



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Luciana Lontro Alves

**O óleo de capivara livre e em nanoemulsão induz efeitos benéficos na
morfofisiologia hepática em camundongos C57BL/6 obesos**

Rio de Janeiro

2022

Luciana Lontro Alves

O óleo de capivara livre e em nanoemulsão induz efeitos benéficos na morfofisiologia hepática em camundongos C57BL/6 obesos.

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A474 Alves, Luciana Lontro.
O óleo de capivara livre e em nanoemulsão induz efeitos benéficos na morfofisiologia hepática em camundongos C57BL/6 obesos / Luciana Lontro Alves – 2022.
77 f.

Orientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Obesidade – Teses. 2. Hepatopatia gordurosa não alcoólica – Terapia. 3. Camundongos obesos. 4. Óleo de capivara – Uso terapêutico - Teses. I. Carvalho, Jorge José de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616-08:616.36

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo
CRB7/7143

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Luciana Lontro Alves

**O óleo de capivara livre e em nanoemulsão induz efeitos benéficos na morfofisiologia
hepática em camundongos C57BL/6 obesos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental,
da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de agosto de 2022.

Orientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Alessandra Alves Thole
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Cristiane Matsuura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Vinicius Novaes Rocha
Universidade Federal de Juiz de Fora

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha mãe, Maria Lúcia, que me deu uma força muito grande durante todo esse processo e que não me deixou desanimar em nenhum momento. Ao meu pai, Antônio Eduardo, e minhas avós, Maria Preciosa e Maria Emília, por sempre demonstrarem amor e compreensão nesse momento. Vocês quatro são de extrema importância na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, já que sem Ele nada do que eu estou vivendo seria possível.

Aos meus pais, pela ótima criação que me deram e pelas oportunidades que me proporcionaram ao longo dos anos. Por me apoiarem durante essa jornada e vibrarem com as minhas conquistas. Um agradecimento em especial a minha mãe, que esteve ao meu lado todos os dias dessa caminhada me motivando em momentos de desânimo e sempre me incentivando a ir atrás dos meus sonhos.

Às minhas avós, por todo amor e carinho que me deram ao longo desses anos e pelo cuidado que sempre tiveram comigo. A minha avó Maria Preciosa, um agradecimento em especial por me apresentar como a cientista número 1 para amigos e familiares só por eu ter conseguido realizar a minha primeira apresentação em congresso.

Ao meu orientador, professor Doutor Jorge José de Carvalho, que após minha graduação me acolheu como aluna de mestrado, acreditando no meu potencial para prosperar na minha jornada científica. Sua confiança em meu trabalho foi um grande motivador durante esse processo.

A professora Doutora Jemima Fuentes, que é um grande exemplo de pessoa e pesquisadora, minha mãe científica. Obrigada por me dar a oportunidade de entrar no laboratório durante a graduação como sua aluna de iniciação científica e por continuar me acompanhando e me ajudando durante a minha jornada no mestrado.

Um agradecimento mais que especial a Priscila, que me aturou durante todo esse tempo, obrigado pela sua amizade, pela sua ajuda, pela sua paciência. Obrigada por ter se tornado uma das minhas melhores amigas neste laboratório, sem você certamente as coisas seriam muito mais difíceis.

A Ana Lúcia, a Cherley, a Bianca e a Kíssila que me ajudaram muito nesse projeto, sempre muito gentis e solícitas! Obrigado por vocês terem me aturado nesses últimos anos, sempre me aconselhando muito a respeito de diversos fatores tanto pessoais quanto profissionais e principalmente por terem me acolhido tão bem.

A Raíssa, minha grande amiga, que iniciou comigo no laboratório e agora estamos juntas novamente, uma ajudando a outra sempre que preciso, não só no laboratório, mas também na vida pessoal também. A Letícia, minha afilhada da biologia que sempre esteve comigo nesse

caminho; e a Carol e a Gabriela, que foram muito importantes durante todo esse processo. Obrigada a todas por sempre me ajudarem nesses meus anos no laboratório!

A todos os integrantes do Laboratório de Ultraestrutura e Biologia Tecidual, por todo o companheirismo e espírito de equipe.

A professora Dra. Stela Regina Ferrarini do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) pela parceria para realização das análises físico-químicas do óleo de capivara e produção das nanoemulsões.

Ao LPCT, por sermos um grupo unido e com conversas descontraídas. Em particular, agradeço a Genilza pela disposição em ajudar sempre que precisei.

Ao Paulo, meu namorado, que sempre que eu falava que não iria conseguir e não iria dar tempo falava que acreditava em mim e que tinha certeza que tudo daria certo. Obrigada por me tranquilizar não só nesses momentos, mas por trazer paz e tranquilidade para minha vida, você é uma pessoa muito importante para mim!

A minha tia Silvia e aos meus primos Renan e Beatriz, sempre presentes na minha vida, me inspirando a progredir, e acreditando em mim.

Ao meu cachorro, Bart, que desde que apareceu na minha vida é um dos principais causadores da minha felicidade. O seu carinho incondicional, a sua felicidade e alegria, e as suas bagunças e “festinhas”, proporcionam os melhores momentos dos meus dias, ter você na minha vida me deixou mais feliz.

A toda a minha família, pelo carinho que tem comigo, desde o momento de meu nascimento até os dias de hoje. Espero que assim como eu vocês se orgulhem dessa minha nova conquista.

Aos meus amigos, pelo carinho e compreensão, principalmente nos últimos tempos em que estive preocupada e com os nervos à flor da pele. Vocês me animaram, acolheram e me ajudaram de uma forma tão carinhosa. Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Um agradecimento especial a Yanca, minha companheira de departamento e de vida, sua amizade foi crucial nesses últimos dois anos, o tanto que nos aproximamos foi surreal e essa amizade eu quero levar para o resto da vida. E ao João Vitor, que voltou pro meu cotidiano trazendo cada vez mais risadas para os meus dias.

A UERJ e a pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, que me deram a oportunidade de continuar a meu crescimento profissional.

As agências de fomento que de maneira direta ou indireta ajudaram com suporte financeiro para a realização desse trabalho: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Ao Laboratório de microscopia eletrônica do Instituto de biologia da UFF por permitir a utilização da plataforma de Microscopia Eletrônica de transmissão (JEM1200EX).

E a banca examinadora, que disponibilizou seu tempo para agregar conhecimento e fazer parte desta conquista.

RESUMO

ALVES, Luciana Lontro. **O óleo de capivara livre e em nanoemulsão induz efeitos benéficos na morfofisiologia hepática em camundongos C57BL/6 obesos**. 2022. 77 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A obesidade é uma doença crônica complexa caracterizada pelo excesso de gordura corporal (adiposidade) prejudicial à saúde e vem sendo caracterizada como maior problema de saúde a nível global. Pode estar associada a diversas doenças como a doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA). Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) são mediadores lipídicos que apresentam características anti-inflamatórias e podem ser encontrados em animais e vegetais, sendo o óleo de capivara uma fonte promissora. No entanto são facilmente oxidados quando em contato com o oxigênio, e forma de evitar essa oxidação e, consequentemente, aumentar a biodisponibilidade dos PUFAs é a nanotecnologia farmacêutica. Assim, o objetivo do estudo é avaliar os efeitos de duas apresentações farmacêuticas do óleo de capivara (livre e em nanoemulsão) sobre as alterações hepáticas estabelecidas pela obesidade em camundongos C57Bl/6. Foram utilizados 60 camundongos C57Bl/6 machos com 3 meses de idade que receberam dieta controle ou hiperlipídica durante 18 semanas. Da 15^a a 18^a semana, os animais receberam o tratamento - via gavagem orogástrica - com placebo, ou óleo de capivara livre (5000 mg/kg/dia) (OCL), ou nanoemulsão de óleo de capivara (100 mg/kg/dia) (OCN), ou menor concentração de óleo de capivara livre (100 mg/kg/dia) (OC100) ou nanoemulsão branca (NB). Foram analisados parâmetros inerentes à massa corporal, tolerância à glicose, pressão arterial, avaliação do perfil lipídico e de enzimas hepáticas, percentual de esteatose hepática, o processo de morte celular com a via apoptótica e ultraestrutura dos hepatócitos. A dieta hiperlipídica gerou danos bioquímicos dos camundongos e alterações na estrutura e ultraestrutura do fígado desses animais. As duas formulações farmacêuticas do óleo de capivara foram capazes de restaurar as alterações causadas pela obesidade. Assim concluímos que tanto OCL quanto OCN, possuem efeitos benéficos na bioquímica sérica, histopatologia do fígado de camundongos obesos, melhorando a esteatose hepática e diminuindo a ativação da via apoptótica, além de ser capaz de restaurar a ultraestrutura dos hepatócitos. Esses achados são relevantes para o desenvolvimento de novas terapias translacionais em humanos para o tratamento da obesidade de da DHGNA.

Palavras-chave: Óleo de capivara. Nanoemulsão. Obesidade. Fígado. DHGNA.

ABSTRACT

ALVES, Luciana Lontro. **Free and nanoemulsion capybara oil induces beneficial effects on liver morphophysiology in obese C57BL/6 mice.** 2022. 77 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Obesity is a complex chronic disease characterized by excess body fat (adiposity) harmful to health; it has been characterized as a major global health problem. Can be associated with several diseases such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are lipid mediators that have anti-inflammatory characteristics and can be found in animals and vegetables, with capybara oil being a promising source. However, they are easily oxidized when in contact with oxygen, and the way to avoid this oxidation and, consequently, increase the bioavailability of PUFAs is pharmaceutical nanotechnology. Thus, the aim of the study is to evaluate the effects of two pharmaceutical presentations of capybara oil (free and in nanoemulsion) on the hepatic alterations established by obesity in C57Bl/6 mice. Sixty C57Bl/6 male mice at 3 months of age were used and received a control or high-fat diet for 18 weeks. From the 15th to the 18th week, the animals received treatment - via orogastric gavage - with placebo, or free capybara oil (5000 mg/kg/day) (OCL), or capybara oil nanoemulsion (100 mg/kg/day) (OCN), or lower concentration of free capybara oil (100 mg/kg/day) (OC100) or white nanoemulsion (NB). Parameters related to body mass, glucose tolerance, blood pressure, evaluation of the lipid profile and liver enzymes, percentage of hepatic steatosis, the process of cell death with the apoptotic pathway and ultrastructure of hepatocytes were analyzed. The high-fat diet generated biochemical damage in mice and changes in the structure and ultrastructure of the liver of these animals. The two pharmaceutical formulations of capybara oil were able to restore the changes caused by obesity. Thus, we conclude that both OCL and OCN have beneficial effects on serum biochemistry, histopathology of the liver of obese mice, improving hepatic steatosis and decreasing the activation of the apoptotic pathway, in addition to being able to restore the ultrastructure of hepatocytes. These findings are relevant for the development of new translational therapies in humans for the treatment of obesity and NAFLD.

Keywords: Capybara oil. Nanoemulsion. Obesity. Liver. NAFLD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Gráficos do percentual de adultos maiores de 20 anos com excesso de peso ou obesidade de acordo com seu gênero.....	17
Figura 2 –	Desenho ilustrativo do lóbulo hepático.....	19
Figura 3 –	Fotomicrografia de fígado normal.....	20
Figura 4 –	Fisiopatologia da DHGNA pela obesidade.....	23
Figura 5 –	Esquema de aquisição, síntese e eliminação de lipídeos hepáticos.....	25
Figura 6 –	Disfunção mitocondrial e estresse do RE na patogênese da NASH.....	27
Figura 7 –	Tipos de PUFA's e suas principais funções.....	30
Figura 8 –	Coloração pela técnica de Hematoxilina e Eosina de Harris para visualização do grau de esteatose.....	50
Figura 9 –	Imunomarcção por peroxidase para Bax e Bcl-2.....	51
Figura 10 –	Imunomarcção por peroxidase para Citocromo c.....	52
Figura 11 –	Eletromicrografias de corte transversal de fígado.....	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Evolução da massa corporal.....	45
Gráfico 2 –	Evolução da pressão arterial sistólica.....	46
Gráfico 3 –	Concentração de glicose plasmática.....	47
Gráfico 4 –	Parâmetros bioquímicos no soro.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros físico-químicos do óleo de Capivara.....	42
Tabela 2 –	Composição química do óleo de capivara	43
Tabela 3 –	Caracterização físico-química das nanoemulsão brancas (NB) e nanoemulsão contendo o óleo de capivara (OCN).....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácidos graxos
ATF6	Fator de transcrição ativador 6
CHOP	Proteína homóloga de C/EBP
DHA	Ácido docosahexaenóico
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
EPA	Ácido eicosapentaenóico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	Índice de massa corpórea
IRE1	Enzima requerente de inositol 1
JNK	<i>c-jun-N-terminal</i> quinase
MUFAs	Ácidos graxos monoinsaturados
OMS	Organização Mundial de Saúde
PERK	Quinase de retículo endoplasmático
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados
RE	Retículo endoplasmático
RI	Resistência à insulina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SM	Síndrome metabólica
TG	Triglicerídeos

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micrômetro
nm	Nanômetro
$\%$	Porcentagem
\pm	Mais ou menos
kg	Quilograma
m^2	Metro quadrado
α	Alfa

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	OBJETIVO	34
1.1	Objetivo geral	34
1.2	Objetivos específicos	34
2	MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1	Óleo de capivara e nanoemulsão	35
2.2	Animais e desenho experimental	36
2.3	Massa corporal e pressão arterial sistólica	37
2.4	Teste de tolerância oral à glicose (TOTG)	37
2.5	Eutanásia e obtenção do material	38
2.6	Análises bioquímicas	38
2.7	Processamento histológico	38
2.8	Técnicas histológicas	39
2.8.1	<u>Esteatose hepática</u>	39
2.8.2	<u>Imunohistoquímica por peroxidase</u>	39
2.9	Morfometria	40
2.10	Microscopia eletrônica de transmissão	40
2.11	Análises estatísticas	41
3	RESULTADOS	42
3.1	Análise físico-química das formulações do óleo de capivara	42
3.1.1	<u>Caracterização físico-química do óleo de capivara e da nanoemulsão</u>	42
3.2	Avaliação das formulações farmacêuticas do óleo de capivara no modelo de obesidade	44
3.2.1	<u>Massa corporal</u>	44
3.2.2	<u>Pressão arterial</u>	45
3.2.3	<u>Teste de tolerância oral à glicose</u>	46

3.2.4	<u>Bioquímica plasmática</u>	47
3.3	Avaliação do tratamento de diferentes formulações do óleo de capivara no fígado de animais obesos	49
3.3.1	<u>Esteatose hepática</u>	49
3.3.2	<u>Dano celular</u>	50
3.3.3	<u>Microscopia eletrônica</u>	52
4	DISCUSSÃO	54
	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética.....	76
	ANEXO B - Depósito de patente.....	77

INTRODUÇÃO

Obesidade

A obesidade é uma doença crônica complexa caracterizada pelo excesso de gordura corporal (adiposidade) prejudicial à saúde, aumentando o risco de complicações médicas a longo prazo e reduzindo a vida útil do paciente (MACMAHON et al., 2009). Esta enfermidade é uma porta de entrada para outros problemas de saúde e se tornou uma das principais causas de morte afetando adultos, adolescentes e crianças em todo o mundo (YUMUK et al., 2015). Um indivíduo obeso é aquele classificado com o índice de massa corpórea (IMC) superior a 30 kg/m² e ele pode ser subclassificado em obesidade classe 1 (IMC 30-34,9 kg/m²), classe 2 (IMC 35-39,9 kg/m²) ou classe 3 (IMC \geq 40 kg/m²) (WHARTON et al., 2020).

Essa doença tem como principal causa interações complexa de múltiplos como fatores genéticos, metabólicos, comportamentais e ambientais, sendo os dois últimos citados fatores que são considerados a causa imediata do aumento significativo da prevalência de obesidade nos últimos tempos (GARVEY; MECHANICK, 2020; MECHANICK; HURLEY; GARVEY, 2017). Vários mecanismos são capazes de levar à obesidade, mas tradicionalmente, acredita-se que a principal causa ocorre devido uma absorção energética significativamente maior do que o corpo consegue gastar (LIN; LI, 2021), não necessariamente estando ligada a maior ingestão alimentar e sim relacionado às fontes alimentares e a qualidade nutricional do que se é consumido na dieta (SACKS et al., 2009).

