</i>	37
5.5. <i>Análise histomorfológica</i>	37
5.6. <i>Análise Imunohistoquímica</i>	39

5.7. <i>Análise Bioquímica Enzimas Hepáticas</i> -----	40
5.8. <i>Análise Estatística</i> -----	41
6. RESULTADOS e DISCUSSÃO-----	42
6.1. <i>Resumos Apresentados em congresso</i> -----	42
6.1.1. <i>Avaliação do efeito da quercetina sobre o fígado de Ratos Wistar obesos</i> -----	42
6.1.2. <i>Indução de obesidade em Ratos Wistar através de dieta hiperlipídica</i> -----	42
6.1.3. <i>Dissociação da resposta anti-hipertensiva em relação aos bloqueios da angiotensina II e da Aldosterona em modelo experimental de SM</i> -----	42
6.1.4. <i>Indução da síndrome metabólica em Ratos Wistar por dieta hiperlipídica como ferramenta para estudos terapêuticos</i> -----	42
6.2. <i>Artigo publicado</i> -----	43
“Dissociação da resposta anti-hipertensiva e metabólica à losartana e espirolactona em ratos com síndrome metabólica experimental”	
6.3. <i>Resultados Preliminares</i> -----	45
6.4. <i>Artigo enviado para publicação</i> -----	46
Avaliação do Efeito da Quercetina em Ratos Wistar com Síndrome Metabólica	
7. COMENTÁRIOS FINAIS-----	47
8. CONCLUSÃO-----	48
9. REFERÊNCIAS-----	49
10. APÊNDICE-----	60
10.1. <i>Apêndice A</i> -----	60
10.2. <i>Apêndice B</i> -----	82
11. ANEXOS-----	87
11.1. <i>Protocolo Comitê de Ética</i> -----	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT-	Alanina Aminotransferase
AST-	Aspartato Aminotransferase
DCV-	Doença Cardiovascular
DHG-	Doença Hepática Gordurosa
DM-	Diabetes <i>mellitus</i>
DRC-	Doença Renal Crônica
EHNA-	Esteato Hepatite Não Alcoólica
HA-	Hipertensão Arterial
HDL-	Lipoproteína de Alta Densidade
I DBSM-	Primeira Diretriz Brasileira de Síndrome Metabólica
IDF-	International Diabetes Federation
III	
IL-1-	Interleucina-1
IL-6-	Interleucina-6
IMC-	Índice de Massa Corporal
i-NOS-	Oxido Nítrico Sintase Induzida
LDL-	Lipoproteína de Baixa Densidade
MCP-1-	Monocyte Chemoattractant Protein-1
NCEP-ATP-	National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel
OMS-	Organização Mundial de Saúde
POF-	Pesquisa de Orçamento Familiar
RI-	Resistência Insulínica
SM-	Síndrome Metabólica
TEM-	Transição Epitélio Mesenquimal
TGF- β 1-	Fator de Crescimento Transformador Beta-1

TNF- α -	Fator de Necrose Tumoral Alpha
α -SMA-	Actina Músculo Liso - Alpha
γ -GT-	Gama-glutamil Transpeptidase

1. Introdução

A Síndrome Metabólica (SM) é um transtorno complexo caracterizado pela associação de três ou mais comorbidades que incluem obesidade central, hipertensão arterial (HA), intolerância a glicose, aumento nos níveis de triglicérides e redução nos níveis de colesterol HDL e se manifesta por anormalidades fisiológicas e bioquímicas (I-DBSM, 2005). É importante destacar a associação da SM com as doenças cardiovasculares (DCV), já que esta síndrome é preditora dessas doenças assim como da diabetes mellitus (DM) (ISOMAA et al., 2001; HAFFNER et al., 1992), aumentando a mortalidade geral em cerca de 1,5 vezes e a cardiovascular em cerca de 2,5 vezes (I-DBSM, 2005).

Estima-se que a prevalência da síndrome metabólica na população geral é entre 20 a 25%, com comportamento crescente nas últimas décadas (DUNSTAN et al., 2002) e tem aumentado na população brasileira, sendo o aumento da obesidade considerado o principal motivo de preocupação, pela sua importância como um dos componentes da SM (SALAROLI et al., 2007; BARBOSA et al., 2006) .

Nos EUA, a prevalência de SM entre adolescentes é de 4%, porém naqueles com sobrepeso o risco aumenta para 30-50% (KORSTEN-RECK et al., 2008). A Organização Mundial de Saúde calcula que, em todo o mundo, a obesidade e o sobrepeso contribuem para a morte de 2,8 milhões de pessoas a cada ano por ser considerada o maior fator de risco para o surgimento da SM (WHO, 2006).

Estudos epidemiológicos e clínicos têm confirmado que o sobrepeso está relacionado ao aumento da morbidade e mortalidade em virtude de sua frequente associação ao processo inflamatório, bem como a patologias integrantes da SM, como a

DCV, particularmente como consequência da HA, embora o DM, dislipidemias, doença renal crônica e esteatose hepática também sejam patologias graves associadas à síndrome (SIMONS et al., 2010).

Sabe-se que a SM é uma doença multifatorial, portanto, exige o tratamento dos diferentes fatores causadores e das comorbidades associadas, o que torna o tratamento da SM um grande desafio para a ciência, exigindo pesquisas em diferentes áreas (GRUNDY et al., 2004). Os estudos experimentais produzem conhecimentos que podem ser extrapolados, com as devidas restrições, para a melhoria da saúde humana. Por outro lado, a pesquisa de modelos experimentais permite, de forma controlada, estudar cada uma das variáveis envolvidas na fisiopatologia de uma patologia, o que no caso da SM pode ser de muita importância (MACHADO et al., 2012; RIBEIRO, 2009).

Até o momento não existe tratamento específico para a SM, no entanto acredita-se que a abordagem terapêutica de seus componentes poderia reduzir o risco cardiovascular com objetivo de reduzir a morbidade e mortalidade cardiovascular bem como as demais patologias associadas à síndrome (I-DBSM, 2005; EZEQUIEL et al., 2012).

Uma vez que a obesidade induzida por dieta em roedores é considerada o modelo mais próximo de reproduzir a doença humana (RIBEIRO, 2009), este estudo visa avaliar a função e morfologia renal e hepática, em ratos Wistar com SM induzida por dieta hiperlipídica, modelo este já demonstrado eficiente em um trabalho do nosso grupo, assim como avaliar o efeito benéfico da quercetina, devido principalmente a suas ações anti-hipertensiva, anti-inflamatórias e antioxidantes, nas patologias renais e hepáticas associadas à SM.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Caracterização da Síndrome Metabólica

Síndrome Metabólica é caracterizada pela associação de três ou mais comorbidades que incluem obesidade central, hipertensão arterial, intolerância à glicose, aumento nos níveis de triglicérides e redução nos níveis de colesterol HDL (SIMONS et al., 2010; ALEXANDER et al., 2003), além de outras comorbidades como distúrbios da coagulação, hiperuricemia e microalbuminúria (TIMAR et al., 2000; DEFRONZO e FERRANINNI, 1991). Em conjunto, estes fatores resultam em elevado risco de desenvolvimento de DCV e lesão renal, sendo este risco proporcional ao número de componentes da SM (LAGUARDIA et al., 2012).

Até o momento, observam-se dificuldades na adoção de critérios diagnósticos uniformes para definição da SM. De fato, três entidades: Organização Mundial de Saúde (OMS), National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III (NCEP-ATPIII) e International Diabetes Federation (IDF) buscaram desenvolver critérios diagnósticos para SM (STEEMBURGO et al., 2007) (Tabela 1).

Na Tabela 1 nota-se que, para o critério da OMS, faz-se necessária a resistência à insulina associada a mais dois outros fatores (ALBERTI e ZIMMET, 1998). O NCEP-ATPIII preconiza a presença de três dos componentes, sem priorizar nenhum deles em especial (NCEP-ATPIII, 2001). Já para o IDF, torna-se obrigatória a medida da circunferência abdominal alterada, além de mais dois outros fatores (ALBERTI et al., 2006). Como o NCEP-ATPIII não utiliza a resistência à insulina como critério diagnóstico, esse modelo tem sido considerado de mais aplicabilidade clínica do que o

da OMS. Por isso, a I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da SM (I DBSM) recomenda o uso do NCEP- ATPIII.

Tabela 1: Classificação da Síndrome Metabólica

	WHO (1998)	NCEP-ATP III (2005 revisado)	IDF (2005)
Absolutamente Necessário	Resistência insulínica (ATG, AGJ, DT ₂ , RI)	-----	Obesidade central
Critério	RI ou diabetes, mais 2 anormalidades entre 5	No mínimo 3 anormalidades entre 5	Obesidade, mais 2 anormalidades entre 4
Obesidade	Razão cintura/quadril > 0,9 (masculino) > 0,85 (feminino) ou IMC > 30 Kg/m ²	Circunferência cintura > 88 cm (feminino) > 102 cm (masculino)	Requerimento obrigatório
Hiperglicemia	Resistência Insulínica obrigatória	Glicose de jejum ≥ 100 mg/dL ou tratamento farmacológico	Glicose de jejum ≥ 100 mg/dL
Dislipidemia	TG ≥ 150 mg/dL ou C-HDL: < 35 mg/dL (masculino) < 39 mg/dL (feminino)	TG ≥ 150 mg/dL ou tratamento farmacológico	TG ≥ 150 mg/dl ou tratamento farmacológico
Dislipidemia critério secundário	-----	C-HDL: < 40 mg/dL (masculino) < 50 mg/dL (feminino) ou tratamento farmacológico	C-HDL: < 40 mg/dL (masculino) < 50 mg/dL (feminino) ou tratamento farmacológico
Hipertensão	≥ 140/90 mmHg	> 130 mmHg sistólica ou > 85 mmHg diastólica ou tratamento farmacológico	> 130 mmHg sistólica ou > 85 mmHg diastólica ou tratamento farmacológico
Outros critérios	Microalbuminúria*		

WHO, World Health Organization; NCEP-ATP III, *National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III*; IDF, International Diabetes Federation. ATG, alteração na tolerância a glicose; AGJ, alteração na glicose de jejum; DT₂, diabetes tipo II; RI, resistência insulínica; *Excreção urinária de albumina ≥ 20 µg/min ou razão albumina creatinina ≥ 30 mg/g.

2.2 Síndrome Metabólica e comorbidades

Como descrito, a SM é definida atualmente por um conjunto de anormalidades metabólicas e hemodinâmicas, frequentemente associadas ao indivíduo obeso (KAHN et al., 2006). Embora a maioria das pessoas portadoras de SM apresente excesso de

peso, mesmo em indivíduos não obesos pode ocorrer aumento da adiposidade corporal, principalmente na região abdominal (GOODPASTER et al., 2005).

2.2.1 Obesidade

Mundialmente, cerca de 1,2 bilhões de pessoas apresentam sobrepeso, enquanto 475 milhões são obesos (IOTF, 2013). OGDEN e colaboradores (2006) apontam o aumento da prevalência da obesidade nas últimas décadas, notando sobrepeso em torno de 66% dos adultos e obesidade de aproximadamente 33% em população norte-americana. Já em população europeia, entre 35 e 65 anos, mais de 60% foi classificada com sobrepeso ou obesa (IOTF, 2013).

Estudos epidemiológicos e clínicos têm confirmado que o sobrepeso está relacionado ao aumento da morbidade e mortalidade em virtude de sua frequente associação com outras doenças que compõem a SM e, devido às patologias integrantes da SM o paciente estaria sob maior risco, como alto risco de desenvolver DCV, particularmente como consequência da HA, embora o DM, dislipidemias, doença renal crônica e esteatose hepática também sejam patologias graves associadas à síndrome (SIMONS et al., 2010).

O aumento do percentual de gordura corporal reflete alterações nas funções fisiológicas. A gordura visceral é a principal contribuinte para as alterações metabólicas devido à produção de adipocinas, que são citocinas presentes nos adipócitos, além disso, existe uma associação direta da obesidade com a atividade simpática e com a inflamação. Esse fato desencadeou grande preocupação em combater a obesidade, que é um fator de risco, *per se*, e que de certa forma contribui para a emergência de outros riscos, ampliando assim, a SM (LOPES, 2007).

2.2.2 Hiperinsulinemia e intolerância à glicose

A obesidade, um dos fatores presentes na SM, está frequentemente associada à resistência a insulina (RI), devido principalmente ao acúmulo de gordura perivisceral permitindo uma grande oferta de ácidos graxos livres ao fígado e produção aumentada de acetil-Coenzima A, que inibe a ação da insulina, aumentando a neoglicogênese e inibindo captação de glicose e sua oxidação no tecido muscular (GIORGINO et al., 2005).

O adipócito é capaz de secretar diversas citocinas, como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que, por sua vez, interferem na sinalização intracelular da insulina, comprometem a função endotelial e o metabolismo pós-prandial (GIORGINO et al., 2005; YUDKIN et al., 2000). A resistência à insulina pode ser causada por deficiência no receptor específico, por diminuição na quantidade de receptores ou por erro durante utilização por parte dos receptores. Como mecanismo de compensação, as células beta-pancreáticas aumentam a produção de insulina, levando à hiperinsulinemia. A RI piora progressivamente com a evolução da tolerância normal a glicose até diabetes *mellitus* tipo 2 (FERREIRA et al., 2007).

2.2.3 Processo inflamatório crônico

O adipócito também secreta substâncias como o *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), que induz a atração de macrófagos. Estas células são importantes na produção de citocinas, que infiltram o estroma do tecido adiposo abdominal, contribuindo para a exacerbação e perpetuação do processo inflamatório crônico (WEISBERG et al., 2003). A expressão de marcadores inflamatórios é mais acentuada na gordura visceral que na subcutânea, fator esse que parece interferir no impacto

metabólico da adiposidade intra-abdominal (GIORGINO et al., 2005; HERMSDORFF e MONTEIRO, 2004). Dessa forma a adiposidade intra-abdominal aumenta a RI e a atividade inflamatória subclínica (YUDKIN et al., 2000). Em um estudo com 40 pacientes obesas centrais que perderam em média 8% do peso em 16 semanas, revelou que a redução da circunferência da cintura correlacionou-se com a diminuição dos valores da proteína C reativa, que é uma proteína de fase aguda marcadora da presença de inflamação sistêmica (RIBEIRO FILHO et al., 2006).

2.2.4 Dislipidemia

A dislipidemia mais comum na SM é a hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e/ou baixas concentrações de HDL (SANTOS et al., 2006). Observou-se que em 52% de crianças obesas de oito a 12 anos foi encontrado aumento do colesterol total, comparado com crianças não obesas com prevalência de 16%. Adolescentes obesos apresentaram importante aumento de LDL e triglicérides e baixo nível de HDL (JOLLIFFE e JANSSEN, 2006). A dislipidemia representa importante problema no paciente com diabetes *mellitus*, sendo que 87% deles apresentam alguma disfunção lipídica (SANTOS et al., 2006).

2.2.5 Outros Fatores Associados a SM

Diversos hormônios possuem papel na regulação do peso corporal. A leptina, hormônio responsável pela regulação da saciedade no hipotálamo e também da manutenção da quantidade de gordura corporal, tem sido estudada em relação à sua participação na etiologia da SM, sugerindo-se ser ela outro componente das alterações hormonais da SM, estando sua concentração elevada na maioria dos obesos. Adoção de

hábitos de vida saudáveis, como menos ingestão de gorduras e a prática de exercícios físicos, demonstrou ser capaz de reduzir concentrações plasmáticas de leptina (SANTOS et al., 2006; MATOS et al., 2003).

Outras condições clínicas também estão frequentemente associadas à SM, embora sem participação nos critérios diagnósticos. Entre elas estão a síndrome de ovário policístico, a *acantose nigra*, nefropatia, hepatopatia gordurosa não alcoólica, os estados pró-trombóticos, pró-inflamatórios e de disfunção endotelial, além da hiperuricemia e microalbuminúria (I-DBSM, 2005).

2.3 Doença renal e hepática como consequências da Síndrome Metabólica

Conforme exposto acima, a SM está associada a diversas comorbidades, e essas comorbidades podem evoluir para nefropatias (PALANISAMY et al., 2010) e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHG) (BITENCOURT, 2007).

2.3.1 Alterações Renais

No rim, o desenvolvimento inicial de danos à função renal tem sido associado a vários distúrbios fisiológicos e metabólicos, incluindo hipertensão, dislipidemia que compõem a SM e a fatores inflamatórios e nutricionais (SLEE, 2012). Porém vale ressaltar que mesmo na ausência de riscos associados a SM, a própria obesidade pode aumentar significativamente a incidência de Doença Renal Crônica (DRC) e acelerar a sua progressão (HUNLEY et al. 2010, GRIFFIN et al. 2008).

Estudos demonstram que a principal via que leva ao surgimento da DRC na SM é a HAS, neste contexto a HAS pode ser causada pela hiperinsulinemia, devido à ativação do sistema nervoso simpático, do comprometimento da vasodilatação periférica e do aumento da resposta da angiotensina, levando ao aumento da reabsorção renal de

sódio e de água e, conseqüentemente, à sobrecarga de volume (COSTA et al., 2010; ENGELI et al., 2005).

Estudos experimentais e clínicos revelam que os adipócitos, especialmente os presentes na gordura visceral, contêm todos os elementos do sistema renina-angiotensina-aldosterona, inibidor do ativador do plasminogênio, além dos ácidos graxos livres, leptina e adiponectina, que afetam a função e estrutura renal. Além disso, a gordura é infiltrada por macrófagos que podem promover um ambiente pró-inflamatório, contribuindo também para alterações fisiopatológicas no rim (HUNLEY et al., 2010).

DRC é comumente caracterizada pela perda de células epiteliais diferenciadas e ativação de células mesenquimais levando à fibrose renal, indicando que microlesões epiteliais acarretam comunicação desequilibrada epitélio-mesenquimal que inicia a resposta fibrótica. O acúmulo de fibroblastos, excesso de colágeno, e outros componentes da matriz extracelular em locais crônicos da inflamação conduzem à cicatrização do tecido e formação progressiva de lesão tecidual (BOTTINGER, 2007).

Os fibroblastos derivam da medula óssea e também surgem da transição epitélio mesenquimal (TEM) e de locais de lesão celular (KALLURI e NEILSON, 2003; NEILSON, 2005). TEM está provavelmente envolvida na doença progressiva fibrótica do coração, pulmão, fígado e rim (LEE et al., 2006). A fibrose é mais do que apenas uma resposta à lesão tubular, pois desempenha papel importante na perda de néfrons - as unidades funcionais do rim-, podendo gerar insuficiência renal em decorrência das adaptações funcionais causadas pela perda crítica dos néfrons (COSTA et al., 2009).

Portanto para reduzir risco de desenvolvimento de DRC é necessário além da redução do sobrepeso tratar as comorbidades relacionadas à SM e buscar medicamentos e nutrientes que tenham potencial efeito anti-hipertensivo, antiinflamatório e antioxidante (SLEE, 2012).

2.3.2 Alterações Hepáticas

As lesões hepáticas decorrem principalmente pela drenagem venosa da adiposidade visceral que chega ao fígado via sistema porta. A gordura carregada para o órgão, conseqüentemente aumenta a concentração de citocinas inflamatórias e ácidos graxos que estimulam a gliconeogênese, bloqueando a depuração hepática de insulina e causando acúmulo de triglicérides no fígado e no músculo (STRAUB et al., 2000). Esse acúmulo leva a RI, provocando a dislipidemia (WAJCHENBERG et al., 2009; SANTOS et al., 2006), evoluindo para uma Doença Hepática Gordurosa (DHG) não alcoólica (HERNANDEZ e FRIEDMAN, 2011).

THAMER e cols (2004) verificaram que o conteúdo lipídico intra-hepático estava intimamente associado à sensibilidade à insulina, sendo que, em indivíduos saudáveis, a gordura visceral se mostrou como o principal fator determinante do depósito de gordura no fígado. Apesar do papel central da gordura visceral na RI, deve-se ressaltar a participação do tecido adiposo depositado em outros locais. O depósito ectópico de adipócitos vem ganhando destaque na fisiopatologia da RI, principalmente o tecido adiposo intramuscular (KELLEY et al., 2002).

A DHG associada à obesidade representa uma forma comum de disfunção hepática entre adultos e crianças (HERNANDEZ e FRIEDMAN, 2011; TAKAHASHI e FUKUSATO, 2010). Há dois tipos de DHG não alcoólica: uma que é acompanhada de

simples esteatose com deposições de gordura nos hepatócitos, e outra, a esteatohepatite não-alcoólica (EHNA) que além de esteatose está acompanhada de uma reação necro-inflamatória, que pode progredir para fibrose e cirrose hepática (TAKAHASHI e FUKUSATO, 2010).

O fígado responde ao excesso de calorias consumidas sintetizando triglicerídeos. Na maioria das vezes, esses triglicerídeos são exportados pelas lipoproteínas e armazenados no tecido adiposo. Porém, são retidos no fígado quando sua assimilação nos adipócitos periféricos é prejudicada ou quando mecanismos de exportação de lipoproteínas tornam-se ineficientes. Agravando o problema, a doença pode permanecer assintomática por décadas em indivíduos obesos, pois muitas vezes as aminotransferases encontram-se em concentrações normais nos exames laboratoriais ou apenas levemente elevadas. (BITENCOURT et al., 2007).

Pacientes com maior distribuição de gordura na região abdominal estão mais propensos a desenvolver doenças hepáticas e risco elevado para doenças cardíacas (MARCHESINI et al., 2001; BRENNER et al., 2000). ABRAMS e cols (2004) descreveram que indivíduos morbidamente obesos apresentaram fibrose (deposição excessiva de matriz extracelular) portal associada com esteatose hepática, e que as injúrias hepatocelulares estão relacionadas com a desregulação da glicemia.