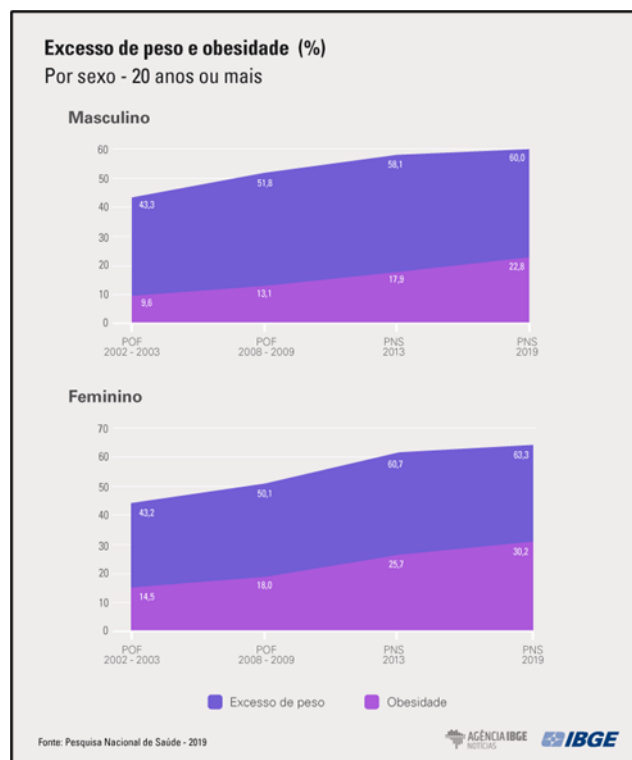
Nas últimas três décadas a prevalência de obesidade aumentou em todo o mundo, atingindo proporções epidêmicas e sendo declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como o maior problema de saúde em adultos a nível global (WANG et al., 2011). Em 2017, a obesidade, juntamente com o sobrepeso, foram a causa de mais de 4 milhões de mortes em todo o globo, e em 2020, cerca de 39 milhões de crianças menores de 5 anos apresentavam sobrepeso ou obesidade (dados da OMS, 2021). No Brasil, o percentual dessas doenças vem aumentando cada vez mais em adultos nos últimos 17 anos, dentre elas, a obesidade teve um aumento maior que 100% neste período (IBGE, 2020) (Figura 1).

Mesmo sendo uma doença de alta complexidade e que ocorre devido a comportamentos individuais e o ambiente de vida, a obesidade é um transtorno que apresenta prevenção e tratamento, não estando ligados apenas a perda de peso isoladamente, mas em múltiplas abordagens que devem ser realizadas em conjunto para reduzir riscos e gerar melhoria da saúde. Entre as abordagens existentes podemos citar: reeducação nutricional; desenvolvimento de um

estilo de vida não sedentário; geração de subsídios para alimentação mais saudável e criação de tributação para os *junk food*; acompanhamento constante dos pacientes; e em casos mais extremos podendo se recorrer até a cirurgia (ENDALIFER; DIRESS, 2020; YUMUK et al., 2015).

No entanto, mesmo tendo tratamento e prevenção, o aumento da prevalência da obesidade é preocupante, já que está associada ao desenvolvimento de inúmeras doenças secundárias, como a resistência à insulina (RI), diabetes mellitus tipo 2, além de poder servir como gatilho importante para uma variedade de outras doenças, como por exemplo, doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA), doenças cardiovasculares e vários tipos de câncer (MACHADO; CORTEZ-PINTO, 2016; WANG et al., 2011)

Figura 1: Gráficos do percentual de adultos maiores de 20 anos com excesso de peso ou obesidade de acordo com seu gênero.



Fonte: Adaptado de Pesquisa Nacional de Saúde 2019.

Fígado

O fígado é o segundo maior órgão do corpo humano, localizado na cavidade abdominal abaixo do diafragma. Nele, os nutrientes absorvidos pelo sistema digestório são processados e armazenados para serem utilizados por outros órgãos, se tornando uma interface entre sistema

digestório e sangue (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). É um centro crítico para vários processos fisiológicos, devido a sua posição no sistema circulatório, facilitando a captação, transformação e acumulação de metabólitos, e a neutralização e eliminação de substâncias tóxicas. Este órgão regula o metabolismo de macronutrientes, o volume sanguíneo, suporte do sistema imunológico, controle endócrino das vias de sinalização do crescimento, homeostase de lipídios e colesterol e a quebra de compostos xenobióticos, incluindo muitos medicamentos atuais (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

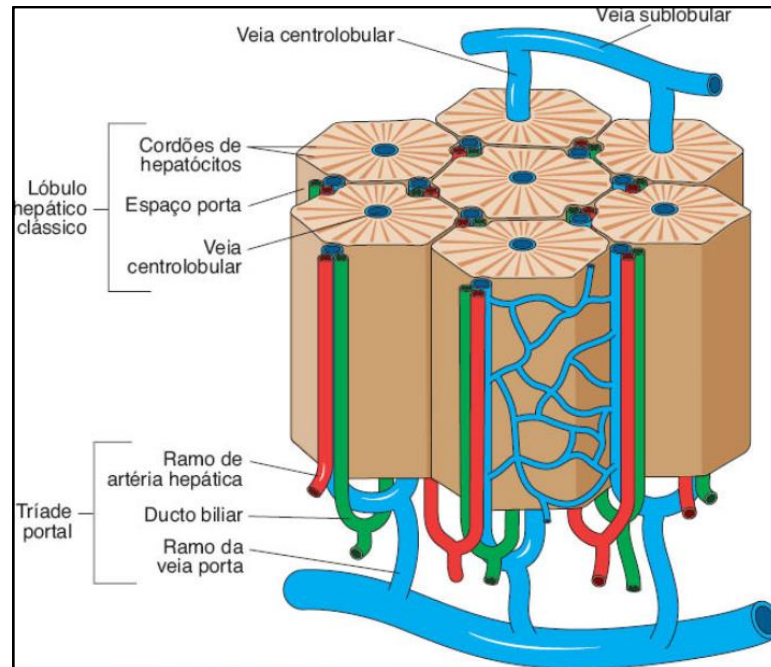
Anatomicamente, o fígado é dividido em quatro grandes porções: os lóbulos esquerdo e direito, que são lóbulos maiores; e os lóbulos quadrado e caudado, que são menores (PAWLINA, 2021). Quando observamos à microscopia, este órgão é composto por diferentes tipos celulares, entre eles hepatócitos, células epiteliais biliares (colangiócitos), células estreladas, células de Kupffer e células endoteliais sinusoidais hepáticas, tendo cada uma delas funções únicas que regulam cooperativamente a função hepática (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017). Os hepatócitos são o componente estrutural básico do fígado, essas células epiteliais estão agrupadas em placas interconectadas formando o cordão de hepatócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Em cortes histológicos, podemos observar unidades estruturais denominadas lóbulos hepáticos. Esse lóbulo é formado por uma massa poligonal de tecido intercalada por um sistema anastomosado de vasos sinusóides, que serão responsáveis por perfundir as células hepáticas com uma mistura de sangue porta e arterial. Na periferia podem ser observadas regiões com tecido conjuntivo contendo ductos biliares, vasos linfáticos, nervos e vasos sanguíneos, sendo identificado como espaço porta. No centro do lóbulo hepático há a veia central ou centrolobular, que ao deixar o lóbulo vai se fundir a veia sublobular (Figura 2) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; PAWLINA, 2021).

O suprimento sanguíneo do lóbulo hepático ocorre da periferia para o centro. O sangue rico em oxigênio (vindo da artéria hepática) mistura-se com o sangue rico em nutrientes (proveniente da circulação portal) nos sinusóides e irão fluir sobre as células do lóbulo e drenam para a veia central. À medida em que o sangue progride no lóbulo, as células vão se utilizar do oxigênio e processar os nutrientes, gerando metabólitos e produtos residuais, conferindo características diferentes do sangue que entra no lóbulo. Isso vai criar um gradiente de oxigênio, nutrientes e resíduos apresentados às células do fígado com base em sua localização lobular, criando uma partição de funções dos hepatócitos, com base em sua localização no lóbulo (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017). Essa direção do fluxo sanguíneo é responsável pela diferença no comportamento das células mais periféricas em relação às mais centrais,

sendo essa dualidade comportamental dos hepatócitos particularmente evidente em determinadas patologias (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Figura 2: Desenho ilustrativo do lóbulo hepático.

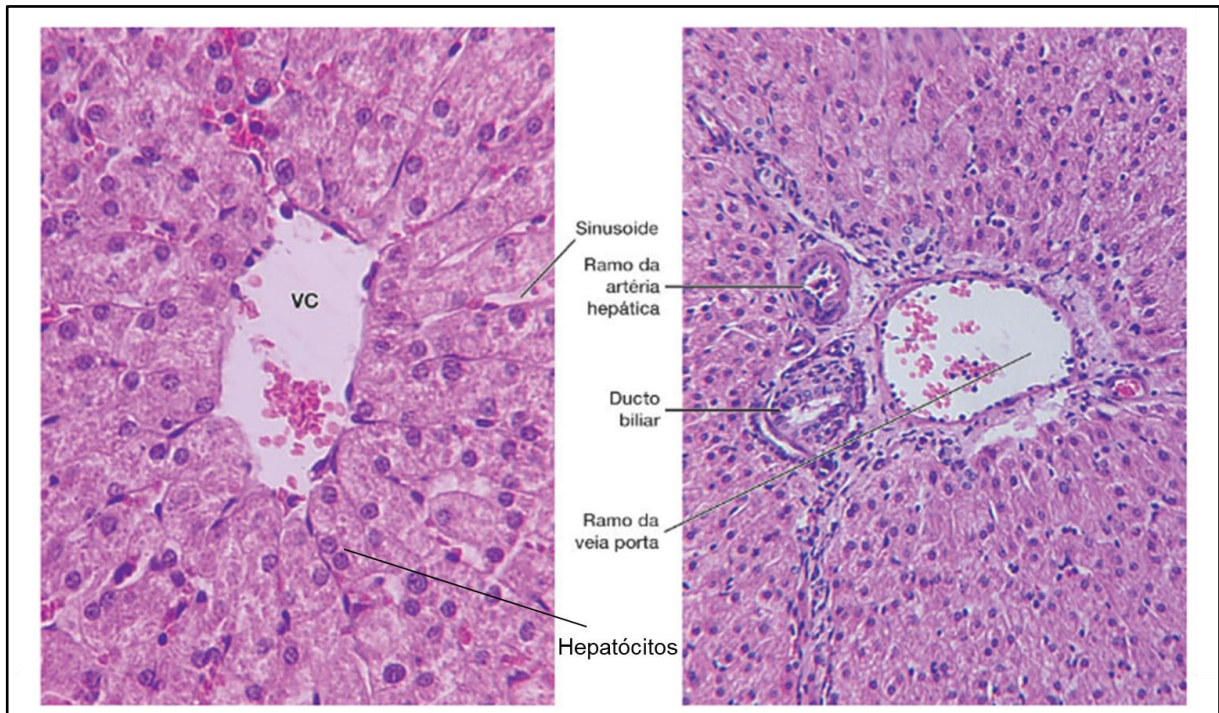


Legenda: Desenho esquemático ilustrado do lóbulo hepático do fígado. Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017

Os hepatócitos são células poliédricas, com seis ou mais superfícies localizadas a distâncias variáveis dos espaços porta. Quando coradas com hematoxilina e eosina, os cortes apresentam citoplasma eosinofílico, devido a grande quantidade de mitocôndria e alguns retículos endoplasmáticos (RE). Apresentam núcleos grandes e esféricos, que ocupam o centro da célula, sendo muito comum no fígado adulto a presença de células binucleadas (Figura 3) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; PAWLINA, 2021).

O tecido hepático apresenta capacidade regenerativa extraordinária. A perda do tecido por algum tipo de lesão dispara um mecanismo que vai ser responsável pela multiplicação dos hepatócitos, que será mantido até que se restaure a massa original do tecido, tendo os humanos essa capacidade considerada restrita. Quando regenerado, o fígado, geralmente se encontra bem organizado, com o arranjo lobular típico e função normalizada, entretanto, quando os hepatócitos são repetidamente danificados, sua multiplicação é seguida de um aumento significativo de tecido conjuntivo, ocasionando uma fibrose (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Figura 3: Fotomicrografia de fígado normal.



Legenda: Fotomicrografia de fígado normal corado com Hematoxilina e Eosina (HE). Nela é possível a visualização das principais estruturas do fígado. Abreviação: VC, veia central. Fonte: Adaptação de JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017.

O fígado é de extrema importância na absorção, captação, síntese, empacotamento e secreção de lipídios e lipoproteínas. O sistema de síntese e secreção biliar do fígado permite a absorção eficiente de lipídios da digestão. Os AGs são transportados para os hepatócitos por meio de várias proteínas de transporte, onde o fígado é capaz de utilizar essa fonte tanto como meio de energia interna - por vias oxidativas - quanto para fornecer energia a outros órgãos - pelos produtos da cetogênese (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017). No entanto, quando há acúmulo de lipídios tóxicos nesse órgão, seguidos de lesão, disfunção e morte das células, está associado com patologias como a DHGNA (LIANGPUNSAKUL, CHALASANI; 2019). A progressão de diversas doenças hepáticas vai resultar em um remodelamento patológico do tecido, incluindo alterações microanatômicas ou do receptor alvo que podem afetar o funcionamento do fígado (WITZIGMANN et al.; 2020).

Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

Com o aumento da prevalência de obesidade e de doenças metabólicas relacionadas com o peso, como a síndrome metabólica (SM), a DHGNA tornou-se uma das principais causas de

doença hepática crônica (YOUNOSSI et al., 2016). O aumento dos casos dessa doença é preocupante porque ela normalmente está associada com diversas complicações, dentre elas o desenvolvimento de cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e mortalidade geral. DHGNA é um termo genérico que, tipicamente, é usado para descrever condições hepáticas que variam da esteatose, como a esteatose hepática não alcoólica e a esteatose hepática seguida de fibrose ou cirrose (MUNDI et al., 2020).

O fígado é um órgão de extrema importância para diversos processos fisiológicos, incluindo o metabolismo de macronutrientes, regulação do volume sanguíneo, controle endócrino de vias de sinalização de crescimento, homeostase de lipídios e colesterol e a quebra de compostos xenobióticos, como medicamentos (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017). Este órgão produz e secreta proteínas plasmáticas, tendo papel importante na captação, armazenamento e distribuição de diversos nutrientes e vitaminas, além de também manter os níveis glicêmicos e regular os níveis de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDLs) circulantes. Mesmo sendo capaz de degradar ou conjugar compostos tóxicos e medicamentos, o fígado pode sofrer danos causados por essas substâncias (ROSS, 2016). É um órgão que tem a capacidade de oxidar lipídios, mas que também é capaz de secretar e armazenar o excesso lipídico em outros tecidos (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017), além de apresentar funções exócrinas (com a secreção biliar) e desempenhar funções do tipo endócrina (ROSS, 2016). Logo, qualquer dano gerado nele é preocupante e precisa ser estudado.

Pessoas com sobrepeso e obesidade apresentam um aumento dos níveis de lipídios no fígado (que não tem a função de armazenar gordura) e desenvolvem esteatose hepática, uma condição ligada a DHGNA (FRAULOB, et al., 2012; KAWANO E COHEN, 2013). Muito ainda precisa ser elucidado sobre a etiologia e a evolução dessa doença, no entanto, o desequilíbrio do metabolismo de lipídios parece ser um consenso (ERICKSON, 2009). A DHGNA apresenta taxa de progressão distinta, e as manifestações clínicas dependem de cada indivíduo. Além disso, a DHGNA tem sua fisiopatologia e progressão induzidas por múltiplos fatores em um modelo “*multiple parallel-hit*”, no qual fatores genéticos e ambientais (“*hits*”) interagem com base na individualidade do paciente (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; FRIEDMAN et al., 2018). A variabilidade natural dessa doença está relacionada com fatores diversos, porém convergentes, relacionados aos impactos do meio ambiente, do microbioma, do metabolismo, das comorbidades e dos fatores de risco genéticos (FRIEDMAN, et al., 2018).