LIEW e cols (2006) demonstraram que alterações nos testes de função hepática (aumento de AST / ALT) e esteatose, associados às alterações necro-inflamatórias estavam fortemente associados com a síndrome metabólica. Estes achados sugeriram que a presença de esteatose relacionada à obesidade deve ser considerada, mesmo quando não é a principal causa da doença hepática, porque ambos são bem reconhecidos

como um fator que acelera o desenvolvimento de fibrose e sabe-se que a fibrose leva à destruição da estrutura e diminuição da função do órgão (ZEISBERG et al., 2007).

2.4 Tratamento

Há grandes dificuldades na abordagem terapêutica conjunta das várias comorbidades da SM no mesmo indivíduo. Atualmente não existe tratamento específico para as comorbidades associadas à SM, no entanto, acredita-se que o tratamento dos componentes da SM poderia reduzir o risco cardiovascular (I-DBSM, 2005). As primeiras e mais importantes medidas a serem recomendadas visam a intervir no estilo de vida do paciente. Ênfase deve ser dada à perda de peso, à correção das anormalidades metabólicas e à atividade física regular (NCEP-ATPIII, 2002; NCEP-ATPIII, 2001). Idealmente, este tratamento deveria se basear na redução de peso, contudo, o índice de sucesso desta medida terapêutica é baixo, o que demanda a instituição de tratamento específico da dislipidemia, da RI e da HA (EZEQUIEL et al., 2012; VI – DBH, 2010).

Como as medidas não farmacológicas são de difícil implementação e o tratamento medicamentoso da SM ainda não está totalmente estabelecido (I-DBSM, 2005) e tendo em vista que muitos pacientes com SM necessitam de tratamento medicamentoso integrado (GRUNDY et al., 2004), abrangendo simultaneamente cada um dos seus componentes (ISRAILI et al., 2007), há necessidade de se pesquisarem drogas antioxidantes, anti-hipertensivas, antiinflamatórias, hipoglicemiantes e hipocolesterolêmicas, entre outras para o tratamento das comorbidades relacionadas à SM. Para tanto é necessário o desenvolvimento de modelos experimentais com a utilização de animais para a avaliação dos possíveis fármacos.

Dentre estes modelos experimentais, os que são induzidos por modificações dietéticas são os que melhor reproduzem as alterações metabólicas decorrentes do acúmulo de tecido adiposo. Para tanto utilizam-se ratos Wistar com SM induzida por dieta hiperlipídica, modelo animal que apresenta muitas das características da síndrome metabólica humana, uma vez que estes animais exibem, obesidade, resistência à insulina, dislipidemia, hiperinsulinemia e hipertensão (MACHADO et al., 2012).

2.4.1 Flavonóides

Um dos compostos que vem sendo estudados como alternativa terapêutica a SM são os flavonóides, uma classe de compostos fenólicos que diferem entre si pela sua estrutura química e características particulares, compreendem um grande grupo de metabólitos secundários, ocorrendo amplamente em todo o reino vegetal. Frutas, vegetais, grãos, flores, chá e vinho são exemplos de fontes destes compostos (IKIZLER et al., 2007; NIJVELDT et al., 2001).

Acredita-se no seu potencial por serem antioxidantes efetivos devido às suas propriedades sequestrantes de radicais livres e por quelar íons metálicos, protegendo assim os tecidos dos radicais livres e da peroxidação lipídica (NIJVELDT et al., 2001).

Dentre os flavonóides mais estudados encontra-se a quercetina (3, 5, 7,3'-4'-pentahidroxi flavona) (Fig. 2) por ser o principal flavonóide presente na dieta humana (SAPONARA et al., 2002; IKIZLER et al., 2007; ABDEL-RAHEEM et al., 2009). HERTOOG e cols (1993) encontraram altas concentrações de quercetina nos vegetais como cebola, couve, vagem, brócolis, repolho e tomate. Entre as frutas estudadas, a maior concentração média de quercetina encontrada foi na maçã. Foi encontrada também em bebidas, como a cerveja, café, achocolatado, vinho branco, vinho tinto, suco

de limão, suco de tomate e chá preto sendo este a bebida que apresentou maior concentração de quercetina.

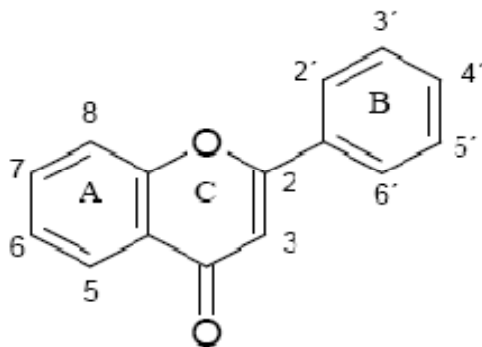


Figura 2 - Estrutura básica dos flavonóides. A quercetina possui substituinte - OH nas posições 3, 5, 7, 3', 4'.

Fonte: BEHLING et al., 2004

Há relatos do efeito protetor da quercetina sobre os sistemas renal e hepático, no tratamento e prevenção de câncer, doenças cardiovasculares, inibição da agregação de trombócitos, antiinflamatório (BEHLING et al., 2006; BEHLING et al., 2004; GUGLIELMONE et al., 2002) e efeito anti-hipertensivo (FÓRMICA e REGELSON, 1995). A quercetina é considerada um potente antioxidante devido à suas propriedades sequestrantes de radicais livres e por quelar íons metálicos (BEHLING et al., 2004) e na inibição do processo de formação de radicais livres em três etapas diferentes: na iniciação (pela interação com íons superóxido), na formação de radicais hidroxil (por quelar íons de ferro) e na peroxidação lipídica (por reagir com radicais peroxi de lipídeos) (MILTERSTEINER et al., 2003; KANDASWAMI et al., 1994; AFANAS'EV et al., 1989).

Tem sido descrita como modulador da homeostase lipídica no tecido adiposo e no fígado através da inibição de fosfodiesterases (PELUSO, 2006). Um dos mecanismos

de ação dos polifenóis tem sido atribuído a sua ação antioxidante resultando na inibição da oxidação do LDL, mas outro papel desses compostos inclui alteração da absorção hepática de colesterol em conjunto com a secreção de triglicérides (RIVERA et al., 2008), dados que podem explicar a melhora no perfil lipídico encontrada em estudos com a quercetina (SEIVA et al., 2012).

Em relação à atividade antiinflamatória, a quercetina atua modulando células envolvidas com a inflamação (por exemplo, inibindo a proliferação de linfócitos T), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α e IL-1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A2, ciclo-oxigenase e lipooxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (LÓPEZ-POSADAS et al., 2008; KIM et al., 2004; MIDDLETON et al., 2000).

A mesma propriedade antioxidante descrita anteriormente é suficiente para reduzir o risco de morte por doenças e danos cardíacos. Neste sentido, a quercetina demonstrou diminuir a incidência de infarto do miocárdio e derrames cerebrais em pessoas da terceira idade. As populações que consomem produtos ricos em quercetina estatisticamente apresentam menores riscos de afecções cardiovasculares (JIN et al., 2012).

Em estudos experimentais de infarto do miocárdio pode-se observar que a quercetina melhora a função contrátil do ventrículo esquerdo e reduz a incidência de transtornos da condução cardíaca. O processo limita-se à área danificada de isquemia protegendo a ultra-estrutura das artérias coronárias, melhorando a circulação coronária e prevenindo a formação de trombos intravasculares. Por outro lado, também demonstrou

efeitos vasodilatadores na aorta isolada de ratos, efeitos antitrombóticos (por uma ligação seletiva na parede plaquetária) e diminuiu as lesões de reperfusão do miocárdio. Devido à inibição da peroxidação lipídica, a quercetina protege o endotélio da destruição local por prostaciclina e o fator de relaxamento derivado do endotélio. (JIN et al., 2012; FÓRMICA e REGELSON, 1995).

Devido aos mecanismos ação da quercetina, há relatos mostrando sua ação protetora na lesão renal e hepática. Em ratos diabéticos, a quercetina reduziu o estresse oxidativo (SANDERS et al., 2001; MAHESH e MENON, 2004).

Quanto à ação nefroprotetora da quercetina foi observado que o pré-tratamento com quercetina em ratos foi capaz de preservar a integridade histológica renal com diminuição do dano tubular e inflamação intersticial em modelo de injúria renal aguda (SHOSKES, 1998), ABDEL-RAHEEM e cols. (2009) relataram o efeito protetor da quercetina contra o dano renal agudo induzido por Gentamicina, atribuindo esse efeito às propriedades antioxidantes já que a quercetina foi capaz de normalizar os peróxidos lipídicos elevados e bloquear completamente a peroxidação lipídica. Estudo *in vitro* demonstrou que o pré-tratamento com quercetina leva ao aumento significativo da sobrevivência celular quando há falência renal induzida (AHLENSTIEL et al., 2003).

Quanto ao efeito hepatoprotetor, LEE et al. (2003) sugeriram que a quercetina possa ser utilizada na prevenção do desenvolvimento da fibrose hepática. Os autores demonstraram em ratos que a quercetina exerceu ação hepatoprotetora e antifibrinogênica contra, a dimetilnitrosamina (DMN). Inibiu a elevação dos níveis séricos da Aspartato Aminotransferase e Alanina Aminotransferase (AST/ALT) e da

bilirrubina além de aumentar os níveis de albumina sérica e glutatona hepática e diminuir os níveis hepáticos de malondialdeído.

Dado que, estudos experimentais e clínicos têm demonstrado a eficácia da quercetina no tratamento das comorbidades associadas a SM pareceu interessante verificar seu efeito sobre o rim e fígado de ratos Wistar com SM induzida através de dieta hiperlipídica.

3. Hipótese

O flavonóide quercetina possui efeito benéfico sobre o fígado e rim de ratos Wistar com Síndrome Metabólica induzida por dieta hiperlipídica.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do flavonóide quercetina sobre o fígado e rim de ratos Wistar com Síndrome Metabólica induzida por dieta hiperlipídica.

4.2 Objetivos Específicos

- Comprovar indução de Síndrome Metabólica
- Avaliar no rim:
 - Função
 - Morfologia e morfometria;
 - Fibrose, utilizando o corante picosirius;
 - Presença de fator pró-fibrótico TGF-Beta1 e Transição Epitélio Mesenquimal pela expressão de miofibroblastos α -smooth muscle actin (α -SMA), através de Imunohistoquímica.
- Avaliar no fígado:
 - Lesão hepática por marcadores bioquímicos: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e Gama-glutamil Transpeptidase (γ -GT);

5. Material e métodos

5.1 Animais

Foram utilizados 30 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus* L. Berkenhout, 1769), ao desmame no vigésimo quinto dia. Os animais foram fornecidos pelo biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR/UFJF).

Os animais, na proporção de três animais por gaiola, foram mantidos em gaiolas de polipropileno (35,5 X 48,5 cm), forradas com maravalha não esterilizada, dotadas de cocho para ração do tipo peletizada e local para bebedouro com água filtrada. As gaiolas foram mantidas em armários climatizados ALESCO[®] com umidade controlada e temperatura de 22±2°C, em salas com dispositivo para manter a iluminação com ciclo de claro/escuro de 12 horas.

O protocolo experimental seguiu as normas internacionais preconizadas no Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2003) e foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Juiz de Fora em 01 de março de 2011 (Protocolo número 010/2011).