Alguns estudos já apontam que funções similares a adipócitos podem ser atribuídas a hepatócitos, isso ocorre devido a uma diminuição da capacidade de armazenamento energético

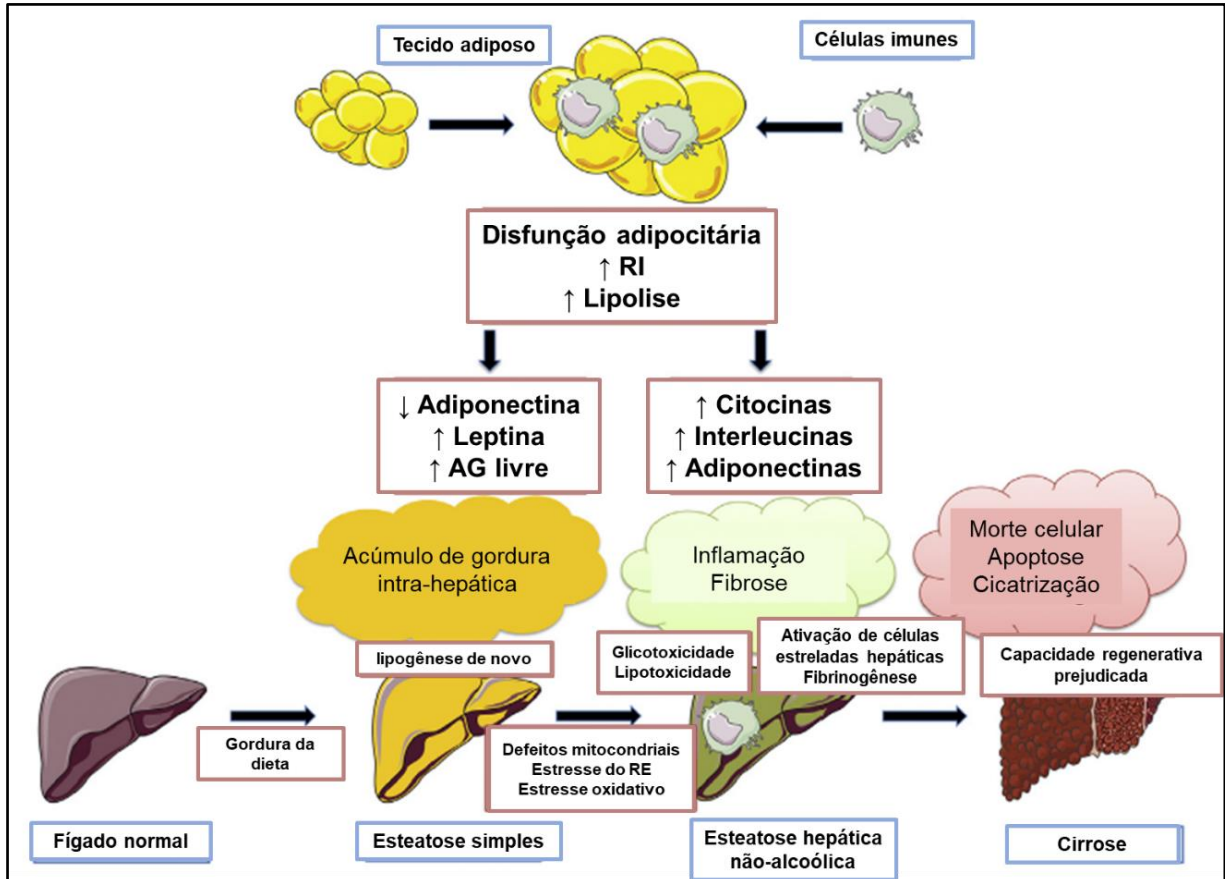
do tecido adiposo, como podemos observar na obesidade (POLYZOS; MANTZOROS, 2015). Nessa situação, ficaria como função do hepatócito, o armazenamento de lipídios que o tecido adiposo não foi capaz de acolher, esses lipídios geralmente se encontram na forma de triglicerídeos (TG) e podem levar a esteatose hepática. Na obesidade, o excesso de ácidos graxos (AG) livres circulantes, decorrentes da lipólise acelerada e da baixa captação desses AG no tecido adiposo subcutâneo, gera um acúmulo ectópico de gordura (principalmente no fígado e músculo esquelético) e RI em múltiplos órgãos. Sendo assim, a principal forma de se obter esses AG livres intra-hepáticos é pela dieta, pela lipólise do tecido adiposo ou pela lipogênese *de novo* dentro do hepatócito (DONNELLY et al., 2005; MAGKOS; MANTZOROS, 2011).

A obesidade parece desempenhar um papel muito importante no processo de indução da DHGNA (POLYZOS; KOUNTOURAS; MANTZOROS, 2017). A fisiopatologia envolvida nesse processo está relacionada com a expansão do tecido adiposo – gerado pela obesidade – diminui a capacidade desse tecido de armazenar o excesso de energia. A disfunção adipocitária e o aumento da RI levam a uma lipólise que, conseqüentemente, aumenta os níveis de AG livres e leptina circulantes e diminui os de adiponectina, gerando um acúmulo de gordura intra-hepática, que será agravado pelo alto teor de gordura e carboidratos da dieta, sendo este último o responsável por aumentar a lipogênese *de novo*. O tecido adiposo também pode ser infiltrado por células imunes produtoras de citocinas e quimiocinas, que em uma obesidade não controlada, poderão ser capazes de infiltrar o fígado, contribuindo fortemente com o processo inflamatório intra-hepático de baixo grau, porém crônico. A lipotoxicidade e a glicotoxicidade também desempenham um papel chave nessa cascata, por participarem do processo de acúmulo lipídico no fígado, conseqüentemente progredindo para uma esteatose hepática não alcoólica, estando estes intimamente relacionados com defeitos mitocondriais, estresse do retículo endoplasmático (RE) e estresse oxidativo. Se a inflamação for prolongada, as células estreladas hepáticas serão as principais responsáveis por iniciar um processo fibrinogênico e esse processo pode acarretar em uma cirrose que causa um dano na capacidade regenerativa do tecido hepático, no qual a reposição dos hepatócitos, submetidos à morte celular ou apoptose, é mal sucedida (Figura 4) (POLYZOS; KOUNTOURAS; MANTZOROS, 2019).

Como se sabe, alterações no metabolismo lipídico são importantes no processo de desenvolvimento da DHGNA e sua progressão, e eles podem afetar diretamente as espécies reativas de oxigênio (ROS), a mitocôndria, o RE e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (CHEN et al., 2020). Mesmo ainda apresentando poucos dados em relação ao desenvolvimento da DHGNA, muito progresso foi realizado nos últimos anos voltados principalmente para o aumento da geração de ROS que vai desencadear diversas mudanças no

organismo, entre elas a RI e a ativação de enzimas-chave do metabolismo lipídico (RIVES et al., 2020).

Figura 4: Fisiopatologia da DHGNA pela obesidade.



Abreviações: RI, resistência à insulina; AG, ácidos graxos; RE, retículo endoplasmático. Fonte: Adaptado de Polyzos; Kountouras; Mantzoros, 2019.

Ainda não existem terapias farmacológicas eficazes no tratamento dessa doença, sendo a mudança no estilo de vida do paciente, como modificações na dieta e a prática de exercícios físicos, a estratégia de manejo de maior eficácia para controlar sua progressão. Outras duas terapias clássicas são o tratamento da DHGNA com vitamina E e o agente antidiabético Pioglitazona, porém, ambos apresentam a indução de efeitos adversos (MACIEJEWSKA et al., 2019). Logo, o desenvolvimento de uma nova estratégia terapêutica para essa patologia é de extrema importância para evitar sua evolução e, conseqüentemente, que ela possa acarretar na progressão de uma esteatose hepática.

Esteatose hepática

A esteatose hepática é definida pelo excesso de lipídio (principalmente TGs) acumulado nos hepatócitos e está associada geralmente a duas condições: a DHGNA e a doença hepática gordurosa alcoólica. Grande parte dos indivíduos que apresentam sobrepeso e obesidade desenvolvem essa característica (ANGULO, 2007; FRAULOB, et al., 2012).

O curso natural da esteatose hepática varia de acordo com a sua etiologia e geralmente é acompanhada de condições como inflamação e fibrose, tendo potencial de progredir para uma cirrose e até insuficiência hepática (IDILMAN; OZDENIZ; KARCAALTINCABA, 2016). Vários estudos já mostraram que existe uma correlação entre obesidade e esteatose hepática (POLYZOS; KOUNTOURAS; MANTZOROS, 2019) e essa correlação é extremamente preocupante, visto que, a esteatose está associada a doença mais avançada e taxas de mortalidade mais elevadas (POLYZOS et al., 2012).

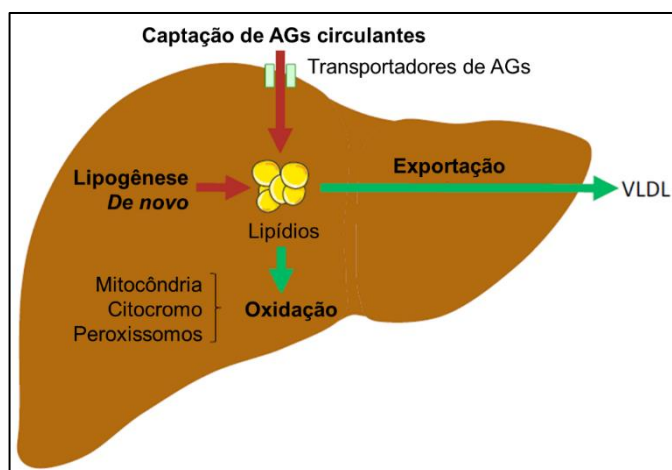
O nível lipídico dos hepatócitos é regulado por atividade de enzimas celulares que catalisam a absorção, síntese, oxidação e exportação lipídica, logo, sempre que houver um aumento da entrada, absorção ou síntese de AGs, e esse aumento se exceder a capacidade oxidativa ou de exportação, ocorrerá a esteatose hepática (AGUILA et al., 2003). Assim, qualquer fator que gere um desbalanço entre a aquisição de lipídios – captação de AGs livres e lipogênese *de novo* - e a eliminação - β -oxidação e exportação de VLDL – estes serão responsáveis por contribuir para o desenvolvimento de uma esteatose hepática (HURR et al., 2019).

A gravidade do dano hepático geralmente está correlacionada com o grau de estresse metabólico hepático, mas há variabilidades individuais significativas com relação ao seu resultado; o dano hepático parece permanecer estável na maioria dos indivíduos, mas é capaz de regredir em alguns e progredir em outros (HARRISON; TORGERSON; HAYASHI, 2003). Além disso, disfunções metabólicas como RI, dislipidemia e doenças cardiovasculares estão intimamente associados com a esteatose hepática, e aparentam estar mais relacionados com o acúmulo de gordura hepática e DHGNA do que apenas só com a obesidade (HØJLAND IPSEN; TVEDEN-NYBORG; LYKKESFELDT, 2016; IPSEN; TVEDEN-NYBORG; LYKKESFELDT, 2016).

Como já estabelecido anteriormente, o fígado é um órgão de extrema importância e uma das razões é seu envolvimento no metabolismo lipídico. Ele é o regulador da homeostase lipídica é responsável por realizar a síntese de AGs, sua exportação e sua distribuição para os demais tecidos, além de conseguir usar esses ácidos como fonte energética (Figura 5). Esse

processo é regulado por diversos fatores e a interrupção de uma ou mais das vias ligadas a regulação da função hepática pode gerar a retenção de gordura intra-hepática causando esteatose e consequentemente DHGNA (BECHMANN et al., 2012; NGUYEN et al., 2008).

Figura 5: Esquema de aquisição, síntese e eliminação de lipídeos hepáticos.



Abreviação: AGs, ácidos graxos; VLDL, lipoproteínas de densidade muito baixa. Fonte: Adaptado de IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018.

As quatro vias principais envolvidas nesse processo são: captação de lipídios circulantes, lipogênese *de novo*, oxidação de AGs e exportação de VLDL. De forma geral, o fígado apresenta transportadores específicos de AGs localizados em sua membrana, esses transportadores vão facilitar o transporte de AGs para diferentes compartimentos celulares dentro do citoplasma. Juntamente a isso, a lipogênese *de novo* converte acetilcoenzima A (acetyl-CoA) – resultante do excesso de carboidrato – em novos AGs que podem ser esterificados e armazenados como TGs. Um outro processo que ocorre é a oxidação de AGs, que será responsável por reduzir os níveis intra-hepáticos de gordura, utilizando-as como fonte de energia. Esse processo ocorre principalmente na mitocôndria, no entanto, a sobrecarga lipídica e/ou uma disfunção mitocondrial presente levam a um maior grau de oxidação de AGs nos peroxissomos e citocromos, gerando ROS (IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018).

A RI é considerada o fator chave para o desenvolvimento de DHGNA e esteatose hepática não-alcoólica, assim que começa o acúmulo de AGs, colesterol e outros metabólitos lipídicos no fígado, há o aumento do risco de efeitos tóxicos neste órgão, processo conhecido convencionalmente como lipotoxicidade. Esse processo pode gerar uma cicatrização de feridas de longa duração que levarão a alterações hepatocelulares, inflamação, ativação de células

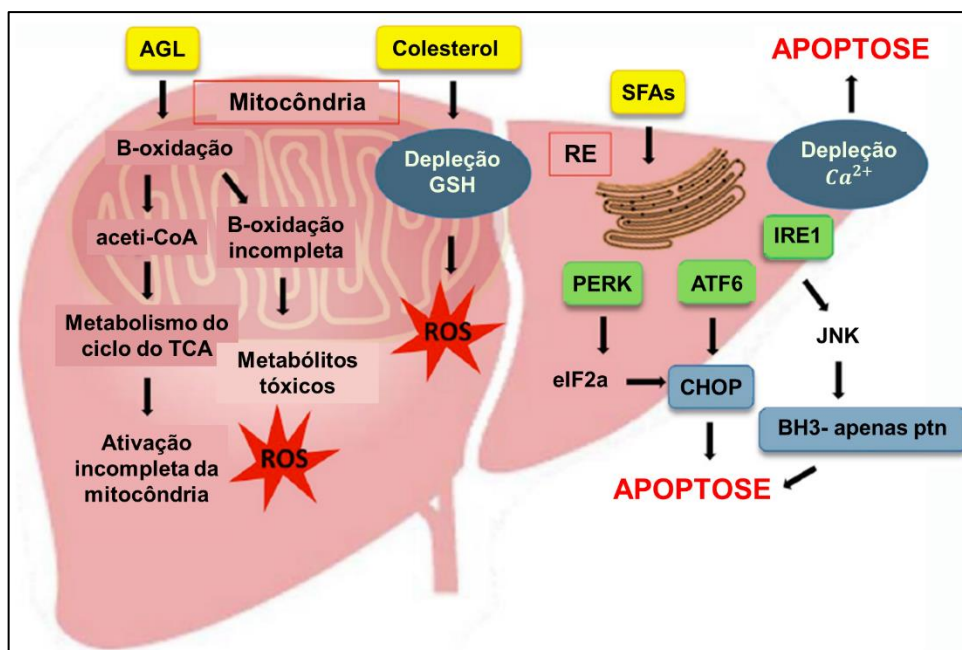
estreladas hepáticas, além de síntese e deposição de matriz extracelular no tecido hepático (MARRA; SVEGLIATI-BARONI, 2018; PIERANTONELLI; SVEGLIATI-BARONI, 2019).

A lipotoxicidade ocorre quando há um acúmulo de lipídios nocivos que gera a disfunção de organelas, lesão celular e morte. Esse processo está intimamente associado com a esteatose hepática, nele, os lipídios tóxicos causam danos celulares por meio de diferentes mecanismos entre eles modificando a função das organelas intracelulares, como o RE e mitocôndrias; assim como vão ativar de forma direta as vias de sinalização do receptor de morte (PIERANTONELLI; SVEGLIATI-BARONI, 2019).

O excesso de AGs livres vai induzir a síntese de acetil-CoA pela via do metabolismo oxidativo, essa via tem a capacidade de desacoplar a função do ciclo hepático do ácido tricarbóxico da respiração mitocondrial, gerando um aumento da produção de ROS. A β -oxidação incompleta dos AGs livres vai promover um acúmulo de espécies tóxicas, como ácido palmítico e outros AGs saturados, além de intermediários de oxidação e outras espécies. O acúmulo de colesterol na mitocôndria também desempenha um papel importante na lipotoxicidade, levando a uma depleção de GSH e ao estresse oxidativo. Os AGs saturados vão promover o estresse do RE pela ativação das vias intramoleculares PERK, ATF6 e IRE1. A PERK tem como principal substrato o fator de iniciação da tradução eucariótica 2, que quando fosforilado ativa a molécula pró-apoptótica CHOP. CHOP também é substrato do ATF6. As vias apoptóticas de IRE1 são mediadas pela ativação de JNK que se regula positivamente através da expressão de proteínas pró-apoptóticas BH3 (SVEGLIATI-BARONI et al., 2019) (Figura 6).

Todas essas características são extremamente danosas ao organismo, e uma vez que a esteatose hepática esteja estabelecida a longo prazo no fígado, esse órgão se torna altamente suscetível a progressão de um DHGNA, ao estresse oxidativo, e poderá até acarretar a esteato-hepatite (MEHTA et al., 2002).

Figura 6. Disfunção mitocondrial e estresse do RE na patogênese da NASH.



Abreviação: AGL, ácidos graxos livres; TCA, ácido tricarbóxico; ROS, espécies reativas de oxigênio; GSH, glutatona; SFAs, ácidos graxos saturados; PERK, fator de iniciação eucariótica 2 α quinase; ATF6, fator de transcrição ativador 6; IRE1, enzima-1 que requer inositol; eIF2a, fator de iniciação da tradução eucariótica 2; CHOP, proteína homóloga de C/EBP; JNK, c-Jun N-terminal quinase; ptn; proteína. Fonte: Adaptado de SVEGLIATI-BARONI et al., 2019.

Modelo Experimental

Com o avanço da obesidade e das suas doenças associadas, começaram a ser criados modelos experimentais animais para compreender melhor o papel de cada elemento envolvido tanto na sua fisiopatologia quanto nas suas comorbidades associadas. Esses modelos são de extrema importância porque além de entender a patologia, criam a possibilidade de novas proposições terapêuticas para o seu tratamento. Cada vez mais, têm sido utilizados modelos com a indução de dieta hiperlipídica, já que esse modelo mimetiza de forma muito similar as alterações metabólicas encontradas na obesidade (WEST; YORK, 1998; WINZELL; AHRÉN, 2004).

As linhagens mais utilizadas para esses modelos são as linhagens isogênicas ou *inbred* de camundongos, sendo elas C57BL/6, C57BL/6J, AKR/J ou A/J (WHITE et al., 2013). Já foi visto que linhagens de camundongos C57Bl/6 machos, quando administrada a dieta hiperlipídica, foram capazes de desenvolver obesidade, RI, diabetes mellitus, esteatose hepática e pancreática (MASI et al., 2012).

Quando o assunto é o estudo da DHGNA, existem diversos modelos para se avaliar os efeitos que os lipídios geram nesta patologia, entre eles se encontram modelos de animais como camundongos C57Bl/6 ou ratos Wistar e Sprague Dawley, já que eles desenvolvem muito bem tanto a obesidade e a diabetes mellitus tipo 2, quanto a DHGNA (WHITE et al., 2013). Os modelos geralmente envolvem alterações genéticas (como no caso da deficiência de leptina – modelo OB/OB), alterações químicas (no qual a doença é causada com administração de drogas), ou alterações dietéticas (com dietas hiperlipídicas, dietas ricas em frutose ou dietas deficientes em metionina e colina) (JUMP et al., 2016; LAU; ZHANG; YU, 2017; TAKAHASHI; SOEJIMA; FUKUSATO, 2012; VAN HERCK; VONGHIA; FRANCQUE, 2017; WHITE et al., 2013).

Cada um dos modelos possui características próprias e objetivos distintos, logo, para se escolher o melhor modelo experimental, é necessário avaliar o propósito do estudo (AYDOS et al., 2019). No presente estudo buscamos avaliar as alterações fisiopatológicas, estruturais e ultraestruturais causadas no fígado durante a obesidade, assim, optamos por administrar uma dieta rica em gorduras em linhagem de camundongos C57Bl/6, que é a mais utilizada para o modelo experimental de DHGNA (VAN HERCK; VONGHIA; FRANCQUE, 2017). A escolha da dieta hiperlipídica se deu devido a estudos que já observam que esse tipo de dieta é capaz de desenvolver diversas consequências nos animais, entre elas: obesidade, hiperinsulinemia, hiperglicemia, hipertensão e danos no fígado, todas características semelhantes ao fenótipo observado em humanos com DHGNA (ROCCHINI; MARKER; CERVENKA, 1997; WHITE et al., 2013).

Atualmente, a forma mais eficaz para o tratamento tanto da obesidade, quanto das alterações hepáticas que ela possa acarretar, envolvem modificações no estilo de vida e na dieta de pacientes com essas comorbidades. A prática de atividades físicas e a melhora na ingestão alimentar geram benefícios significativos na esteatose hepática e podem ajudar a melhorar a RI. Entretanto, só uma pequena porcentagem desses pacientes consegue implementar essas medidas de forma a se tornarem eficazes (FRAULOB; SOUZA-MELLO, et al., 2012). Assim, a busca de novas opções terapêuticas, entre elas opções farmacológicas vêm crescendo cada vez mais, tendo a utilização de AGs poli-insaturados (PUFAs) como tratamento desperta bastante interesse (MATRAVADIA et al., 2014).

Ácido Graxos Poli-insaturados (PUFAs)

Os AGs são compostos por hidrocarbonetos em cadeia, que apresentam um grupo carboxila em uma de suas extremidades e um grupo metila na outra. Suas espécies existentes são classificadas de acordo com seu grau de saturação, sendo as três principais os AGs saturados, os AGs monoinsaturados (MUFAs) e os PUFAs (ALBRACHT-SCHULTE et al., 2018). Essas variações na estrutura química são as responsáveis por levar atividades fisiológicas diferentes, enquanto os AGs saturados tem sido associados com desenvolvimento de disfunção metabólica, os MUFAs e PUFAs têm demonstrados atividades úteis ao metabolismo (JEROMSON et al., 2015).

Os PUFAs podem ser classificados adicionalmente nos grupos ômega-3 e ômega-6, baseando-se na primeira ligação dupla da extremidade metil desses AGs e no tamanho de sua cadeia de hidrocarbonetos. E assim como nos grandes grupos de AGs, as diferenças estruturais desses compostos também darão origem a diferenças funcionais em relação a suas ações na inflamação e no metabolismo (SIRIWARDHANA et al., 2013).

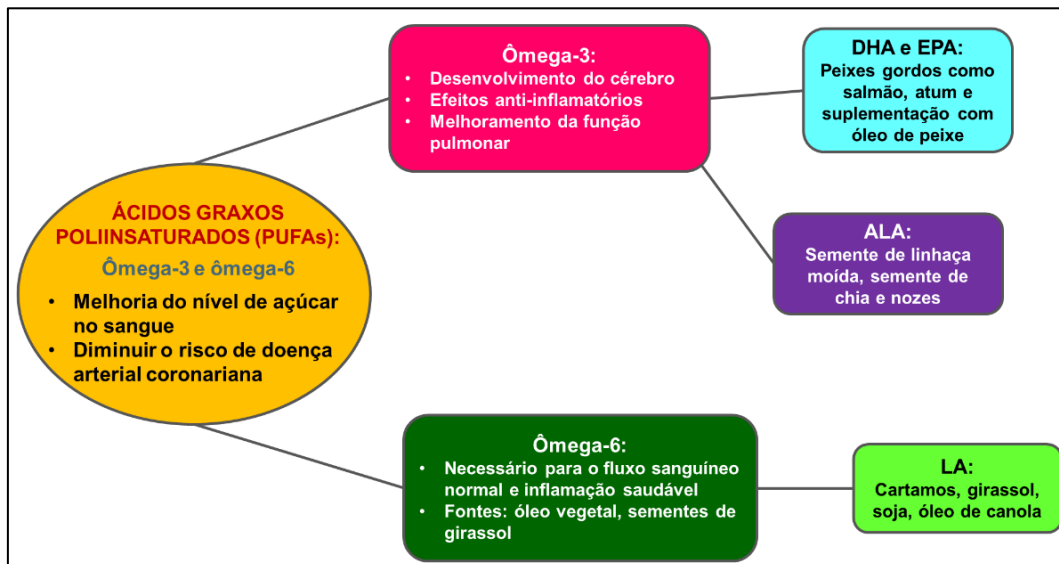
Ômega-3 e o ômega-6 são reconhecidos como AGs essenciais, ambos não podem ser produzidos dentro do corpo sendo necessária a suplementação pela dieta (KAPOOR et al., 2021). O ômega-3 atua como precursor de mediadores lipídicos, como resolvinas e lipoxinas, e possuem como principal característica ações anti-inflamatórias, como por exemplo, a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, da ativação de fatores de transcrição e do recrutamento celular, assim como, é responsável por induzir a fagocitose em macrófagos (MOLFINO et al., 2017); também são capazes de modular a liberação de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (BORSONELO; GALDURÓZ, 2008). Além disso, estarão envolvidos no controle da ingestão alimentar, na detecção de energia e nos distúrbios relacionados à alimentação; reprodução; resposta ao estresse; e câncer, entre outras coisas (CHIANESE et al., 2017; LAEZZA et al., 2020; PAGOTTO et al., 2006).

Esses PUFAs são derivados de AGs vitais: os ácidos α -linolênico (ômega-3) e ácido linoleico (ômega-6) (CALDER, 2017). As fontes existentes estão presentes tanto em animais como em vegetais (PANAHI et al., 2016), o ômega-3, por exemplo, é encontrado em sementes da planta – como chia, linhaça e nozes – e no óleo de peixe marinho; produtos à base de cereais também são considerados fonte primordiais desse ômega. Já o ômega-6 é obtido a partir de óleos vegetais como soja e girassol, esses óleos também possuem AGs ômega-3, porém em menor quantidade. Os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) são

importantes ômega-3, enquanto os ácidos linoleicos e o araquidônico são importantes ômega-6 (KAPOOR et al., 2021) (Figura 7).

Diversos trabalhos têm estudado a eficácia das fontes de PUFAs para o tratamento da obesidade e de doenças associadas a ela, como a DHGNA e suas consequências. Já foi determinado que as lipoxinas, mediadores lipídicos muito presente nos PUFAs, são capazes de melhorar as alterações histopatológicas de fígados de ratos, reduzindo as áreas de necrose hepática com infiltrado de células inflamatórias e gerando uma diminuição do acúmulo de lipídios hepáticos (CHIU et al., 2018; AL-OKBI et al., 2018). EPA e DHA também mostraram diversos efeitos benéficos como diminuição do risco de síndromes cardiovasculares e prevenção do progresso da RI e da obesidade (FLACHS et al., 2009).

Figura 7: Tipos de PUFAs e suas principais funções.



Abreviações: DHA, ácido docosahexaenóico; EPA, ácido eicosapentaenóico; ALA, ácido α -linolênico; LA, ácido linoleico. Fonte: Adaptado de KAPOOR et al., 2021

Um estudo recente mostrou que o tratamento com o óleo de krill (crustáceo) – contém alto teor de EPA e DHA – é capaz de atenuar os processos inflamatórios em camundongos com dieta hipelipídica, além de ser capaz de melhorar a composição de AGs na circulação, no tecido adiposo e no fígado, durante o desenvolvimento da obesidade (GART et al., 2021). Quando avaliadas as alterações que o óleo de peixe é capaz de induzir (YAMAZAKI; LI; IKAGA, 2021), foi visto que esse óleo pode ser promissor na prevenção de sobrepeso e obesidade; em animais alimentados com dieta HL foi capaz de prevenir a deficiência na oxidação de AGs, assim como restaura os prejuízos causados no transporte da glicose no músculo (TISHINSKY, et al., 2012); e proteger contra a RI induzida por dieta (LANZA, et al. 2013).

Atualmente, a suplementação de PUFAs mais conhecida e utilizada é a de óleo de peixe (SHERRATT; LERO; MASON, 2020). Entretanto, tanto essa quanto as outras fontes mais comuns de extração (vegetal e animal) tem um processo complexo para sua obtenção e geram uma quantidade pequena de produto final (PANAHI et al., 2016). Logo, fontes alternativas de obtenção desses AGs seriam de extrema importância no cenário atual.

Óleo de Capivara

Trabalhos relacionados a aspectos medicinais e aproveitamento de recursos vêm sendo cada vez mais comuns. Inicialmente os estudos eram voltados para plantas com aspectos medicinais, entretanto, pesquisadores de diferentes sociedades já vêm utilizando a fauna para esses aspectos (DE ALMEIDA; DE ALBUQUERQUE, 2002).

A capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) é um roedor silvestre de grande interesse econômico. Está amplamente distribuído na América do Sul e o consumo de sua carne é um costume cultural em países como Venezuela e Brasil. Sua produção tem crescido cada vez mais como alternativas em áreas marginalizadas e propriedades rurais e apresenta grande potencial econômico devido ao seu couro, carne e óleo (FEDERICO; CANZIANI, 2005; GIRARDI et al., 2005). O Brasil possui alguns lugares licenciados pelo IBAMA, para criação de capivaras. Um deles está situado no Estado de Goiás, a Fazenda Santa Luzia, que é um criadouro destinado a carnes de caça, apesar de haver o aproveitamento de várias partes do animal, a gordura é geralmente desprezada.

Pouco ainda se conhece sobre o óleo de capivara. Esse óleo é extraído a partir da gordura subcutânea da capivara e contém 17,9% de AGs α -linolênico e 19,6% de AGs linoleico (FUKUSHIMA et al., 1997), que correspondem aos ômega 3 e 6 respectivamente, além 35,6 a 39,8% de PUFAs oleico e 20,7 a 24,3% de PUFAs palmítico (PINHEIRO; SILVA; RODRIGUES, 2001). É um dos componentes presentes no Capivarol, um tônico fortificante para crianças, e também é relacionado a ele atividades no auxílio de doenças respiratórias como bronquite e asma, além de reumatismo (PINHEIRO, 2008).

Poucos estudos na literatura utilizam esse óleo, porém, os dados demonstram que o mesmo é capaz de acelerar o processo de cicatrização em feridas cutâneas de ratos (MARINHO; NETO-FERREIRA; JOSÉ DE CARVALHO, 2013) e melhorar a esteatose, inflamação e a atividade mitocondrial hepática (MARINHO et al., 2018). Sendo assim, o óleo de capivara se apresenta como uma fonte alternativa de PUFAs promissora para estudos relacionados ao desenvolvimento de terapias.

Nanotecnologia Farmacêutica

Mesmo apresentando grandes benefícios à saúde, os PUFAs são facilmente oxidados quando em contato com o oxigênio, comprometendo a suplementação requerida pelo indivíduo (SHUKLA; PERKINS, 1991). Uma forma para evitar que isso ocorra e conseqüentemente aumentar a biodisponibilidade desses AGs é a nanotecnologia farmacêutica, que surgiu nas últimas décadas (COUVREUR; VAUTHIER, 2006).

Nos últimos 30 anos, a nanotecnologia farmacêutica teve um crescimento exponencial, trazendo inovações desafiadoras para o ramo da farmacologia, e revolucionou o processo de entrega dos compostos biologicamente ativos, trazendo abordagens interessantes em diversas áreas da saúde. Esta tecnologia pode ser definida como o estudo e o controle de materiais com dimensões menores do que 1000 nm. É crescente sua inclusão no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas e apresenta um grande potencial na criação e liberação controlada de novos fármacos (COUVREUR; VAUTHIER, 2006; HOET; BRÜSKE-HOHLFELD; SALATA, 2004).