5.2 Procedimento Experimental

Os ratos, após desmame no vigésimo quinto dia, foram distribuídos aleatoriamente em grupos, controle (n=10), síndrome metabólica (n=10) e síndrome metabólica - quercetina (n=10).

No grupo controle (C), os animais foram alimentados com dieta comercial Nuvital[®] (Nuvilab, Colombo-PR, Brasil), considerada normocalórica (carboidrato 68%, proteína 19%, lipídios 3,5%, fibras 4,5%, vitaminas e minerais 5%, 370 Kcal/100g) durante vinte semanas. No grupo síndrome metabólica (SM) os animais foram alimentados, pelo mesmo tempo, com dieta hiperlipídica pré-fabricada pela empresa PragSoluções (Comércio e Serviços Ltda., Jaú-SP, Brasil), contendo: carboidrato 35%, proteína 19%, lipídios 36,5%, fibras 4,5%, vitaminas e minerais 5%, 520 Kcal/100g. No grupo Síndrome metabólica/quercetina (SMQ) os animais receberam a mesma dieta do grupo SM e, a partir da oitava semana de vida receberam 10mg/kg/dia de quercetina (Sigma Aldrich, Germany) por gavagem durante quatro meses. A dose de quercetina foi escolhida tomando por base o citado por ROMERO et al., 2010; ROGERIO et al., 2007; LEE et al., 2003. A quercetina utilizada foi adquirida da empresa Sigma Aldrich[®] Germany, lote 020M1600, e dissolvida em água destilada.

Tabela 1: Composição nutricional da dieta hiperlipídica (g/kg)

Ingredientes	Gramas/Kg
Amido de milho	200
Farelo de soja	300
Banha	190
Ac. Graxo saturado	158,5
Ac. Graxo insaturado	70
Fibra	30
L cistina	3,88
Cloreto colina	2,58
BHT (antioxidante)	0,014
Mix mineral*	35
Mix vitamínico#	10
TOTAL	999,974
Kcal Total:	5240
Kcal Lipídio	65%

* Mix Mineral (g/kg mix) contém: 30,5g MgSO₄.7H₂O; 65,2g NaCl; 105,7g KCl; 200,2g KH₂PO₄; 38,8g MgCO₃.Mg(OH)₂.3H₂O; 40g FeC₆H₅O₇.5H₂O; 516,4g CaCO₃; 0,8g KI; 0,9 g NaF; 1,4g

CuSO₄.5H₂O; 0,4g MnSO₄ e 0,05g CoNO₃ . # Mix Vitamínico (g/kg mix) contém: 3g Tiamina mononitrato; 3g riboflavina; 3,5g piridoxina HCl; 15g nicotinamida, 8g pantotenato de cálcio, 1g ácido fólico; 0,1g biotina; 0,005g cianocobalamina; 0,013g acetomenaphitone, 0,6g acetato de vitamina A, 25g D-RRR- acetato tocoferol e 10g cloreto de colina.

Um dia após o término do tratamento, os animais foram eutanasiados pela exsanguinação total por punção cardíaca após anestesia seguida de deslocamento cervical. O protocolo anestésico utilizado foi à associação de xilazina na dose de 10mg/kg e quetamina na dose de 90mg/kg, aplicados por via intraperitoneal (WOLFENSOHN e LLOYD, 1994).

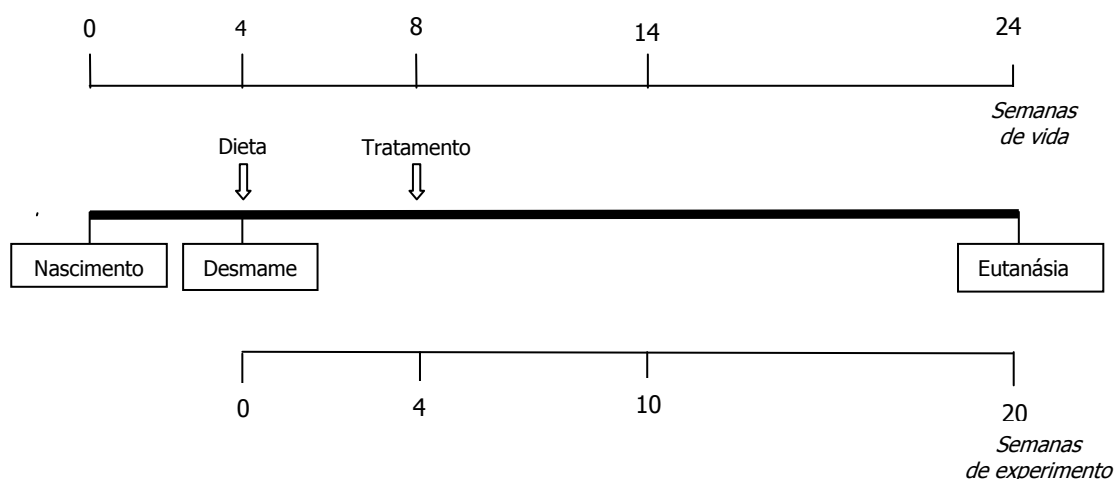


Figura 1- Desenho experimental

5.3 Caracterização da SM

A caracterização da síndrome metabólica foi feita pelos parâmetros descritos abaixo e conforme publicado em trabalho do nosso grupo (MACHADO et al., 2012)

5.3.1 Aumento do peso corporal

Consideramos os animais com sobrepeso quando a diferença de peso entre os grupos com dieta hiperlipídica (SM e SMQ) foi significativamente maior ($p < 0.05$) em

relação ao grupo controle (C) (NASCIMENTO et al., 2008; DOURMASHKIN et al., 2005).

Para o cálculo de consumo alimentar (g) e energético (Kcal/dia), os animais foram pesados e alocados individualmente em gaiolas metabólicas, com quantidades fixas de dieta, uma vez por semana, por um período de 24 horas.

5.3.2. Acúmulo de gordura abdominal

Ao final do experimento, após eutanásia por exsanguinação, sob anestesia com quetamina, xilazina (König SA[®], Avellaneda, Argentina), seguida de deslocamento cervical, foi realizada lipectomia abdominal bilateral e obteve-se o peso (g) do tecido adiposo retroperitoneal (RET), epididimários (EP) direito e esquerdo. Estes parâmetros foram utilizados como critério de obesidade visceral.

5.3.3. Pressão arterial

5.3.3.1. Método indireto

A pressão arterial sistólica foi determinada em mmHg, semanalmente, utilizando o método não invasivo da pletismografia de cauda (Pletismógrafo LE5001; Panlab[®], Barcelona, Espanha). Após pré-condicionamento na câmara de contenção, os animais foram pré-aquecidos a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos e foram obtidas dez leituras consecutivas. A medida individual da pressão arterial foi calculada pela média das leituras obtidas (MACHADO et al., 2010).

5.3.3.2. Método direto.

Os animais foram anestesiados com quetamina (90 mg/kg) e xilazina (10mg/kg) (König SA[®], Avellaneda, Argentina), administrada por via intramuscular.

Após fixação do animal em decúbito ventral, a artéria femoral esquerda foi localizada e dissecada. Com auxílio de linhas de sutura, o fluxo sanguíneo da artéria femoral foi interrompido na altura de sua extremidade distal e proximal. Utilizando-se de tesoura oftalmológica, um pequeno corte foi realizado na região medial da artéria clampeada, servindo como via para inserção de um cateter de polietileno (PE 10) ligado a outro (PE 50) (Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA), devidamente heparinizados. Após cateterização da artéria com a extremidade PE10, a porção PE50 foi transpassada sob a pele do dorso e exteriorizada na região cervical. Após a cirurgia, os animais foram acondicionados em gaiolas individuais mantidas em estantes climatizadas, durante 24 horas para recuperação.

A cânula, extremidade PE50, foi então conectada a um transdutor de pressão ML865-25T (ADInstruments, Austrália), ligado a um amplificador ETH-400 (CB Sciences, Inc.). Este amplificador, por sua vez, foi conectado a um conversor analógico digital PowerLab/400 (ADInstruments, Austrália). A transferência de dados entre o conversor e o computador foi feita por intermédio de uma placa SCISI, onde o software Chart for Windows[®], gerava os registros de Pressão Arterial Pulsátil (PAP) a partir dos dados enviados pelo conversor analógico, numa frequência de amostragem de 200 Hz. Os registros da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e da frequência cardíaca (FC) foram derivados “*on line*” da PAP (ADI Instruments, Austrália).

5.3.4. Lipídeos

Avaliaram-se os níveis séricos de triglicérides e colesterol total e colesterol HDL, vinte semanas após o início das dietas, no momento da eutanásia, após 8 horas de jejum, utilizando kits comerciais (Labtest[®], Lagoa Santa, Brasil) em analisador automático Labmax progress (Labtest[®], Lagoa Santa, Brasil).

5.3.5. Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

Em todos os grupos, foi coletado sangue (jejum de 8 horas) para a dosagem de glicose no T₀ (Tempo zero). Uma solução de glicose a 50% foi administrada por gavagem, na dose de 2g/Kg de peso. Subsequentemente, amostras de sangue foram coletadas nos tempos T₁ (15min), T₂ (30 min), T₃ (60 min) e T₄ (120min) e todas as amostras foram analisadas em glicosímetro (MediSence, Abbot[®], Chicago, USA). A área sob a curva foi calculada utilizando-se o software Origin 3.5 (Microcal Software, Northhampton, MA).

A glicose sérica foi também dosada no momento da eutanásia, por kits comerciais (Labtest[®], Lagoa Santa, Brasil), em analisador automático Labmax progress (Labtest[®], Lagoa Santa, Brasil).

5.4 Peso dos órgãos

Os animais foram submetidos à necropsia e tiveram rins e fígado removidos e pesados em balança de precisão da marca Bioprecisa[®] (Brasil).

5.5 Análise histomorfológica

O rim direito e o fígado foram fixados em formol cálcio de Baker para posterior processamento histológico, onde os órgãos foram desidratados por banhos crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, 100%), diafanizados por xilol, e impregnados em paraplast fundido à temperatura de 56°C a 58°C, usando-se três banhos a fim de retirar os vestígios do diafanizador que prejudicaria a qualidade do bloco bem como a perfeição dos cortes (TOLOSA et al., 2003).

Os blocos foram cortados em micrótomo de rotação Microm[®] (Alemanha) obtendo-se cortes de cinco micrômetros.

As lâminas de rim foram coradas por Hematoxilina e Cromotrope para análise histomorfológica e por Picrosirius para análise quantitativa de fibrose.

Foram avaliadas por morfometria a área e volume glomerulares. A área glomerular foi quantificada no aumento de 400x. Selecionaram-se apenas glomérulos em que se identificou o pólo vascular no corte estudado para medições de área, para garantir que os glomérulos medidos fossem seccionados em planos similares. As imagens glomerulares foram digitalizadas usando microscópio óptico Zeiss Axiophot HBO50, equipado com câmera Axiocam ICc3 (Carl Zeiss®, Jena, Alemanha). Após a digitalização, o tufo glomerular foi identificado e a área foi calculada em μm^2 utilizando o software de análise (Optimas 5.1; Optimas Corporation, Seattle, WA). Vinte glomérulos corticais, em seis animais por grupo, foram medidos em cada animal. O volume glomerular (VG) foi calculado a partir da área transversal do tufo glomerular (TG), utilizando a fórmula - $\text{VG} = \beta/\kappa (\text{TG})^{3/2}$ onde $\beta=1,38$ coeficiente da esfera e $\kappa=1,1$ coeficiente de distribuição de tamanho (ZHENG et al., 2004).

Realizamos análise quantitativa da presença de fibrose renal pela coloração pelo Picrosirius (F3BA CI 35782, Sigma, St. Louis, EUA). Essa análise foi realizada por um analista experiente que desconhecia a fonte da amostra. A porcentagem de tecido fibroso foi calculado sob luz polarizada no aumento de 200x em microscópio óptico modelo Axiophot HBO50 (Carl Zeiss, Goettingen, Germany), dotado de câmera para captura modelo Axiocam ICc3 (Carl Zeiss, Goettingen, Germany). O microscópio estava acoplado a um computador dotado de programa de captura de imagem e sistema de mensuração digital automática Axiovision Release, versão 4.7.2.0 (Carl Zeiss, Goettingen, Alemanha).

As áreas vermelhas brilhantes sob a luz polarizada, que indicam presença de colágeno, foram quantificadas utilizando o software ImageJ 1.43a, 64 bits (National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsbweb.nih.gov/ij>) (OLIVEIRA et al., 2012; SEMEDO et al., 2009). O resultado da análise foi representado em percentagem, e refere-se à proporção de volume intersticial de colágeno no córtex para o total de volume cortical, e em seguida a media aritmética dos campos analisados foi calculada para cada lamina. A percentagem de positividade de área corada foi contada em 20 campos consecutivos e não sobrepostos de 0,09mm² por animal, seis animais por grupo. Vasos, glomérulos e a medula foram evitados durante a aquisição das imagens (OLIVEIRA et al., 2012).

5.6 Análise Imunohistoquímica

A quantificação de fator pró fibrótico TGF- β 1 (1:500; Santa Cruz,USA) e do marcador de transição epitélio mesenquimal α -SMA (1:300; Abcam, Cambridge, Reino Unido) foi detectada por métodos imunohistoquímicos. Cortes (5 μ m) do rim esquerdo fixados em formol 4% tamponado foram seccionados e montados em lâminas silanizadas.

As lâminas foram desparafinadas em xilol e hidratadas em banhos crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 100%) e submetidas à Tris-EDTA pH 9 e a solução de recuperação de antígeno a 95°C em banho-maria. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio 3%, posteriormente os cortes foram bloqueados com a solução Protein Block (Dako, Ely, Reino Unido). Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário ou um reagente de controle negativo, seguido por incubação com o polímero marcador (Envision; Dako, Ely, Reino Unido),

utilizando duas incubações sequenciais de 30 minutos em temperatura ambiente. A visualização do complexo antígeno-anticorpo foi alcançada pela incubação com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) até atingir uma cor acastanhada. A contracoloração foi realizada com hematoxilina, e montadas com lamínula e resina entelan.

A análise quantitativa, foi realizada em aumento 200x para α -SMA e 400x para TGF- β 1, usando o mesmo equipamento utilizado para a análise histomorfológica supracitada. Para α -SMA, a percentagem da área corada pelo anticorpo considerada positiva, foi calculada usando um macro automatizado especialmente desenvolvido para o pacote de software ImageJ 1.43a, 64-bit (National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) (OLIVEIRA et al., 2010;). Os resultados foram representados em percentagem, referentes à positividade do marcador imunohistoquímico. Os pontos de marcação foram contados em 20 campos por animal (n=6/grupo). Os campos foram padronizados em 0,09mm² e contados de maneira que não se sobrepusessem. Para análise dos resultados obteve-se a média aritmética dos pontos dos 20 campos. Vasos, glomérulos e a medula foram evitados durante a aquisição das imagens (SEMEDO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012).

As células TGF- β 1 positivas foram contadas manualmente usando o software ImageJ 1.43a, 64-bit (National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Os resultados foram representados em número de células por campo, referentes à positividade do marcador imunohistoquímico. Os pontos de marcação foram contados em 20 campos por animal (n=6/grupo). Os campos foram padronizados em 0,09mm² e contados de maneira que não se sobrepusessem. Para análise dos resultados obteve-se a média aritmética dos pontos dos 20 campos. Vasos,

glomérulos e a medula foram evitados durante a aquisição das imagens (SEMEDO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012).

5,7 Função renal

No momento da eutanásia, foi coletado sangue (jejum de 8 horas) para dosagem sérica da creatinina (Cr). A creatinina urinária foi dosada na urina de 24h colhida em gaiola metabólica. Os ensaios foram realizados com Kits comerciais (Labtest[®], Lagoa Santa, Brasil), em analisador automático Labmax progress (Labtest[®], Lagoa Santa, Brasil). O clearance de creatinina (Ccr) foi calculado usando a seguinte equação: $Ccr \text{ (ml/min/kg)} = [Cr \text{ urinária (mg/dL)} \times \text{volume urinário (mL)}] / Cr \text{ sérica (mg/dL)} [1000/\text{peso corporal (g)}] [1/1440 \text{ (min)}]$ (Yamabe et al., 2007).

5.8 Análise Bioquímica Enzimas Hepáticas

Para avaliar lesão hepática, foram feitas análises séricas de Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST) e Gama-glutamil Transpeptidase (γ -GT). As análises foram realizadas em aparelho automático modelo Labmax Progress, Labtest[®], (Lagoa Santa, Brasil), com os kits comerciais também da marca Labtest[®], (Lagoa Santa, Brasil).

5.9 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média e desvio padrão. A normalidade da amostra foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os grupos hiperlipídicos foram comparados pelo teste de variância ANOVA bicaudal e teste de Dunnet. O nível de significância assumido foi $p < 0,05$. O programa SPSS 15.0 foi usado em todas as análises

6. Resultados e Discussão

Os resultados geraram apresentação de resumos e artigos conforme se apresenta adiante.

6.1 Resumos Apresentados em congresso

6.1.1. Avaliação do efeito da quercetina sobre o fígado de ratos wistar obesos

Apresentação de trabalho, na forma de pôster, no I Simpósio Farmacêutico – Universidade Federal de Juiz de Fora-2011.

TERRA, Marcella Martins; MACHADO, Hussen; GUERRA, Martha de Oliveira; PETERS, Vera Maria.

6.1.2. Indução de obesidade em Ratos Wistar através de dieta hiperlipídica

Apresentação de trabalho, na forma de pôster, no XIII Congresso Internacional da Sociedade Brasileira de ciência de Animais de Laboratório – SBCAL-2012.

Terra MM, Machado H, Guerra MO, Peters VM

6.1.3. Dissociação da resposta antihipertensiva em relação aos bloqueios da angiotensina II e da aldostera em modelo experimental de síndrome metabólica

Apresentação de trabalho, na forma de pôster, no XXVI Congresso Brasileiro de Nefrologia - 2012.

Machado H, Sanders-Pinheiro H, Terra MM, Guerra MO, de Paula RB, Peters VR.

6.1.4 Indução da síndrome metabólica em ratos wistar por dieta hiperlipídica como ferramenta para estudos terapêuticos

Apresentação de trabalho, na forma de pôster, no I Congresso AUCyTAL- 2013.

Marcella M. Terra, Hussen Machado, Martha O. Guerra, Hélydy S. Pinheiro, Vera M.Peters.

6.2 Artigo Publicado

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

Dissociação da resposta anti-hipertensiva e metabólica à losartana e espironolactona em ratos com síndrome metabólica experimental

Dissociation of antihypertensive and metabolic response to losartan and spironolactone in experimental rats with metabolic syndrome

Autores
 Hussan Machado¹
 Helady Sanders Pinheiro¹
 Marcela Martins Toma¹
 Marinha de Oliveira Guerra¹
 Rogério Baumgratz de Paula¹
 Vera Maria Peters¹

¹ Universidade Federal de Juiz de Fora.

Data de submissão: 29/03/2012.
 Data de aprovação: 11/08/2012.

Correspondência para:
 Hussan Machado,
 Centro de Biologia de Reprodução-
 CBR, Universidade Federal de Juiz
 de Fora,
 Rua José Lourenço Kelmer
 s/n, Campus Universitário, São
 Pedro, Juiz de Fora, MG, Brasil.
 CEP: 38036-900.
 E-mail: hussanmachado@hotmail.com

RESUMO

Introdução: O tratamento da hipertensão arterial (HA) em indivíduos com síndrome metabólica (SM) é um desafio, uma vez que terapias não medicamentosas são de difícil implementação e o tratamento farmacológico ideal não está totalmente estabelecido. **Objetivo:** Avaliar o bloqueio do sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA) na pressão arterial (PA), na função e na morfologia renal em modelo experimental de SM induzida por dieta hiperlipídica. **Métodos:** Ratos Wistar receberam ração hiperlipídica a partir da quarta semana de vida, por 20 semanas. Os grupos tratados receberam Losartana ou Espironolactona a partir da oitava semana de vida. Avaliou-se semanalmente o peso corporal e a PA de cada por plethysmografia. Ao final do experimento, foram realizados testes de tolerância oral à glicose, perfil lipídico, clearance de creatinina, medida direta da PA, análise morfométrica renal. **Resultados:** A administração de dieta hiperlipídica se associou ao desenvolvimento de SM, caracterizada por acúmulo central de gordura, hipertensão arterial, hiperglicemia e hipertrigliceridemia. Neste modelo não foram observadas alterações da histomorfometria renal. O bloqueio do receptor AT1 da angiotensina II (Ang II) preveniu o desenvolvimento da HA. O bloqueio mineralocorticoide não apresentou eficácia anti-hipertensiva, porém, associou-se à redução da gordura abdominal. **Conclusão:** A dissociação da resposta anti-hipertensiva aos bloqueios dos receptores da Ang II e mineralocorticoide indica a participação da Ang II na gênese da HA associada à obesidade. A redução da obesidade central com a Espironolactona sugere a presença de efeito adipogênico mineralocorticoide.

Palavras-chave: animais, hipertensão, obesidade, sistema renina-angiotensina, síndrome x metabólica.

ABSTRACT

Introduction: The treatment of arterial hypertension (AH) in patients with metabolic syndrome (MS) is a challenge, since non drug therapies are difficult to implement and optimal pharmacological treatment is not fully established. **Aim:** To assess the blockade of the renin-angiotensin aldosterone system (RAAS) in blood pressure (BP) in renal function and morphology in an experimental model of MS induced by high fat diet. **Methods:** Wistar rats were fed on high fat diet from the fourth week of life, for 20 weeks. The groups received Losartan or Spironolactone from the eighth week of life. We weekly evaluated the body weight and BP by tail plethysmography. At the end of the experiment oral glucose tolerance, lipid profile, creatinine clearance tests, and the direct measurement of BP were performed. A morphometric kidney analysis was performed. **Results:** The administration of high-fat diet was associated with the development of MS, characterized by central fat accumulation, hypertension, hyperglycemia and hypertriglyceridemia. In this model there were no changes in renal histomorphometry. The blockade of angiotensin II (Ang II) receptor AT1 prevented the development of hypertension. The mineralocorticoid blockade did not have antihypertensive efficacy but was associated with reduction of abdominal fat. **Conclusion:** The dissociation of the antihypertensive response to the blockades of Ang II receptors and mineralocorticoid indicates the involvement of Ang II in the pathogenesis of hypertension associated with obesity. Reduction of central obesity with Spironolactone suggests the presence of mineralocorticoid adipogenic effect.