Uma das primeiras descrições de uma nanotecnologia de liberação de drogas aconteceu na década de 1960 e ficou conhecida como lipossomas (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965), posteriormente, uma variedade de outros biomateriais para liberação de drogas foram desenvolvidos, tanto de origem orgânicos quanto de origem inorgânicos (FAROKHZAD; LANGER, 2009). O desenvolvimento desses produtos de nanotecnologia tem um potencial alto para desempenhar um papel importante no acréscimo de um novo conjunto de técnicas terapêuticas ao *pipeline* das empresas farmacêuticas. Com o uso dessa tecnologia pode ser possível alcançar (1) melhor biodisponibilidade de medicamentos pouco solúveis em água; (2) entrega direcionada do princípio ativo para células ou tecidos; (3) transcitose de fármacos através de barreiras epiteliais e endoteliais apertadas; (4) entrega de macromoléculas a sítios de ação intracelulares; (5) co-entrega de dois ou mais medicamentos ou modalidade terapêutica para terapia combinada; (6) visualização de locais de entrega do princípio ativo combinando agentes terapêuticos com modalidades de imagem; e (7) leitura em tempo real sobre a eficácia *in vivo* de um agente terapêutico (FERRARI, 2005; LIONG et al., 2008).

Mais de duas dúzias de produtos de nanotecnologia terapêutica já foram aprovados para o uso clínico (WAGNER et al., 2006), sendo a maioria capaz de melhorar a eficácia do fármaco ou da dosagem do medicamento clinicamente aprovado, podendo até estender o ciclo de vida dos medicamentos após a expiração da patente (FAROKHZAD; LANGER, 2009). A redução do tamanho de partículas e a produção de novos sistemas de escala nanométrica confere

propriedades importantes e diferenciadas a estes nanossistemas quando comparados aos sistemas convencionais conhecidos. O emprego da nanotecnologia promove uma liberação controlada e busca vetorização a alvos específicos no organismo, possibilitando uma redução na dosagem requerida e conseqüentemente a diminuição dos efeitos adversos que poderiam ser causados; sendo ainda capaz de reduzir a toxicidade e possibilitar maior adesão do paciente à terapêutica (FAROKHZAD; LANGER, 2009). Estes aspectos são de extrema importância, principalmente quando abordamos os casos de doenças crônicas que apresentam tratamentos prolongados. Além disso, a nanotecnologia pode auxiliar na veiculação de compostos lipofílicos, proteção da degradação, aumento da estabilidade e biodisponibilidade de fármacos (COUVREUR et al., 2002).

Apesar de ser relativamente recente, existem diversos estudos que mostram as vantagens de utilização de compostos nanoencapsulados ou nanoparticulados, como redução da dose do medicamento e melhor absorção do fármaco (D'ALMEIDA et al., 2017). Um artigo de revisão publicado em 2020 mostrou que a encapsulação de drogas antifúngicas, com transportadores tanto nano quanto micrométricos, permitiu um aprimoramento no tratamento de micoses, atuando na atividade terapêutica e obtendo efeito prolongado do medicamento; eles observaram que houve uma liberação desencadeada por estímulos químicos e/ou fisiopatológicos específicos. Além disso, concluíram que a utilização desses sistemas permite a manutenção do efeito terapêutico localizado e proporciona o aumento do acúmulo do fármaco na pele, aumentando a eficiência de entrega do fármaco (LENGERT et al., 2020).

A estrutura e a composição das nanopartículas apresentam propriedades físico-químicas específicas e diferentes possibilidades de aplicações. Dentre as diversas classes conhecidas de materiais empregados com a finalidade e entrega de fármacos, as nanoemulsões vem atraindo bastante atenção por terem uma maior razão entre a área e o volume de superfície, maior estabilidade em relação à agregação e ao índice de polidispersão (CHEN; INBARAJ, 2019). Sendo assim, a produção de nanoemulsões representa uma das mais promissoras oportunidades para o tratamento de diversas doenças. Logo, a utilização de nanoemulsões contendo o óleo de capivara, que é um PUFA que tem apresentando resultados positivos principalmente relacionados ao fígado na literatura, pode ser uma abordagem alternativa e promissora para o tratamento de DHGNA (e sua evolução) causados pela obesidade.

1 OBJETIVO

1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de duas apresentações farmacêuticas do óleo de capivara (livre e em nanoemulsão) sobre as alterações hepáticas causadas pela obesidade em camundongos C57Bl/6.

1.2 Objetivos específicos

Desenvolvimento e caracterização das formulações farmacêuticas do óleo de capivara:

- a) Extração do óleo de capivara;
- b) Desenvolvimento da forma farmacêutica do óleo de capivara nanoemulsionado;
- c) Caracterização das propriedades físico-químicas do óleo de capivara em sua forma livre e em nanoemulsão.

Indução da obesidade e avaliação do efeito das formulações farmacêuticas do óleo de capivara em modelo *in vivo*:

- a) Induzir obesidade nos camundongos C57Bl/6 por administração de dieta hiperlipídica;
- b) Avaliar os efeitos da administração do óleo de capivara livre e nanoemulsionado em camundongos obesos no (a):
 - Massa corporal, pressão arterial e níveis de glicose no sangue;
 - Bioquímica plasmática, com avaliação do colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos e enzimas que indiquem o comprometimento da função hepática (ALT e AST);
 - Morfologia estrutural e ultraestrutural do tecido hepático;
 - Remodelamento tecidual e processo de morte celular.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Óleo de capivara e nanoemulsão

O óleo de capivara foi adquirido do Criadouro de Animais Silvestres e Exóticos Fazenda Santa Luzia, Itaberaí – GO, proveniente de animais criados em cativeiro autorizado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). A extração do óleo foi realizada através do processamento hidrotérmico da gordura em banho-maria, obtendo-se o óleo em sua forma líquida (MARINHO, et al., 2013) para posterior administração oral nos animais.

Uma amostra do óleo foi alíquotada e enviada para a Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) para a realização das análises físico-químicas e produção das nanoemulsões em colaboração com a professora Dra. Stela Regina Ferrarini do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica.

Para o desenvolvimento das suspensões de nanoemulsão contendo o óleo de capivara foram utilizadas formulações preparadas por emulsificação espontânea. O monoestearato de sorbitano e o óleo de capivara (componentes da fase orgânica) foram dissolvidos sob agitação magnética a 40°C em acetona e injetados na fase aquosa (polissorbato 80 e água), sob agitação e permanecendo nesta condição por 10 min. Logo em sequência, a formulação foi concentrada a um volume final de 10 mL em evaporador rotatório para eliminação do solvente orgânico e de parte da água. A nanoemulsão branca foi preparada sem a adição do óleo de capivara, sendo este substituído por um óleo inerte, triglicérides de cadeia média.

Na caracterização físico-química das formulações em cada lote de nanoemulsão foi determinado o tamanho das partículas e o índice de polidispersão através do espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer® ZS, Reino Unido). A confirmação dos parâmetros e o monitoramento do movimento browniano das suspensões foram realizados através do equipamento NanoSight® (Amesbury, Reino Unido). O potencial zeta foi determinado pelo princípio de mobilidade eletroforética de sistemas coloidais utilizando-se o Zetasizer®. O pH foi determinado em potenciômetro. Para a determinação da concentração do óleo de capivara emulsionado foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). E na determinação do tempo máximo que as suspensões poderão ser utilizadas para os experimentos biológicos sem apresentar nenhum fenômeno de instabilidade física, foi utilizada metodologia de espalhamento múltiplo de luz através do Turbiscan LAB® (Formulation Co., França).

2.2 Animais e desenho experimental

O protocolo de experimentação e manuseio foram realizados de acordo com as guias convencionais de experimentação animal, sendo o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (n.º CEUA/031/2018) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

No presente trabalho foram utilizados 60 camundongos C57Bl/6 machos, com 3 meses de idade, que foram mantidos no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia (DHE) na UERJ sob condições controladas (temperatura 21 ± 2 °C, umidade $60 \pm 10\%$, ciclo de luz invertido de 12 h – claro/ escuro e ciclo de reposição de ar 15 min/h). Os animais foram submetidos a uma dieta controle - de acordo com a recomendação do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93M) - ou hiperlipídica (26% de carboidratos, 14% de proteínas e 60% de gordura) de acordo com os grupos experimentais e água *ad libitum*. O conteúdo mineral e vitamínico de ambas as dietas foi baseado na AIN-93M (Reeves et al., 1993).

O desenho experimental teve duração de dezoito semanas. Da semana zero até a décima quarta semana, os animais passaram pelo processo de indução da obesidade, no qual houve a divisão em dois grandes grupos, o que recebeu dieta controle e o que recebeu dieta hiperlipídica. Da 15ª a 18ª semana os animais foram subdivididos e começaram a receber diariamente o tratamento com placebo (água potável), óleo de capivara livre (OCL) (5000 mg/kg ou 100 mg/kg), óleo de capivara nanoemulsionado (OCN) (100 mg/kg), ou nanoemulsão brancas (NB), via gavagem orogástrica, segundo os grupos experimentais a seguir (n=6/grupo):

- a) Controle (C): Camundongos receberam dieta controle e água como placebo;
- b) Controle + OCL (C + OCL): Camundongos receberam dieta controle e óleo de capivara livre na dose de 5000 mg/Kg/dia;
- c) Controle + OCN (C + OCN): Camundongos receberam dieta controle e nanoemulsão contendo óleo de capivara na dose de 100 mg/Kg/dia;
- d) Controle + OC 100 (C + OC 100): Camundongos receberam dieta controle e óleo de capivara livre na dose de 100 mg/Kg/dia;
- e) Controle + NB (C + NB): Camundongos receberam dieta e nanoemulsão brancas;
- f) Hiperlipídico (HL): Camundongos receberam dieta hiperlipídica e água como placebo;

- g) Hiperlipídico + OCL (HL + OCL): Camundongos receberam dieta hiperlipídica e óleo de capivara livre na dose de 5000 mg/Kg/dia;
- h) Hiperlipídico + OCN (HL + OCN): Camundongos receberam dieta hiperlipídica e nanoemulsão contendo óleo de capivara na dose de 100 mg/Kg/dia;
- i) Hiperlipídico + OC 100 (HL + OC 100): Camundongos receberam dieta hiperlipídica e óleo de capivara livre na dose de 100 mg/Kg/dia;
- j) Hiperlipídico + NB (HL + NB): Camundongos receberam dieta hiperlipídica e nanoemulsão brancas.

2.3 Massa corporal e pressão arterial sistólica

Para a avaliação da massa corporal (MC) dos animais, os camundongos foram semanalmente pesados, durante todo o experimento, em balança de precisão digital, tendo sua evolução calculada e traçada no decorrer das semanas.

Já para a avaliação da pressão arterial sistólica (PAS), durante as primeiras 14 semanas (período do pré-tratamento), a PAS dos camundongos foi aferida mensalmente pelo método não invasivo de pletismografia da artéria caudal (Kent Scientific; USA) em todos os grupos experimentais com os animais conscientes a partir da semana zero. Durante o período de tratamento (15^a a 18^a semanas), a PAS passou a ser aferida quinzenalmente, para avaliação do efeito do óleo de capivara na evolução da pressão arterial. Foram utilizadas as médias de três aferições de cada animal. Anteriormente ao período experimental, a PAS dos camundongos foi aferida com o objetivo de aclimatar os animais e assim atenuar possíveis mudanças na pressão geradas pelo estresse.

2.4 Teste de tolerância oral à glicose (TOTG)

Com o intuito de avaliar a tolerância oral à glicose, o teste de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado antes da inserção da dieta hiperlipídica (para verificar a normalidade da amostra). Assim como na PAS, o TOTG foi realizado mensalmente no período pré-tratamento e quinzenalmente no período pós tratamento. Para esse procedimento, os animais permaneceram em jejum de oito horas. O sangue foi coletado através de uma incisão pequena na ponta da cauda do camundongo para a verificação da glicose em jejum (Bayer, Brasil). Em seguida foi administrada, por gavagem, solução de glicose a 25% (2g/Kg camundongo) e a

concentração de glicose plasmática foi medida nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da solução de glicose

2.5 Eutanásia e obtenção do material

No dia da eutanásia, após as 18 semanas de experimentação, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital (40 mg/Kg) na região intraperitoneal. Foi realizada uma incisão na linha alba, expondo assim o abdômen e tórax. Amostras de sangue foram extraídas por punção cardíaca e colocadas em tubos previamente heparinizados (0,1 ml). As amostras sanguíneas foram centrifugadas (1200g, 15 min) e o plasma foi retirado e armazenado em outro tubo que foi refrigerado a -80°C para posteriores análises bioquímicas.

Em seguida, o fígado foi coletado sendo fixado em paraformaldeído 4%, para a realização de técnicas histológicas; ou acrescido com glutaraldeído 2,5%, para realização do processamento para microscopia eletrônica de transmissão (MET); ou congelados em refrigeração a -80°C, para a análise do estresse oxidativo.

2.6 Análises bioquímicas

A partir do plasma coletado foram realizadas análises bioquímicas para avaliação do perfil lipídico e para enzimas que indicam o comprometimento da função hepática. Foram dosados os níveis colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, alanina aminotransferase (AST) e aspartato aminotransferase (ALT), por espectrofotometria realizado de acordo com as especificações do fabricante (Bioclin System II, Brasil). Os cálculos para as concentrações em g/dL foram realizados de acordo com o *datasheet* do kit.

2.7 Processamento histológico

Amostras do fígado foram seccionadas e fixadas em paraformaldeído 4% durante 48h, após isso, foram inseridas em cassetes histológicos e lavados durante 3 h em água corrente. Após a lavagem, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, 70% (*overnight*), 90% e duas vezes em álcool 100%, sendo 40 minutos em cada banho. Posteriormente, o material foi clarificado em dois banhos de xilol de 25 minutos cada. Por fim, os cassetes passaram por dois banhos de parafina a 60°C por 1h em cada etapa e incluiu-se os pedaços de fígado em blocos de parafina (Proquímios, Brasil). Todos os blocos foram

seccionados em aproximadamente 3 μm de espessura em micrótomo (American Optical, modelo Spencer, Estados Unidos) e os cortes foram acomodados em lâminas histológicas revestidas com silano (SIGMA) para os procedimentos histoquímicos e imunohistoquímicos. As secções foram colocadas na estufa a 60°C *overnight* para permitir a firme adesão dos cortes às lâminas histológicas, foram então desparafinizados em 3 banhos de xilol e hidratados com banhos decrescentes de álcool 100%, 90%, 70% e por último um banho de água destilada, sendo 2 minutos em cada banho.

As lâminas histológicas contendo o corte com fígado foram corados com Hematoxilina e Eosina ou incubadas com anticorpo primário para detecção de: Bax, Bcl-2 e Citocromo C, e a imunomarcação foi revelada através do método da avidina-biotina peroxidase. Em seguida, as lâminas foram observadas no microscópio de luz acoplado a câmera CCD (Olympus BX 53 com câmera Olympus DP72, Japan) e processadas em um sistema computadorizado de captura de imagens Image Pro-Plus 7.0 (Media Cybernetics, Silver Springs, EUA).

2.8 Técnicas histológicas

2.8.1 Esteatose hepática

Para a análise da esteatose hepática foi utilizada a coloração de Hematoxilina e Eosina. Após hidratação, as lâminas foram coradas por dois minutos em solução de Hematoxilina de Harris, lavadas em água destilada para retirar o excesso, e, em seguida, coradas com Eosina por um minuto. As lâminas foram novamente lavadas com água destilada, desidratadas em série alcoólica crescente, diafanizadas e montadas. Com essa coloração pôde-se analisar a morfologia do tecido hepático e posteriormente a porcentagem de esteatose por área.

2.8.2 Imunohistoquímica por peroxidase

Para a imunohistoquímica, foram utilizados os seguintes anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos): anti-Bax, Bcl-2 e Citocromo C. Cortes de 3 μm de fragmentos de fígado incluídos em parafina foram desparafinizados, hidratados e incubados com peróxido de hidrogênio a 3%, durante 15 min, para o bloqueio da peroxidase endógena. Posteriormente os cortes foram rinsados com água destilada e lavados com tampão fosfato salino (PBS) 3 vezes, por 5 min por vez. Foi realizada a recuperação antigênica com o tampão citrato em pH 6,0 por 20 min à 60°C. Em seguida, deixou-se os cortes esfriarem a temperatura

ambiente que em seguida foram lavados novamente com PBS. Posteriormente, os cortes foram incubados com PBS/BSA (soro albumina bovina) 3%, por 20 min, em temperatura ambiente, para não ocorrer marcações inespecíficas dos anticorpos. Os cortes foram então incubados com os anticorpos primários diluídos em PBS na proporção de 1:100 (Bcl-2, Citocromo C) ou 1:200 (Bax) em câmara úmida *overnight* a 4°C. No dia seguinte, os cortes foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário biotilado, durante 1 h e posteriormente com estreptavidina (Dako, EUA), por 30 min, em temperatura ambiente. Após isto, os cortes foram lavados novamente com PBS, revelados com diaminobenzidina (DAB) (Dako, EUA) e contracolorados com Hematoxilina de Harris. As lâminas foram então desidratadas e diafanizadas em concentrações crescentes de álcool, 70%, 90%, 100% e xilol e montadas com Entellan (Merck, Alemanha) e lamínulas para posterior observação ao microscópio óptico.