Keywords: animals, hypertension, metabolic syndrome x, obesity, renin-angiotensin system.



SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA
Fundada em 1960 Departamento de Nefrologia da AMB



Of./096/JBN/2013

São Paulo, 03 de junho de 2013.

Ilmo. Sr.
Dr. Hussien Machado

Prezado Dr. Machado,

O Jornal Brasileiro de Nefrologia certifica que o trabalho intitulado "**Dissociação da resposta anti-hipertensiva e metabólica à losartana e espironolactona em ratos com síndrome metabólica experimental**", de sua autoria e colaboradores, publicado na edição JBN 2012; 34, número 4, foi escolhido para receber o **Prêmio Prof. Heonir Rocha 2013** concedido ao melhor artigo original publicado no JBN e selecionado dentre os artigos originais das edições de Jun/Dez de 2012, Vol.34 e Mar/Jun de 2013, Vol.35.

A comissão do Prêmio e a Diretoria da Sociedade Brasileira de Nefrologia o parabenizam e agradecem a escolha do Jornal Brasileiro de Nefrologia para publicação do artigo de sua autoria *et als*.

Detalhes da premiação serão informados pela secretária Adriana Paladini.

À disposição para maiores informações.

Atenciosamente,

Prof. Dr. João Egidio Romão Junior
Editor Chefe– Jornal Brasileiro de Nefrologia

6.3 Resultados Preliminares

Referente às análises bioquímica de lesão hepática, encontra-se na tabela abaixo (Tabela 3). Esses resultados serão posteriormente complementados com os resultados das análises histomorfológicas que estão em andamento, sendo feitas por patologista externo. Bem como se encontra em andamento a redação de um artigo onde apresentará tais resultados e discussão.

Tabela 3: Níveis de Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), e Gama-glutamil Transpeptidase (γ -GT) em mg/dL.

	Controle (C)		Síndrome Metabólica (SM)	SM/Quercetina (SMQ)
	N	10	10	10
AST		94,30 \pm 18,85	125,00 \pm 30,36*	107,50 \pm 22,83
ALT		52,70 \pm 7,30	50,00 \pm 17,12	58,40 \pm 30,75
γ-GT		6,30 \pm 1,76	6,55 \pm 3,39	5,90 \pm 2,55

Dados apresentados em média \pm desvio padrão; * $p < 0,05$ vs grupo controle (teste de Dunnet). Os grupos SM e SMQ não são diferentes entre si.

Houve aumento significativo nos níveis de AST, achado compatíveis com estudo de Liew et al. (2006), porém a quercetina não foi capaz de reduzir tal parâmetro, apesar de apresentar moderada redução. Nos demais parâmetros analisados não foram observadas diferenças.

6.4 Artigo enviado para publicação

O artigo intitulado “**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA QUERCETINA EM RATOS WISTAR COM SÍNDROME METABÓLICA**” foi submetido ao periódico Clinical and Experimental Nephrology.

Marcella M. Terra^{1*}, Hussen Machado¹, Hélyady S. Pinheiro¹, Martha O. Guerra¹, Vera M. Peters¹.

¹Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora - Brasil

*Autor para correspondência

Marcella Martins Terra – email: marcellaterra@yahoo.com.br

Centro de Biologia da Reprodução/Universidade Federal de Juiz de Fora

Endereço: Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Campus Universitário Bairro: São Pedro. CEP: 36036-900. Telefone: +55 32 21023251

De: [Clinical and Experimental Nephrology <cen@springer.jp>](mailto:cen@springer.jp)

Para: Marcella Terra <marcellaterra@yahoo.com.br>

Enviadas: Segunda-feira, 1 de Julho de 2013 20:52

Assunto: Acknowledgement of Receipt

Dear Mrs. Marcella Terra:

Thank you for submitting your manuscript, "Evaluation of the effect of quercetin in Wistar rats with metabolic syndrome", to Clinical and Experimental Nephrology.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://cen.edmgr.com/>

With kind regards,

The Editorial Office
Clinical and Experimental Nephrology

7. Comentários Finais

No presente estudo, a administração de dieta rica em lipídios, por um período de 20 semanas, induziu obesidade central, hipertrigliceridemia, alterações glicídicas e hipertensão arterial em ratos Wistar, achados compatíveis com diagnóstico da SM.

Outro achado interessante do nosso estudo foi a presença de fibrose renal nos grupos com SM que apresentaram aumento na expressão de TGF- β 1 e Colágeno tipo I e III, marcadores de fibrose. Porém a quercetina não foi capaz de prevenir o surgimento de fibrose apesar de causar de uma leve redução nos marcadores avaliados.

Quando avaliamos marcadores bioquímicos de lesão hepática, observamos aumento no AST, porém esses dados serão complementados pelos estudos histomorfológicos.

A administração de quercetina não alterou significativamente os perfis metabólicos e glicídicos dos animais. Além do mais, não observamos alterações na função renal, avaliada pela creatinina e pela depuração de creatinina, na morfometria renal e nas proteínas marcadoras da transição epitélio-mesenquimal α -SMA.

8. Conclusão

Em conclusão, Ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica desenvolveram Síndrome Metabólica e apresentaram aumento na AST, presença de fibrose renal, verificada através do aumento na expressão de TGF- β 1 e Colágeno tipo I e III por picrosirius sob luz polarizada, mas as demais dosagens bioquímicas e marcador de TEM α -SMA não foram diferentes.

A administração crônica diária da quercetina não alterou de forma significativa o perfil nutricional, bioquímico e pressórico dos animais, nem foi capaz de prevenir significativamente a fibrose renal.

9. Referências

ABDEL-RAHEEM, I.T. et al. Protective Effect of Quercetin against Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 32, n.1, 61-7, 2009.

ABRAMS, G.A. et al. Portal fibrosis and hepatic steatosis in morbidly obese subjects: A spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, v. 40, 475-483. 2004.

AFANAS'EV, I.B. et al. Chelating and Free Radical Scavenging Mechanism of Inhibitory Action of Rutin and Quercetin in Lipid Peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, v. 38, 1763-9, 1989.

AHLENSTIEL, T. et al. Bioflavonoids attenuate renal proximal tubular cell injury during cold preservation in Euro-Collins and University of Wisconsin solutions. *Kidney International*, v. 63, 554 -563, 2003.

ALBERTI, K.G. e ZIMMET, P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine*, v. 15, 539- 553, 1998

ALBERTI, K.G. et al. Metabolic Syndrome — A new world-wide definition. A consensus statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine*, v.23, n. 5, 469-480, 2006.

ALEXANDER, C.M. et al. NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and the prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes Care*, v. 52, 1210-1214, 2003.

BARBOSA, P.J.B. et al. Critério de Obesidade Central em População Brasileira: Impacto sobre a Síndrome Metabólica. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v. 87, 407-414, 2006.

BEHLING, E.B., et al. FLAVONÓIDE QUERCETINA: ASPECTOS GERAIS E AÇÕES BIOLÓGICAS. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v.15, n. 3, 285 -292, 2004.

BEHLING, E.B., et al. Comparative study of multiple dosage of quercetin against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rat kidneys. *Pharmacological reports*, v. 58, 526-532, 2006.

BITENCOURT, A.G.V. et al. Doença hepática gordurosa não alcoólica: características clínicas e histológicas em obesos graves submetidos à cirurgia bariátrica. *Acta Gastroenterol Latinoam*, v. 37, n. 4, 224-230, 2007.

BÖTTINGER, E.P. TGF-beta in renal injury and disease. *Seminars in Nephrology*, v. 27, n.3, 309-320, 2007.

BRENNER, D.A., et al. New aspects of hepatic fibrosis. *Journal of Hepatology*, v.1, 32-38, 2000.

COSTA, M.B. et al. Aldosterone antagonist decreases blood pressure and improves metabolic parameters in obese patients with the metabolic syndrome. *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich)*, v. 12, n. 9, 753-755, 2010.

COSTA, M. C. et al. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 upregulation in progressive renal disease. *Einstein*, v. 7, n. 1, 436-444, 2009.

DEFRONZO, R.A. e FERRANINI, E. Insulin resistance – A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, v. 14, 173-194, 1991.

DOURMASHKIN, J.T. et al. Different forms of obesity as a function of diet composition. *International Journal of Obesity*, v. 29, 1368-78, 2005.

DUNSTAN, D.W. et al. The rising prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance. The Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study. *Diabetes Care*, v. 25, 829-34, 2002.

ENGELI, S. et al. Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension*, v. 45, n. 3, 356-62, 2005.

EZEQUIEL, D.G.A. et al. Efeito da perda de peso sobre a hemodinâmica renal em portadores da síndrome metabólica. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 34, 36-42, 2012.

FERREIRA, A.P. et al. Síndrome metabólica em crianças obesas e fatores de risco para doenças cardiovasculares de acordo com a resistência à insulina (HOMA-IR). *Jornal de Pediatria (Rio J.)*, v. 83, n. 1, 21-6, 2007.

FORMICA, J.V. e REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, v. 33, n. 12, 1061-80, 1995.

GIORGINO, F. et al. Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from *in vivo* and *in vitro* studies. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 183, 13-30, 2005.

GOODPASTER, B.H. et al. Obesity, regional body fat distribution, and the metabolic syndrome in older men and women. *Archives of Internal Medicine*, v. 165, 777-83, 2005.

GRIFFIN, K.A. et al. Adverse renal consequences of obesity. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, v. 294, 685-696, 2008.

GRUNDY, M. et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*, v. 109, 433-8, 2004.

GUGLIELMONE, H.A. et al. Anticoagulant effect and action mechanism of sulphated flavonoids from *Flaveria bidentis*. *Thrombosis Research*, v. 105, n. 2, 183-188, 2002.

HAFFNER, S.M. et al. Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes*, v. 41, 715-22, 1992.

HERMSDORFF, H.H.M. e MONTEIRO, J.B.R. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica*, v. 48, 803-11, 2004.

HERNANDEZ-GEA, V. e FRIEDMAN, S.L. Pathogenesis of liver fibrosis. Annual Review of Pathology, v. 6, 425-456, 2011.

HERTOG, M.G.L. et al. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. Nutricional Cancer, v. 20, n. 1, 21-29, 1993.

HUNLEY, T.E. et al. Scope and mechanisms of obesity-related renal disease. Current Opinion in Nephrology Hypertension, v. 19, n. 3, 227-23, 2010.

I DBSM - Diretriz brasileira de diagnóstico e tratamento da síndrome metabólica. Arquivo Brasileiro de Cardiologia, v. 84, n. 11, 1-28. 2005

IDF. International Diabetes Federation Disponível em: <http://www.idf.org/webdata/docs/MetSyndromefinal.pdf>. Acessado em 29 de outubro de 2012.