2.9 Morfometria

A morfometria foi realizada no programa Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, EUA). De cada fragmento de fígado foram fotografados cinco campos aleatórios, em um aumento de 400x, no microscópio óptico. Para a quantificação da esteatose foi utilizada uma máscara na qual eram selecionadas três áreas aleatórias, de cada campo fotografado, e era calculado a porcentagem do espaço em branco neles presente. Foi realizada a média dessas porcentagens das fotomicrografias para a representação de cada animal.

Para as imunomarcações foi realizado um processo semelhante. Foram utilizados cinco campos aleatórios de cada fragmento de fígado, fotografados no aumento de 400x. Foi selecionado manualmente as áreas marcadas com o DAB, que se encontravam mais amarronzadas, obtendo-se os resultados em pixel/ μm^2 e realizado a média de cada fotomicrografias para a representação de cada animal.

Os dados obtidos da porcentagem de esteatose e da quantificação da imunomarcação foram coletados e armazenados para posteriormente ser analisado num programa estatístico.

2.10 Microscopia eletrônica de transmissão

Para avaliação dos aspectos ultraestruturais, o fígado foi fixado em solução de glutaraldeído 2,5%, a 4°C por 24h. O material foi clivado e lavado 3 vezes por 10 min em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M e pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio a 0,8% por 1 h. Após as lavagens, as amostras foram desidratadas em concentrações

crecipientes de acetona, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, por 30 min em cada. Em seguida, o material foi infiltrado com acetona e resina epon (TedPella, Estados Unidos) [25mL de Epon 812, 17 mL de anidrido metil náico (MNA), 8 mL de anidrido dodecenil succínico (DDSA), 32 gotas de 2,4, tridimetilaminametilfenol (DMP) nas proporções de 2:1 por 2 h, 1:1 por 2 h e 1:2 por 2 h e *overnight* em resina epon pura]. No dia seguinte, as amostras foram inseridas em resina Epon-812 nova pura, em tubos abertos por 4 h, e posteriormente incluídas em nova resina epon pura na qual foi polimerizada em estufa, a 60°C, por 3 dias. Cortes ultrafinos (60-70 nm) de áreas selecionadas foram realizados com ultramicrótomo (Leica Ultracut-UCT, Leica Aktiengesellschaft, Áustria) e foram contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo para observação no microscópio eletrônico de transmissão JEM1200EX do Laboratório de microscopia eletrônica do Instituto de biologia da Universidade Federal Fluminense (JEOL, Brasil) a 80 kV.

2.11 Análise Estatística

Os dados foram inseridos em planilhas do Excel e analisados com o programa estatístico GraphPad Prism v. 8.0.1 (GraphPad Software, USA). Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pela comparação entre os grupos, e as diferenças entre eles foram testadas. A comparação dos dados no período pré-tratamento foi realizada através do teste t-Student e no período pós-tratamento pelo teste one-way ANOVA ou two-way ANOVA seguindo-se do pós-teste de Holm Sidak. O nível de significância utilizado foi de 5%.

3 RESULTADOS

3.1 Análise físico-química das formulações do óleo de capivara

3.1.1 Caracterização físico-química do óleo de capivara e da nanoemulsão

A análise organoléptica do óleo de capivara mostrou que, a 25°C, ele se apresentava em estado líquido, límpido com cor amarelo citrino, indicando uma grande quantidade de gordura poli-insaturada. A análise físico-química (Tabela 1) demonstrou que ele possui uma acidez em torno de $0,378 \pm 1,68$, o que corrobora com a quantidade de ácido oléico encontrado na análise da composição do óleo de capivara (3,76%) descrito na tabela 2 e se encontra dentro dos valores de referência estabelecidos pela Instrução Normativa N° 49, de 22 de dezembro de 2006 do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA).

A avaliação do índice de peróxido mostrou uma baixa rancidez, $5,08 \pm 0,712$ em uma escala de 0 a 20, onde 20 é considerado alto teor de rancidez, estabelecendo-se no limite superior determinado pela IN 49/2006. Este dado é corroborado pela ausência de umidade na amostra, visto que a umidade pode levar a reação de hidrólise e oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados e aumentar a rancidez do óleo. Por último, a avaliação de cinzas totais no óleo mostrou um teor de 6,84% de impurezas (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos do óleo de Capivara. O desvio calculado é o desvio padrão relativo.

Parâmetros	Óleo de Capivara
Acidez (% ácido oleico)	$0,378 \pm 1,68$
Índice de peróxidos (meq/Kg)	$5,08 \pm 0,712$
Cinzas (% m/m)	6,84
Umidade	AUSENTE

A análise da composição química do óleo de capivara foi realizada por cromatografia de alta eficiência (Tabela 2) e mostrou a presença de diversos ácidos graxos, dentre eles podemos destacar o ácido palmítico (56,06%), o ácido esteárico (16,22%), o ácido linoleico (10,93%), o ácido mirístico (9,48%) e o ácido oleico (3,76%) como os principais componentes do óleo de capivara. Como valores referenciais da composição de óleo rico em PUFA's utilizamos o óleo de peixe, encontrado no mercado e muito utilizado como suplemento alimentar. Observamos a

mostra de referência de óleo de peixe apresentou valores reduzidos de ácido palmítico (52,73%), ácido esteárico (11,55%), ácido linoleico (2,63%) e ácido oléico (2,62%) e valor elevado de ácido mirístico (21,48%) em sua composição quando comparado com o óleo de capivara.

Tabela 2: Composição química do óleo de capivara.

COMPOSTO	ÓLEO DE CAPIVARA		ÓLEO DE PEIXE	
	ÁREA	%	ÁREA	%
Ác. Caprico	188340	0,15	11676	0,02
Ác. Laurico	249570	0,2	323897	0,57
Ác. Mirístico	11717628	9,48	12246077	21,48
Ác. Palmitoleico	3799566	3,07	4327190	7,59
Ác. Palmítico	69325636	56,06	30059691	52,73
Ác. Linoleico	13518208	10,93	1491217	2,62
Ác. Oleico	4645935	3,76	1494724	2,62
Ác. Esteárico	20058741	16,22	6584705	11,55
Ác. Araquídico	152567	0,12	278791	0,49
Ác. Erucico	-	-	944	0
Ác. beenico	5221	0	43290	0,08
Ác. Lignocérico	-	-	149928	0,26
Total	123661412	100	57012130	100

A escolha da formulação em nanoemulsão deu-se devido ao aumento de estabilidade deste preparo em relação às nanopartículas. Com os produtos em mãos, avaliamos as características organolépticas do óleo de capivara e as nanoemulsões contendo o óleo de capivara e óleo inerte (Nanoemulsão Branca), utilizada neste projeto como controle negativo. As nanoemulsões do óleo de capivara e branca apresentavam-se também em estado líquido, com cor branca leitosa sem deposição de precipitado.

Utilizando duas metodologias de avaliação das propriedades físico-químicas das nanoemulsões, análise por difração à laser e a espectroscopia de correlação de fótons, avaliamos os diâmetros das partículas nas nanoemulsões e observamos que as nanoemulsões com óleo inerte (NB) apresentaram um diâmetro entre $0,186 \pm 0,012 \mu\text{m}$ e $175,0 \pm 0,007 \text{ nm}$, respectivamente. A análise das nanoemulsões com óleo de capivara (OCN) por esses métodos mostraram uma variação de diâmetro maior entre as partículas ($0,337 \pm 0,041 \mu\text{m}$ e $183,9 \pm 2,37 \text{ nm}$, respectivamente). Utilizando as mesmas metodologias acima, também avaliamos a homogeneidade e amplitude de distribuição das partículas nas formulações, e para isso utilizamos como parâmetros a distribuição dos tamanhos da partícula (Span) e o índice de polidispersão (PDI). Nossas análises mostraram que NB apresenta uma distribuição de partículas de $1,725 \pm 0,025$ Span, e PDI de $0,089 \pm 0,021$. Já a OCN apresenta uma distribuição

de tamanho de partículas de $0,651\pm 0,039$ Span e um PDI em torno de $0,109\pm 0,022$. Além do mais, foi observado pH ácido (NB: $5,44\pm 0,27$ e OCN: $5,57$) e os valores negativos, próximos de zero, do potencial Zeta (NB: $-6,72\pm 0,13$ e OCN: $-9,43\pm 0,68$) (Tabela 3).

Tabela 3: Caracterização físico-química das nanoemulsão brancas (NB) e nanoemulsão contendo o óleo de capivara (OCN).

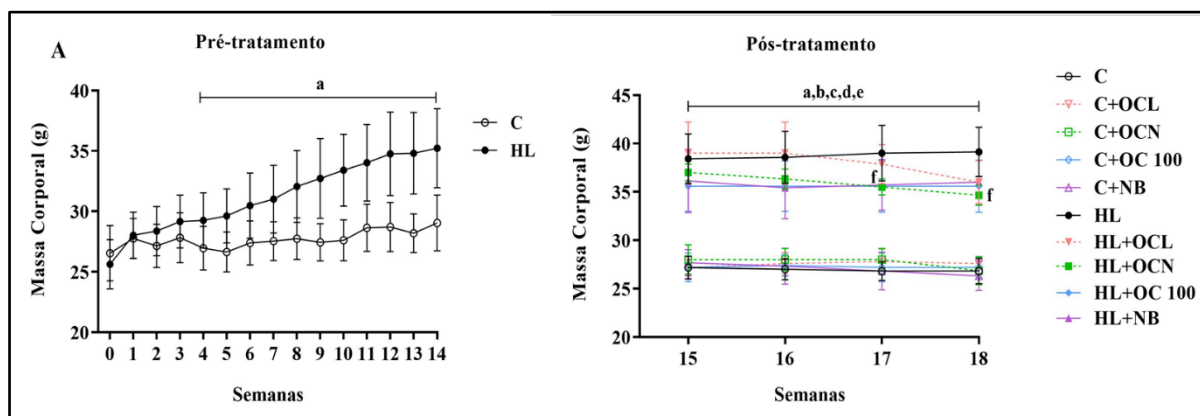
	Características	Resultados	
		NB	OCN
Difração à Laser	Difração de esfera equivalente (d4.3) (μm)	$0,186\pm 0,012$	$0,337\pm 0,041$
	Distribuição do tamanho das partículas (Span)	$1,725\pm 0,025$	$0,651\pm 0,039$
Espectroscopia de correlação de fótons	Diâmetro médio das nanopartículas (Z-Average) (nm)	$175,0\pm 0,007$	$183,9\pm 2,37$
	Índice de Polidispersão (PDI)	$0,089\pm 0,021$	$0,109\pm 0,022$
	Potencial Zeta (mV)	$-6,72\pm 0,13$	$-9,43\pm 0,68$
	pH	$5,44\pm 0,27$	$5,57$

3.2 Avaliação das formulações farmacêuticas do óleo de capivara no modelo de obesidade

3.2.1 Massa corporal

A massa corporal (MC) dos animais, medida semanalmente, mostrou que o grupo HL (AUC: $132,6\pm 1,967$), que ingeriu uma dieta hiperlipídica, apresentou um aumento significativo da massa corporal, a partir da quarta semana, comparado ao grupo controle (AUC: $113,4\pm 1,267$). Além disso, vê-se que apenas os animais do grupo HL+OCN (AUC: $107,7\pm 1,085$) -tratados com nanoemulsão de óleo de capivara- apresentaram uma diminuição significativa da massa corporal quando comparado ao grupo HL (AUC: $119,2\pm 1,447$) (Gráfico 1). No presente trabalho o óleo de capivara livre não foi capaz de reduzir significativamente a MC, mas o óleo em nanoemulsão foi, isso pode estar relacionado ao efeito que a nanotecnologia farmacêutica pode causar no composto.

Gráfico 1: Evolução da massa corporal.

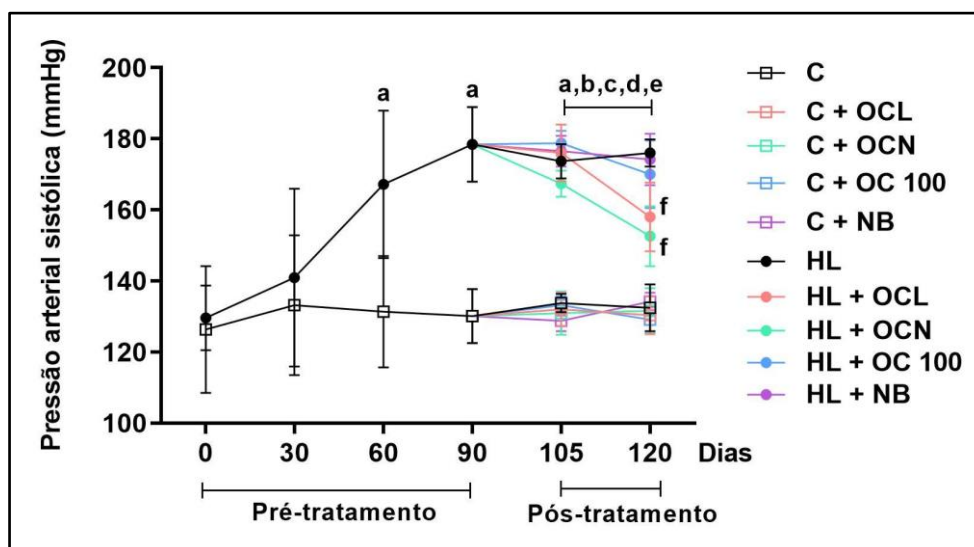


Legenda: Análise da massa corporal dos camundongos submetidos à dieta controle e hiperlipídica nos períodos pré e pós tratamento. (A) Análise da massa corporal do pré-tratamento. (B) Análise da massa corporal do pós-tratamento. a: diferente do grupo controle; b: diferente do grupo C+OCL; c: diferente do grupo C+OCN; d: diferente do grupo C+OC 100; e: diferente do grupo C+NB; f: HL+OCN diferente do grupo HL. Análise estatística: *t-Student* até 14ª semana (pré-tratamento) ou two-way ANOVA da 15ª a 18ª semana (pós-tratamento) com pós-teste de Holm Sidak. $p \geq 0,05$. N=6 para todos os grupos experimentais.

3.2.2 Pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica (PAS) dos animais foi aferida pelo método de pletismografia caudal mensalmente durante o período pré-tratamento e quinzenalmente no pós tratamento. No pré-tratamento, pode-se observar que os animais do grupo HL (T_{60} : $156,20 \pm 11,21$; T_{90} : $182,67 \pm 1,99$) apresentaram uma elevação significativa dos níveis de PAS comparados aos animais do grupo controle (T_{60} : $130,50 \pm 2,53$; T_{90} : $127,78 \pm 1,37$). Já no pós tratamento, pode-se destacar que tanto o grupo HL tratado com OCL (T_{120} : $156,47 \pm 4,46$) quanto com OCN (T_{120} : $152,61 \pm 3,46$) foram capazes de diminuir significativamente a PAS quando comparado ao grupo HL (T_{120} : $177,40 \pm 0,90$) (Gráfico 2).

Gráfico 2: Evolução da pressão arterial sistólica.

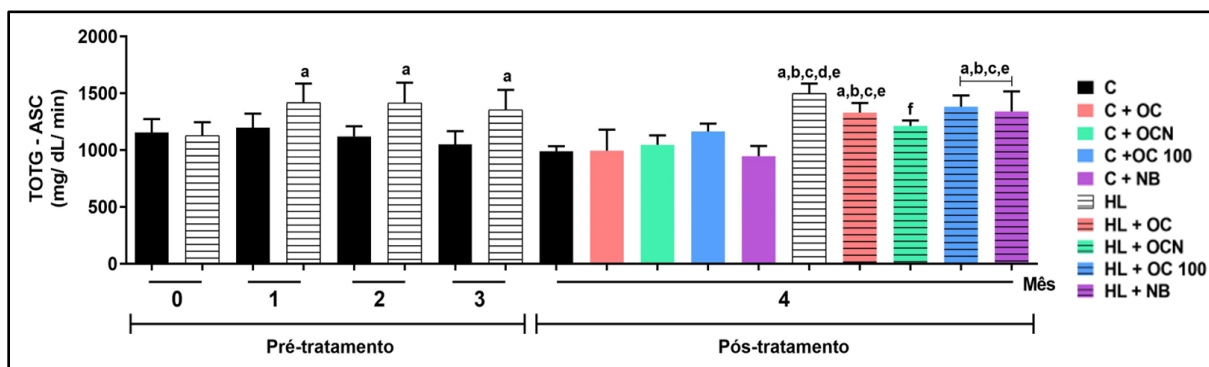


Legenda: Análise da pressão arterial sistólica nos camundongos com dieta controle e hiperlipídica no período pré e pós tratamento. a: diferente do grupo C; b: diferente do grupo C+OCL; c: diferente do grupo C+OCN; d: diferente do grupo C+OC 100; e: diferente do grupo C+NB; f: diferente do grupo HL. Análise estatística: *t-Student* até 14ª semana (pré-tratamento) ou two-way ANOVA da 15ª a 18ª semana (pós-tratamento) com pós-teste de Holm Sidak. $p \geq 0,05$. N=6 para todos os grupos experimentais.

3.2.3 Teste de tolerância oral à glicose (TOTG)

Para avaliar a tolerância oral à glicose, foi medida, mensalmente, a concentração de glicose plasmática dos animais, utilizando um glicosímetro. O grupo HL apresentou aumento significativo dos níveis de glicose no sangue no período pré-tratamento comparado aos animais do grupo C, sugerindo que esses animais desenvolveram uma possível resistência à insulina. No entanto, no período pós tratamento, os animais do grupo HL+OCN apresentaram diminuição significativa desses níveis quando comparado ao grupo HL, indicando que o tratamento com nanoemulsão de óleo de capivara foi capaz de aumentar a tolerância à glicose (Gráfico 3).

Gráfico 3: Concentração de glicose plasmática.



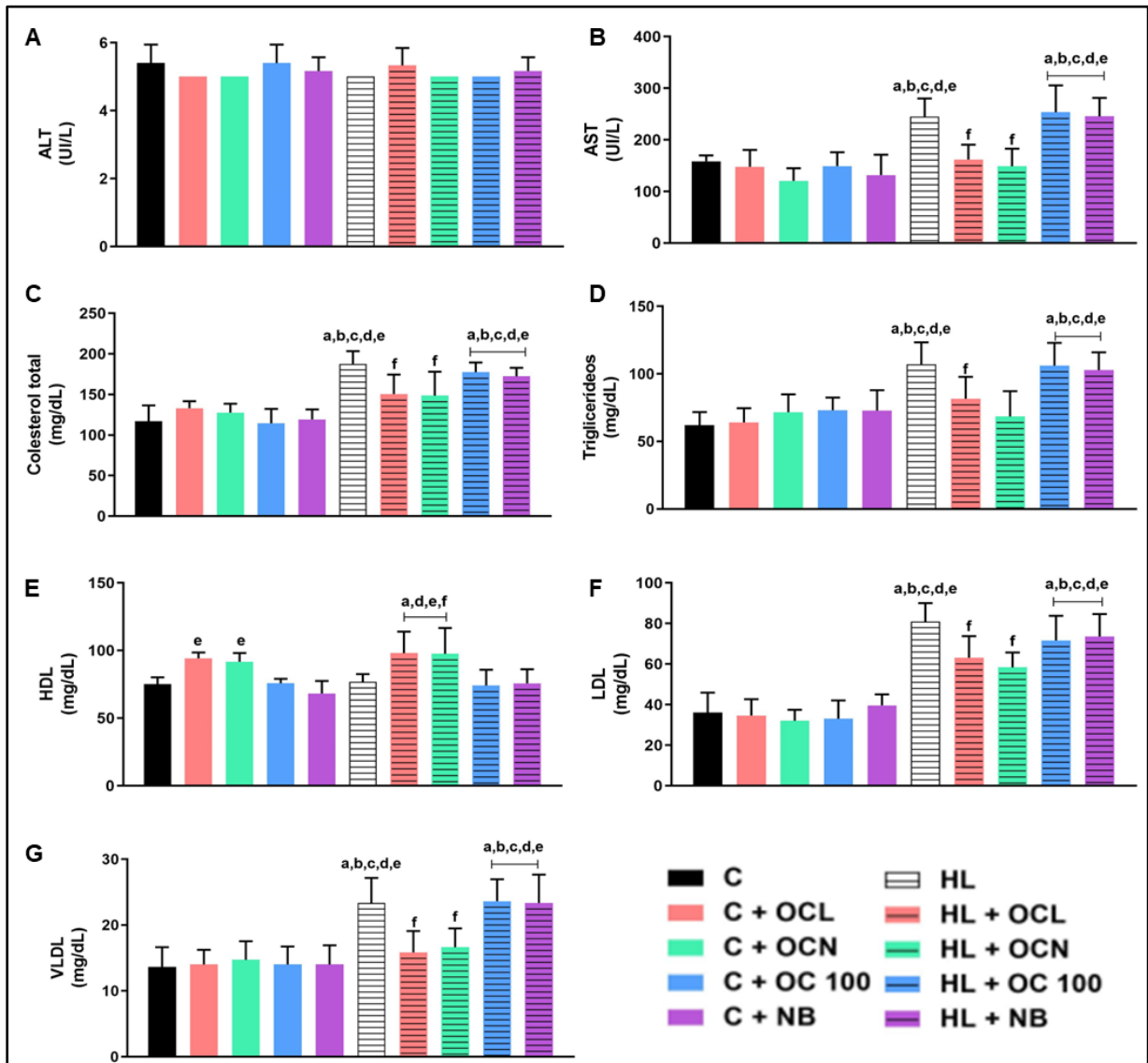
Legenda: Análise do teste de tolerância oral à glicose nos camundongos com dieta controle e hiperlipídica no período pré e pós tratamento. a: diferente do grupo C; b: diferente do grupo C+OCL; c: diferente do grupo C+ONC; d: diferente do grupo C+OC 100; e: diferente do grupo C+NB; f: diferente do grupo HL. Análise estatística: *t-Student* até 14ª semana (pré-tratamento) ou two-way ANOVA da 15ª a 18ª semana (pós-tratamento) com pós-teste de Holm Sidak. $p \geq 0,05$. N=6 para todos os grupos experimentais.

3.2.4 Bioquímica plasmática

O plasma foi utilizado para análise dos níveis colesterol total, HDL, LDL, VLDL, TGs, AST e ALT, por espectrofotometria. AST e ALT são enzimas marcadoras da função hepática, no nosso trabalho observamos que os níveis de AST aumentaram significativamente no grupo HL comparado ao grupo C e que tanto o tratamento OCL, quanto o tratamento OCN, diminuiram significativamente os níveis dessa enzima no HL, já os níveis de ALT não apresentaram diferença entre os grupos.

Avaliando os outros parâmetros bioquímicos, observamos que os níveis de colesterol total, TGs, LDL e VLDL, aumentaram significativamente no grupo HL comparado ao grupo C. Nos grupos HL, o tratamento com OCL foi capaz de diminuir esses níveis em todos os parâmetros, exceto nos níveis de triglicerídeos, enquanto OCN conseguiu diminuir em todos. Interessantemente, os níveis de HDL, tido como bom colesterol, aumentaram significativamente tanto nos grupos C, quanto nos grupos HL tratados com OCL e OCN (Gráfico 4).

Gráfico 4: Parâmetros bioquímicos no soro.



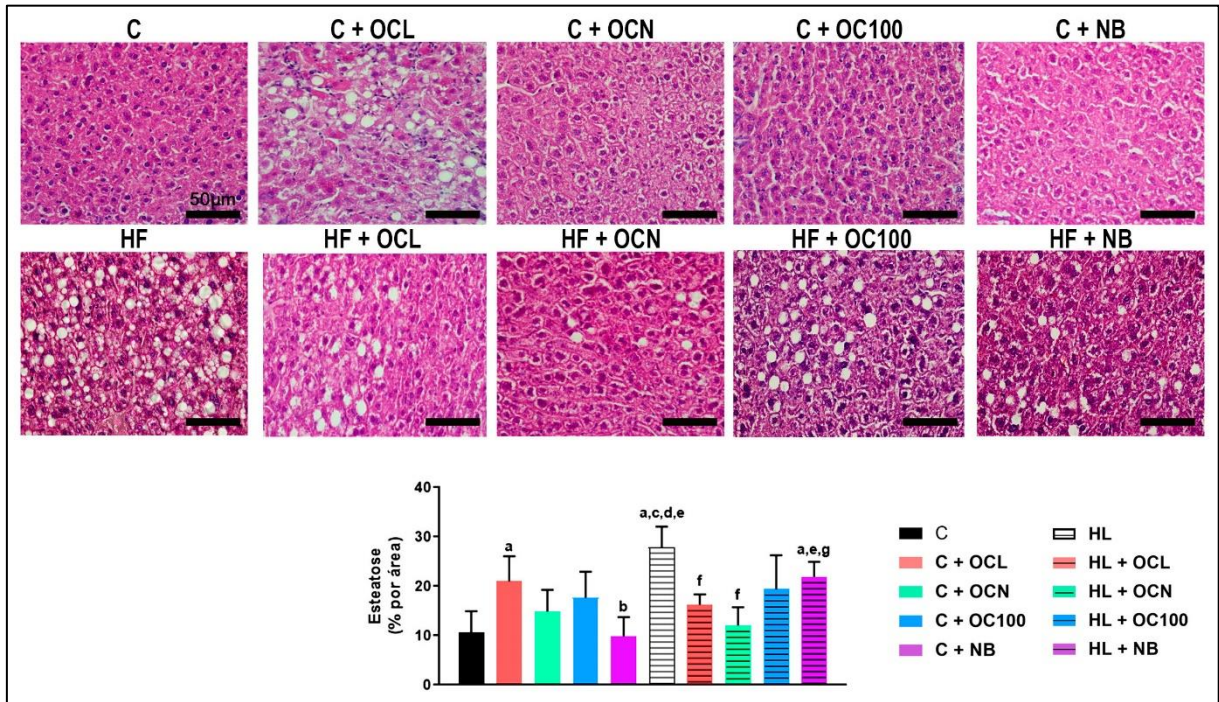
Legenda: Análise da bioquímica plasmática nos camundongos com dieta controle e hiperlipídica. (A) Análise da alanina aminotransferase (ALT). (B) Análise da aspartato aminotransferase (AST). (C) Análise do colesterol total. (D) Análise de triglicédeos. (E) Análise de lipoproteína de alta densidade (HDL). (F) Análise de lipoproteína de baixa densidade (LDL). (G) Análise de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). a: diferente do grupo C; b: diferente do grupo C+OCL; c: diferente do grupo C+OCN; d: diferente do grupo C+OC 100; e: diferente do grupo C+NB; f: diferente do grupo HL. Análise estatística: two-way ANOVA com pós-teste de Holm Sidak. $p \geq 0,05$. N=6 para todos os grupos experimentais.

3.3 Avaliação do tratamento de diferentes formulações do óleo de capivara no fígado de animais obesos

3.3.1 Esteatose hepática

A coloração de HE foi utilizada para a avaliação da esteatose hepática. O grupo HL apresentou esteatose macro e micro vesicular intensa comparada ao grupo C, e tanto o tratamento OCL quanto OCN foram capazes de reduzir significativamente a esteatose dos animais obesos. Pudemos observar também que o grupo obeso que recebeu o tratamento com NB teve a esteatose significativamente maior que outros três grupos, mas o que mais chama atenção é a diferença quando comparado ao grupo HL+OCN. No entanto, nossos dados também mostraram que no grupo C, o tratamento com OCL causou aumento significativo dos níveis de esteatose (Figura 6).

Figura 8: Coloração pela técnica de Hematoxilina e Eosina de Harris para visualização do grau de esteatose.



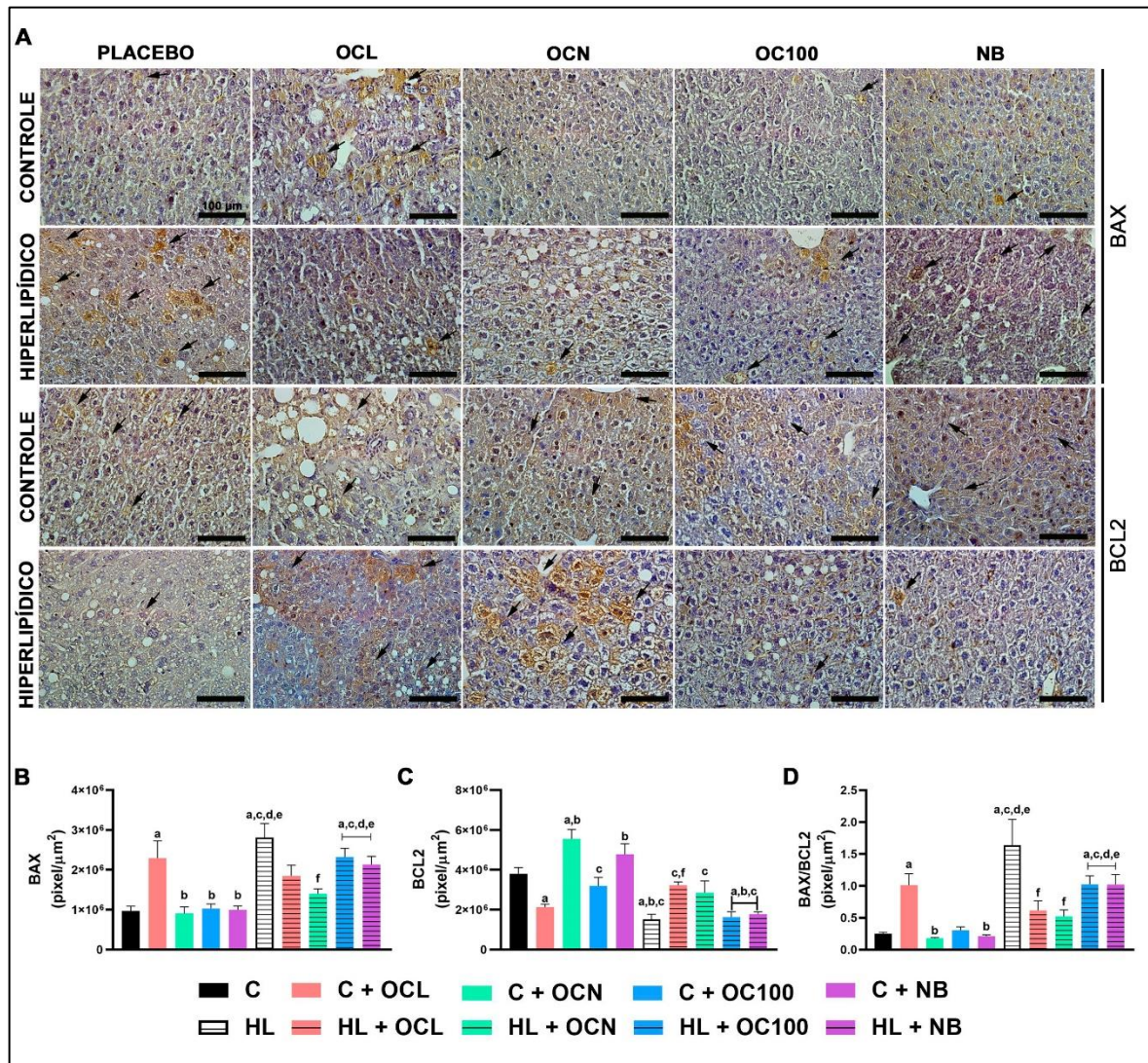
Legenda: Fotomicrografias de corte transversal do fígado de camundongos controle e obesos com e sem tratamento coradas com Hematoxilina e Eosina. (A) Coloração de Hematoxilina e Eosina para a observação da esteatose. Objetiva de 40x. Barra de calibração de 50µm. (B) Gráfico com quantificação da esteatose hepática. Resultados expressos como média ± desvio padrão da média. a: diferente do grupo C; b: diferente do grupo C+OCL; c: diferente do grupo C+OCN; d: diferente do grupo C+OC 100; e: diferente do grupo C+NB; f: diferente do grupo HL; g: diferente do grupo HL+OCN. Análise estatística: one-way ANOVA com pós-teste de Holm Sidak. $p \geq 0,05$ N=6 para todos os grupos experimentais.