IOTF. International Association for the Study of Obesity. The Global epidemic. Disponível em: <http://www.iaso.org/iotf/obesity/obesitytheglobalepidemic/>. Acessado em: 10/abril/ 2013.

IKIZLER, M. et al. Dietary polyphenol quercetin protects rat hearts during reperfusion: enhanced antioxidant capacity with chronic treatment. Anatolian Journal of Cardiology, v. 7, n. 4, 404-410, 2007.

IOTF. International Association for the Study of Obesity. The Global epidemic. Disponível em: <http://www.iaso.org/iotf/obesity/obesitytheglobalepidemic/>. Acessado em: 10/abril/ 2013.

ISOMAA, B. et al. “Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome”. Diabetes Care, v. 24, 683–689, 2001.

ISRAILI, Z.H. et al. Metabolic Syndrome: Treatment of Hypertensive Patients. American Journal of Therapeutics, v. 14, n. 4, 386-402, 2007.

ITF. International Task Force. Disponível em: <http://www.ietf.org>, 2006. Acessado em: 25/setembro/2012.

JIN, H.B. et al. Protective roles of quercetin in acute myocardial ischemia and reperfusion injury in rats. *Molecular Biology Reports*, v. 39, n. 12, 11005-9. 2012.

JOLLIFFE, C.J. e JANSSEN, I. Vascular risks and management of obesity in children and adolescents. *Vas Health Risk Manag*, v. 2, n. 2, 171-87, 2006.

KAHN, S.E. et al. Obesity is a major determinant of the association of C-reactive protein levels and the metabolic syndrome in type 2 diabetes. *Diabetes*, v. 55, 2357-64, 2006.

KALLURI, R. e NEILSON, E.G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 112, n. 12, 1776-1784, 2003.

KANDASWAMI, C. e MIDDLETON, E.Jr. Free Radical Scavenging And Antioxidant Activity Of Plants Flavonoids. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 366, 351-76, 1994.

KELLEY, D.E. et al. Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annual Review of Nutrition*, v. 22, 325-46, 2002.

KIM, H.P. et al. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 96, n. 3, 229-45, 2004.

KORSTEN-RECK, U. et al. Frequency of secondary dyslipidemia in obese children. *Vas Health Risk Manag*, v. 4, n. 5, 1089-94, 2008.

LAGUARDIA, H.A. et al. The metabolic syndrome and risk of chronic kidney disease: pathophysiology and intervention strategies. *Journal of Nutrition and Metabolism*, v. 2012, 9 p., 2012.

LEE, E.S. et al. The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 55, n. 8, 1169 -1174, 2003.

LEE, J. M. et al. The epithelial- mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of Cell Biology*, v. 172, n. 7, 973-981, 2006.

LIEW, P.L. et al. Hepatic histopathology of morbid obesity: concurrence of other forms of chronic liver disease. *Obesity surgery*, v. 16, n. 12, 1584-1593, 2006.

LOPES, H.F. Hypertension and inflammation: contribution of obesity. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v.14, n. 4, 239-244, 2007.

LÓPEZ-POSADAS, R. et al. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. *Biochemical Pharmacology*, v.76, n. 4, 495-506, 2008.

MACHADO, H. et al. Dissociation of antihypertensive and metabolic response to losartan and spironolactone in experimental rats with metabolic syndrome. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 34, n. 4, 328-36, 2012.

MACHADO, H. Implantação e padronização da técnica de aferição indireta da pressão arterial em ratos Wistar da colônia do biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR). *Rev. Interdisciplin.Est. Exp. Anim. Hum*, v. 2, 60-1, 2010.

MAHESH, T. e MENON, V.P. Quercetin allievates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytotherapy Research*, v. 18, n. 2, 123 -127, 2004.

MARCHESINI, G. et al. Non alcoholic fatty liver disease - A feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*, v. 50, 1844-1850, 2001.

MARCHIONNE, E.M. et al. Chronic renin inhibition with aliskiren improves glucose tolerance, insulin sensitivity, and skeletal muscle glucose transport activity in obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 302, 137-42, 2012.

MATOS, A.F.G. et al. Aspectos neuroendócrinos da síndrome metabólica. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, v. 47, n. 4, 410-21, 2003.

MIDDLETON, E. et al. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, v. 52, n. 4, 673-751, 2000.

MILTERSTEINER, A., et al. Uso De Quercetina A Longo Prazo Em Ratos Cirróticos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 18, n. 3, 232-7, 2003.

NASCIMENTO, A.F. et al. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. *Biological Research*, v. 41, n. 3, 253-9, 2008.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório. Goiânia: National Academy Press.162p. 2003.

NEILSON, E.G. Setting a trap for tissue fibrosis, News and Views. *Nature Medicine*, v. 11, n. 4, 373-374, 2005.

NIJVELDT, J.R. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potencial applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 74, 418-425, 2001.

NCEP III - third report of the national cholesterol education program. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *Final Report Circ*, v. 106, 3143–3421, 2002.

NCEP III - executive summary of the third report of the national cholesterol education program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*, v. 285, 2486-97, 2001.

OGDEN, C. L. et al. Prevalence of overweightand obesity in the United States, 1999–2004. *JAMA*, v. 295, 1549–1555, 2006.

OLIVEIRA, F.A. et al. Low-level laser therapy decreases renal interstitial fibrosis. *Photomed Laser Surg*, v. 30, 705-13, 2012.

OLIVEIRA, R.S.F. et al. Programming image software for automatic selection of immunohistochemistry marked areas stained by dab chromogen and counter-stained by hematoxylin. *Rev. Interdisciplin. Est. Exp. Anim. Hum.*, v. 2, 76–80, 2010.

PALANISAMY, N. et al. Renoprotective and blood pressure-lowering effect of dietary soy protein via protein kinase C β II inhibition in a rat model of metabolic syndrome. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 88, n. 1, 28-37, 2010.

PELUSO, M.R. Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. *Experimental Biology and Medicine*, v. 231, 1287–1299, 2006.

RIBEIRO, E.B. Studying the central control of food intake and obesity in rats. *Revista de Nutrição Campinas*, v. 22, n. 1, 163-171, 2009.

RIBEIRO FILHO, F.F. et al. Visceral fat and metabolic syndrome : more than a simple association. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, v. 50, n. 2, 230-8, 2006.

RIVERA, L. et al. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity*, v. 16, 2081–2087, 2008.

ROGERIO, A.P. et al. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflammation Research*, v. 56, n. 10, 402-8, 2007.

ROMERO, M. et al. Lack of beneficial metabolic effects of quercetin in adult spontaneously hypertensive rat. *European Journal of Pharmacology*, v. 627, n. 1-3, 242-50, 2010.

SALAROLI, L.B. et al. Prevalence of metabolic syndrome in population based study, Vitória, ES-Brazil. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 51, 1143-52, 2007.

SANDERS, R. A. et al. Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 15, n. 3, 143 -149, 2001.

SANTOS, C.R.B. et al. Fatores dietéticos na prevenção e tratamento de comorbidades associadas a síndrome metabólica. *Revista de Nutrição*, v. 19, n. 3, 389-01, 2006.

SAPONARA, S. et al. Quercetin as a novel activator of L-type Ca^{2+} channels in rat tail artery smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology*, v. 135, n. 7, 1819 -1827, 2002.

SEIVA, F.R. et al. Quercetin ameliorates glucose and lipid metabolism and improves antioxidant status in postnatally monosodiumglutamate induced metabolic alterations. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, n. 10, 3556-61, 2012.

SEMEDO, P. et al. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. *Stem Cells*, v. 27, 3063–3073, 2009.

SHOSKES, D.A. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury. *Transplantation*, v. 66, n. 2, 147 -152, 1998.

SIMMONS, R.K. et al. “The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO expert consultation”. *Diabetologia*, v. 53, 600–605, 2010.

SLEE, A.D. Exploring metabolic dysfunction in chronic kidney disease. *Nutrition & Metabolism*, v. 9, n. 36, 16p., 2012.

STEEMBURGO, T. et al. Fatores dietéticos e síndrome metabólica. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, v. 51, n. 9, 1425-33, 2007.

STRAUB, R.H. et al. Hormone replacement therapy and interrelation between serum interleukin-6 and body mass index in postmenopausal women: a population-based study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 85, 1340-4, 2000.

TAKAHASHI, Y. e FUKUSATO, T. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: overview with emphasis on histology. *World Journal of Gastroenterology*, v. 16, n. 42, 5280-5, 2010.

THAMER, C. et al. Intrahepatic lipids are predicted by visceral adipose tissue mass in healthy subjects. *Diabetes Care*, v. 27, 2726-9, 2004.

TIMAR, O. et al. Metabolic syndrome X: A review. *Canadian Journal of Cardiology*, v. 16, 779-89, 2000.

TOLOSA, E.M.C. et al. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2ed. São Paulo: Manole; 2003.

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO. Arquivo Brasileiro de Cardiologia, v. 95, 1-51, 2010.

WAJCHENBERG, B.L. et al. Tecido adiposo na encruzilhada no desenvolvimento da síndrome metabólica, inflamação e aterosclerose. Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia, v. 53, n. 2, 145-50, 2009

WEISBERG, S.P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. Journal of Clinical Investigation, v. 112, 1796-808, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight: what are overweight and obesity? Report of a WHO Consultation. Geneva. WHO Technical Report. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity : preventing and managing the global epidemic, in report of WHO Consultation on Obesity. Geneva : World Health Organization, 1998.

WOLFENSOHN, S. e LLOYD, M. Handbook of laboratory animal management and welfare. New York: Oxford University Press Inc. 304p. 1994.

YAMABE, N. et al. Beneficial effect of Corni Fructus, a constituent of Hachimi-jio-gan, on advanced glycation end-product-mediated renal injury in Streptozotocin-treated diabetic rats. Biol Pharm Bull, v.30, 520-526, 2007.

YUDKIN, J.S. et al. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? Atherosclerosis, v. 148, 209-14, 2000.

ZEISBERG, M. et al. Fibroblasts Derive from Hepatocytes in Liver Fibrosis via Epithelial to Mesenchymal Transition. The Journal of Biological Chemistry, v. 282, n. 32, 23337–23347, 2007.

ZHENG, S. et al. Development of late stage diabetic nephropathy in OVE26 diabetic mice. Diabetes, v.53, 3248-57.2004.

10. Apêndices

10.1 Apêndice A

Artigo enviado para publicação.

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA QUERCETINA EM RATOS WISTAR COM SÍNDROME METABÓLICA

10.2 Apêndice B

- Apresentação de trabalho, na forma de pôster, no I Simpósio Farmacêutico – Universidade Federal de Juiz de Fora-2011.

Avaliação do efeito da quercetina sobre o fígado de ratos wistar obesos

TERRA, Marcella Martins; MACHADO, Hussen; GUERRA, Martha de Oliveira; PETERS, Vera Maria.

Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora.

Introdução: Obesidade é considerada um problema de saúde pública, pois afeta o funcionamento de coração, rim e fígado, nesse último, pelo acúmulo de gordura levar a produção de citocinas inflamatórias e adipocinas culminando em esteatose (Noeman; Hamooda; Baalash, 2011) e hepatite. A quercetina poderia ser útil para evitar a esteatose hepática, dadas as suas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias (Behling et al., 2004). Este estudo avalia o efeito hepatoprotetor da quercetina em ratos Wistar com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. **Métodos:** 30 ratos Wistar machos, com 25 dias, foram distribuídos em três grupos (n=10) que receberam: Grupo A- dieta padrão, Grupo B- ração hiperlipídica e grupo C ração hiperlipídica e 10mg/kg/dia de solução de quercetina *per os* a partir dos dois meses de idade. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Os ratos foram pesados semanalmente e eutanasiados por exsanguinação sob anestesia (xilazina (10mg/kg) e quetamina (90mg/kg), i.p.) aos seis meses. Removeram-se e pesaram-se fígado e gordura retroperitoneal. Foi realizada dosagem sérica de Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST) e Gama-glutamil Transpeptidase (γ -GT). Análise estatística: Os grupos A e B; B e C foram comparados entre si através do teste t de Student ($p < 0.05$). Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFJF (Protocolo nº010/2011). **Resultados:** Os resultados encontrados seguem adiante (expressos em média \pm desvio padrão). Peso Corporal (g): G.A (351,25 \pm 20,50); GB (431,26 \pm 41,60); GC

(419,25±40,81) AXB $p<0.05$. Peso gordura retroperitoneal (g): GA (5,44±1,76); GB (14,84±3,07); GC (16,06±4,23) AXB $p<0.05$. Peso do fígado (g): GA (10,45±0,95); GB (13,77±1,91); GC (12,63±1,71) AXB $p<0.05$. AST (U/L): GA (94,30±18,85); GB (126,62±31,40); GC (107,50±22,01) AXB $p<0.05$. As demais variáveis não apresentaram diferenças. **Discussão:** A obesidade induzida por dieta em roedores é considerada o modelo mais próximo de reproduzir a doença humana (Ribeiro, 2009) e foi eficaz em nosso estudo. Liew et al. (2006) confirmaram que alterações nos testes de lesão hepática (aumento AST/ALT) estavam associados com a obesidade. O aumento no peso do fígado pode ser indicativo de que a obesidade provocou depósito de gordura no órgão já que a drenagem venosa da adiposidade visceral segue pelo sistema porta até o fígado (Noeman; Hamooda; Baalash, 2011). Neste experimento observou-se aumento do peso da gordura retroperitoneal. Apesar dos relatos de Behling et al. (2004) de que a quercetina reduziria o acúmulo hepático de lipídeos, no presente trabalho não foi observado redução no peso do órgão ainda que houvesse aumento da gordura retroperitoneal. **Conclusão:** A dieta hiperlipídica foi eficaz na indução de obesidade em ratos Wistar, mas quercetina parece não reduzir o acúmulo de gordura bem como os marcadores da lesão hepática.

- Apresentação de trabalho, na forma de pôster, no XIII Congresso Internacional da Sociedade Brasileira de ciência de Animais de Laboratório – SBCAL-2012.

Indução de obesidade em Ratos Wistar através de dieta hiperlipídica

Terra MM¹, Machado H¹, Guerra MO¹, Peters VM¹

Introdução: Obesidade é um dos principais problemas de saúde pública, devido principalmente à transformação no estilo de vida e hábitos alimentares; é consequência do desequilíbrio entre a energia ingerida e a gasta para a manutenção de processos vitais. Estudos recentes mostram a elevada incidência da obesidade e sua associação com fatores de riscos como diabetes mellitus tipo II, hipertensão, neoplasias, dislipidemia, doenças cardiovasculares e renais, determinando o aumento no risco de mortalidade e cormobidade, tornando-se importante o estudo da obesidade. Apesar de existirem animais geneticamente modificados para indução da obesidade, o problema da obesidade mais preocupante, atualmente, é a que ocorre por alimentação imprópria. Dessa forma, é importante obter-se modelo biológico mais próximo daquele que ocorre em humanas. **Objetivo:** Verificar se a dieta hiperlipídica é eficaz na indução de obesidade em ratos Wistar. **Métodos:** 20 ratos Wistar machos, com 25 dias, foram distribuídos em dois grupos (n=10) que receberam: Grupo A- dieta padrão, Grupo B- ração hiperlipídica. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Os ratos foram pesados semanalmente e eutanasiados por exsanguinação sob anestesia (xilazina (10mg/kg) e quetamina (90mg/kg), i.p.) aos seis meses. Removeram-se e pesaram-se gordura retroperitoneal e epididimária esquerda. Análise estatística: Os grupos A e B foram comparados entre si através do teste t de Student ($p < 0.05$). Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFJF (Protocolo nº010/2011). **Resultados e discussão:** Peso Corporal (g): G.A (351,25±20,50); GB (431,26±41,60) $p < 0.05$. Peso gordura retroperitoneal (g): GA (5,44±1,76); GB (14,84±3,07) $p < 0.05$. Peso gordura epididimária esquerda (g): GA (2,47±0,64); GB (6,64±1,49) $p < 0.05$. A obesidade induzida por dieta em roedores é considerada o modelo mais próximo de reproduzir a doença humana, em nosso estudo observou-se aumento no peso corporal, peso da gordura retroperitoneal e epididimária esquerda, mostrando que a dieta hiperlipídica utilizada apresentou eficiência energética para desenvolver a obesidade em ratos Wistar.

- Apresentação de trabalho, na forma de pôster, no I Congresso AUCyTAL- 2013.

Indução da síndrome metabólica em ratos wistar por dieta hiperlipídica como ferramenta para estudos terapêuticos

Marcella M. Terra, Hussen Machado, Martha O. Guerra, Hélyady S. Pinheiro, Vera M. Peters.

Introdução: A Síndrome Metabólica (SM) caracteriza-se por acúmulo central de gordura, hipertensão arterial e hipertrigliceridemia, sendo seu tratamento difícil pela diversidade de fatores causadores ou contribuintes de modo que o tratamento farmacológico ideal não está bem definido. A quercetina por apresentar ação antioxidante, antiinflamatória e vasodilatadora, poderia ser uma alternativa no tratamento das comorbidades que compõem a SM. **Objetivo:** Avaliar o efeito da quercetina na pressão arterial (PA), dislipidemia e acúmulo de gordura visceral em modelo de SM induzida por dieta hiperlipídica. **Métodos:** 30 ratos Wistar machos foram distribuídos, em três grupos (n=10) que receberam respectivamente: GA-dieta padrão; GB-ração hiperlipídica e GC-ração hiperlipídica + 10mg/kg/ dia de solução de quercetina, via oral, a partir dos dois meses de idade. Receberam água e ração ad libitum. Avaliaram-se, semanalmente, peso corporal e pressão arterial da cauda. Ao final do experimento, aos seis meses, foram realizados testes oral de tolerância a glicose e perfil lipídico. Os animais foram anestesiados (xilazina: 10mg/kg e quetamina: 90mg/kg, i.p.) para medida direta da PA. Em seguida, foram exsanguinados e eutanasiados por deslocamento cervical. Os procedimentos foram aprovados pelo CEUA-UFJF (Protocolo nº010/2011). **Resultados:** A administração de dieta hiperlipídica desenvolveu SM, caracterizada por acúmulo central de gordura (GA: 351,25±20,5g; GB: 432,25±41,6g), hipertensão arterial (GA: 120/80 mmHg; GB: 160/80 mmHg), hiperglicemia (GA: 15885 ± 1837 mg/dl; GB: 21449 ± 3692 mg/dl) e hipertrigliceridemia (GA: 28,0 ± 4,8mg/dl; GB: 53,8 ± 12,4 mg/dl). A quercetina não alterou nenhuma das variáveis analisadas. **Conclusão:** A administração crônica diária da quercetina em modelo experimental de SM induzida por dieta hiperlipídica não reduziu a pressão arterial, não alterou o perfil nutricional ou metabólico dos animais.

- Apresentação de trabalho, na forma de pôster, no XXVI Congresso Brasileiro de Nefrologia - 2012.

Dissociação da resposta antihipertensiva em relação aos bloqueios da angiotensina II e da aldosterona em modelo experimental de síndrome metabólica

Machado H, Sanders-Pinheiro H, Terra MM, Guerra MO, de Paula RB, Peters VR

Introdução: A Síndrome Metabólica (SM) é caracterizada pela associação de três ou mais comorbidades como obesidade central, hipertensão arterial (HÁ), intolerância à glicose, aumento nos níveis de triglicérides e redução nos níveis de colesterol HDL. Em conjunto, estes fatores resultam em elevado risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) e lesão renal. O tratamento da SM é um desafio, uma vez que terapias não medicamentosas são de difícil implementação e o tratamento farmacológico ideal não está totalmente estabelecido. **Objetivo:** Avaliar o bloqueio do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) na pressão arterial (PA), na função e na morfologia renais em um modelo experimental de SM induzida por dieta hiperlipídica. **Métodos:** Ratos Wistar receberam ração hiperlipídica a partir da quarta semana de vida, por 20 semanas. Os grupos tratados receberam Losartana ou Espironolactona a partir da oitava semana de vida. Avaliou-se semanalmente o peso corporal e a PA de cauda por pletismografia. Ao final do experimento foram realizados teste oral de tolerância a glicose, perfil lipídico, clearance de creatinina, proteinúria e medida direta da PA. Foi realizada a análise morfométrica do tecido renal. **Resultados:** A administração de dieta hiperlipídica se associou ao desenvolvimento de SM, caracterizada por aumento do peso (17,5% na 10^a. e 22,8% na 28^a. semanas, respectivamente), acúmulo central de gordura, hipertensão arterial, hiperglicemia e hipertrigliceridemia. Nesse modelo não foram observadas alterações da morfometria e função renais. O bloqueio do receptor AT1 da angiotensina II com losartana preveniu o desenvolvimento da HT (PAS 130,5±7,9 vs 159±10,1 mmHg (p<0,001) e PAD 83,1±4,1, vs 94,3±8,5 mmHg; p<0,01, medida direta ao final do experimento). O bloqueio mineralocorticoide não teve eficácia anti-hipertensiva, porém se associou a redução da gordura abdominal (11,0±2,3 vs 14,8±3,1g, p<0,01). **Conclusão:** A dissociação da resposta antihipertensiva aos bloqueios dos receptores da angiotensina II e mineralocorticóide, indica a participação da AII na gênese da HA associada à obesidade. A redução da obesidade central com a Espironolactona sugere a presença de efeito adipogênico mineralocorticóide.

11. Anexos

11.1 Protocolo Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

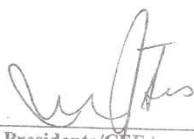
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 010/2011 – CEEA sobre “AVALIAÇÃO DO EFEITO DA QUERCETINA SOBRE O RIM E FÍGADO DE RATOS WISTAR OBESOS”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de VERA MARIA PETERS, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 01/03/2011.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 010/2011 - CEEA about “EVALUATING THE EFFECT OF QUERCETIN ON THE KIDNEY AND LIVER OF OBESE RATS” – VERA MARIA PETERS - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 01/03/2011.

Juiz de Fora, 02 de março de 2011.



Presidente/CEEA



Secretário/CEEA