3.3.2 Dano celular

Para a avaliação do dano celular foram realizadas as imunohistoquímica para detecção de Bax, Bcl-2 e Citocromo c, que são proteínas que participam do processo apoptótico celular. Avaliamos que no grupo HL houve aumento significativo da expressão de Bax, uma proteína pró-apoptótica, comparada ao grupo C. Apenas o tratamento com a nanoemulsão foi capaz de diminuir significativamente a expressão de Bax no grupo hiperlipídico, mas pudemos observar uma tendência de diminuição com o tratamento OCL nesse mesmo grupo. Quando avaliada a expressão de Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica, observamos o inverso, o grupo HL foi significativamente menor comparado ao grupo C. No entanto, nessa marcação, apenas o tratamento com a maior concentração de óleo livre foi capaz de aumentar a expressão de Bcl-

2, mesmo podendo observar uma tendência de aumento no grupo OCN. Quando avaliado a razão Bax/Bcl-2, notamos um aumento significativo no grupo HL comparado ao grupo C e que tanto o tratamento OCL quanto OCN foram capazes de diminuir essa razão. Em todas essas no grupo C o tratamento com OCL surtiu o efeito inverso ao esperado, aumentou significativamente a expressão de Bax e a razão Bax/Bcl-2, e diminuiu a expressão de Bcl-2 (Figura 7).

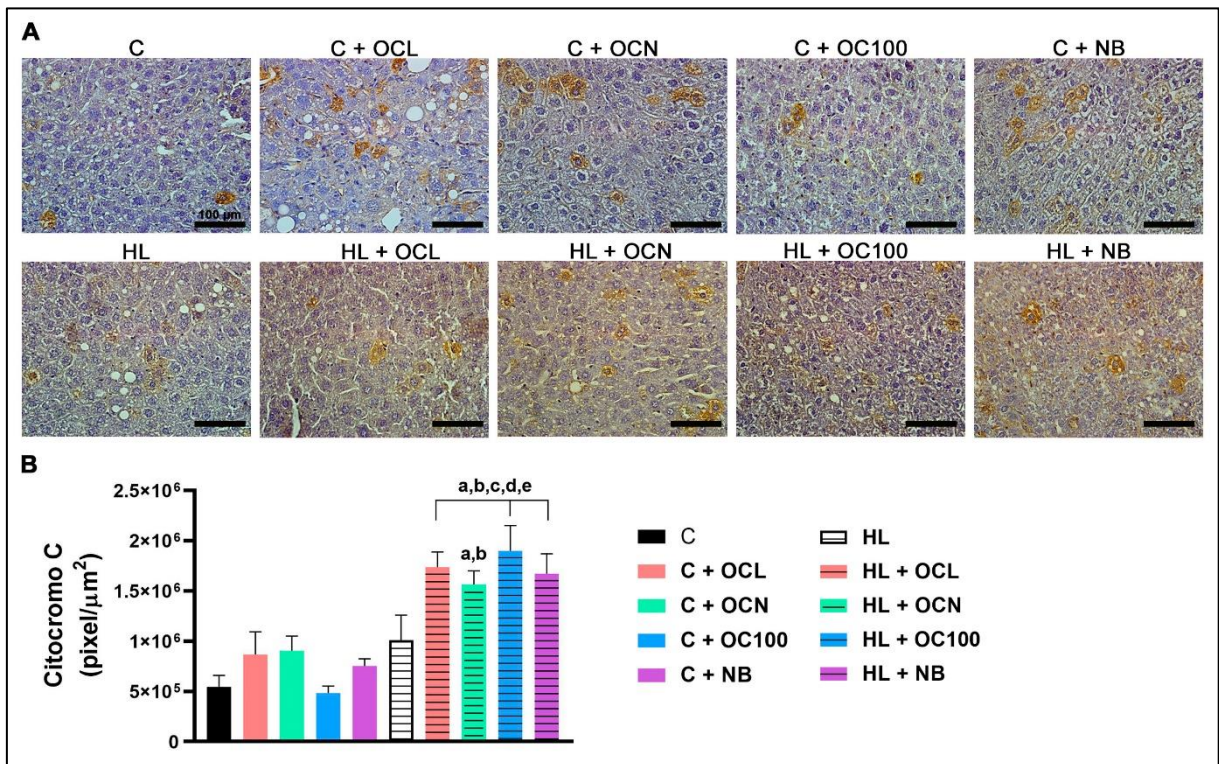
Figura 9:Imunomarcção para Bax e Bcl-2.



Legenda: Fotomicrografias de corte transversal do fígado de camundongos controle e obesos com e sem tratamento imunomarcados para Bax e Bcl-2. (A) Imunohistoquímica por peroxidase para Bax e Bcl-2. Objetiva de 40x. Barra de calibração de 50μm. (B) Gráfico com quantificação dos níveis de Bax. (C) Gráfico com quantificação dos níveis de Bcl-2. (D) Gráfico com a razão Bax/Bcl2. Resultados expressos como média ± desvio padrão da média. a: diferente do grupo C; b: diferente do grupo C+OCL; c: diferente do grupo C+ONC; d: diferente do grupo C+OC 100; e: diferente do grupo C+NB; f: diferente do grupo HL. (seta) indica imunomarcções nos hepatócitos. Análise estatística: one-way ANOVA com pós-teste de Holm Sidak. $p \geq 0,05$ N=6 para todos os grupos experimentais.

Na avaliação da expressão de Citocromo c, mesmo não observando um resultado significativo, pudemos notar um aumento da expressão no grupo HL comparado ao grupo C. Nessa imunomarcação, vimos um aumento inesperado da expressão de Citocromo c nos grupos HL tratados com OCL, OCN, OC100 e NB comparados aos grupos C (Figura 8).

Figura 10: Imunomarcação para Citocromo c.



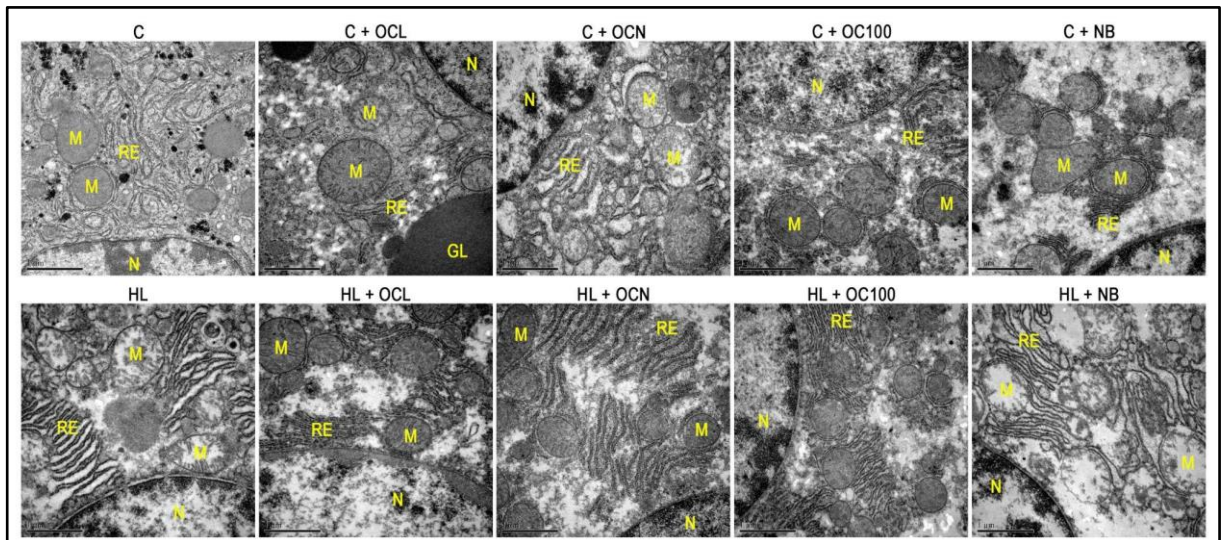
Legenda: Fotomicrografias de corte transversal do fígado de camundongos controle e obesos com e sem tratamento imunomarcados para Citocromo c. (A) Imunohistoquímica por peroxidase para Citocromo c. Objetiva 40x. Barra de calibração de 50 μm. (B) Gráfico com quantificação dos níveis de Bax. Resultados expressos como média ± desvio padrão da média. a: diferente do grupo C; b: diferente do grupo C+OCL; c: diferente do grupo C+ONC; d: diferente do grupo C+OC 100; e: diferente do grupo C+NB; f: diferente do grupo HL. Análise estatística: one-way ANOVA com pós-teste de Holm Sidak. $p \geq 0,05$ N=6 para todos os grupos experimentais.

3.3.3 Microscopia eletrônica

Na MET pudemos observar que a organização ultraestrutural dos hepatócitos dos grupos C, C+OCN, C+OC100 e C+NB apresentam a citoarquitetura em um arranjo bem organizado, evidenciando mitocôndrias e RE preservados com a membrana mitocondrial intacta. O grupo C+OCL mesmo apresentando mitocôndrias preservadas e com a membrana intacta, apresentou

o RE com suas cisternas um pouco mais dilatadas e a presença de gotículas lipídicas. Quando observamos o grupo HL pudemos ver uma perda da integridade da membrana mitocondrial, RE com cisternas bem dilatadas e maior desorganização na citoarquitetura, além de pequenos poros na membrana plasmática do núcleo desses animais. Após o tratamento, pudemos observar nos animais com dieta hiperlipídica que tanto OCL, quanto OCN e OC100, puderam reverter essas características, recuperando a integridade da membrana mitocondrial e do RE, levando à ausência dos poros visíveis no núcleo dos animais HL e a melhora na citoarquitetura desses hepatócitos (Figura 9).

Figura 11: Eletromicrografias de corte transversal de fígado.



Legenda: Eletromicrografias de corte transversal de fígado de camundongos controle e obesos com e sem tratamento. Abreviações: M, mitocôndria; N, núcleo; RE, retículo endoplasmático; GL, gotícula lipídica. Aumento: 20.000x. Barra calibração 1 μ m.

4 DISCUSSÃO

Já é estabelecido na literatura a administração de dieta hiperlipídica em camundongos C57Bl/6 para a indução da obesidade (MASI et al., 2012; WHITE et al., 2013). No presente trabalho, os camundongos HL apresentaram aumento na MC, na PAS, e nos níveis de tolerância oral à glicose indicando uma possível resistência à insulina. Pôde também ser observado alterações plasmáticas com aumento dos níveis de colesterol total, HDL, LDL, VLDL, TGs e AST, além de alterações hepáticas com o aumento da esteatose e da ativação da via apoptótica, alterações ultraestruturais, e o desequilíbrio das enzimas antioxidantes.

Muitos trabalhos vêm estudando a correlação da obesidade com a DHGNA e suas consequências, como a esteatose hepática (FRAULOB, et al., 2012; KAWANO E COHEN, 2013). Quando a capacidade do tecido adiposo, para o armazenamento energético, está diminuída, o hepatócito acaba sendo responsável por funções similares aos adipócitos, ficando atribuído a estas células características como de armazenamento de lipídios aos quais o tecido adiposo não foi capaz de acolher. Na obesidade podemos observar um excesso de lipídios circulantes que vai ser responsável por causar um acúmulo de gordura, principalmente no fígado e músculo esquelético, e RI em múltiplos órgãos, tendo a dieta como principal forma de obtenção desses lipídios (DONNELLY et al., 2005; MAGKOS; MANTZOROS, 2011; POLYZOS; MANTZOROS, 2015).

Em contrapartida, alguns estudos vêm mostrando a correlação benéfica suplementação de PUFAs para o tratamento da obesidade e de suas doenças associadas (CHIU et al., 2018; AL-OKBI et al., 2018). Trabalhos com óleo de krill (crustáceo) e óleo de peixe, ambos ricos em PUFAs, vêm mostrando dados positivos do tratamento com esses óleos em animais alimentados com dieta hiperlipídica (GART et al., 2021; YAMAZAKI; LI; IKAGA, 2021). Atualmente, a fonte mais utilizada de PUFAs é óleo de peixe (SHERRATT; LERO; MASON, 2020), entretanto a variação sazonal, a poluição marinha e o aumento da comercialização de ômega-3, criou uma demanda alta por esse óleo, tornando sua utilização algo pouco sustentável (GO, et al., 2016). Sendo assim, a busca por uma fonte alternativa desses AGs é essencial, e é nesse cenário que o óleo de capivara se apresenta. Dois estudos já vêm mostrando os benefícios que esse subproduto oriundo da capivara pode gerar, entre eles a aceleração do processo de cicatrização em feridas cutâneas de ratos e melhorar a esteatose, inflamação e a atividade mitocondrial hepática (MARINHO; NETO-FERREIRA; JOSÉ DE CARVALHO, 2013; MARINHO et al., 2018).

No entanto, mesmo apresentando grandes benefícios à saúde, os PUFAs, oxidam facilmente quando entram em contato com o oxigênio, comprometendo a suplementação do indivíduo (SHUKLA; PERKINS, 1991). É a partir daí que vamos observar a implementação da nanotecnologia farmacêutica, que mesmo sendo uma tecnologia relativamente recente, existem estudos que atribuem vantagens na utilização de compostos nanoencapsulados ou nanoparticulados, como a redução da dose do medicamento e a melhor absorção do fármaco (D'ALMEIDA et al., 2017). Nesse sentido, o presente estudo visa comparar duas apresentações farmacêuticas do óleo de capivara, tanto o óleo livre como ele em nanoemulsão, para observar quais os benefícios que elas são capazes de apresentar nas alterações impostas pela obesidade.

Nossas análises mostraram um alto teor de impureza (6,84%) e apesar desse valor, devemos considerar que o método de extração do óleo de capivara doado pelo criadouro não foi qualificado e o óleo não foi refinado, o que pode estar diretamente relacionado ao valor do teor de impurezas na amostra. Além disso, observamos que a composição do óleo de capivara continha 56,06% de ácido palmítico; 16,22% de ácido esteárico; 10,93% ácido linoleico; 9,48% ácido mirístico; e 3,48% ácido oleico. A concentração desses AGs se apresenta elevada comparada a amostra de referência de óleo de peixe. Os ácidos oleico e linoleico, apresentam um papel controverso na obesidade, estes PUFAs são capazes de produzir derivados pró-inflamatórios do ácido araquidônico, entretanto, o ácido alfa-linolênico (ômega-3) é responsável pela produção de EPA e DHA, precursores de resolvinas, protectinas, maresinas e lipoxinas, substâncias com um importante papel anti-inflamatório, sendo apontado por diversos autores como benéficos em doenças metabólicas como diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares (IZAOLA et al., 2015). Por apresentar concentrações mais elevadas desses PUFAs, o óleo de capivara se apresenta como fonte promissora de AGs e uma alternativa medicamentosa para a obesidade e as doenças relacionadas.

Ao analisarmos as propriedades físico-químicas das nanoemulsões observamos que as nanoemulsões NB tinham um diâmetro entre $0,186 \pm 0,012 \mu\text{m}$ e $175,0 \pm 0,007 \text{ nm}$ e as OCN $0,337 \pm 0,041 \mu\text{m}$ e $183,9 \pm 2,37 \text{ nm}$, apresentando uma variação de diâmetro maior, esta variação pode ser explicada pela diferenças intrínsecas de cada metodologia aplicada, no entanto, por apresentar mais de 50% de suas gotículas com cerca de 70 nm, a nanoemulsão OCN está dentro da classificação de nanomateriais estabelecido pela União Europeia em 2011 (POTOČNIK J., 2011). A redução do tamanho das partículas nanométricas confere propriedades importantes e diferenciadas aos nanosistemas quando comparados aos sistemas convencionais conhecidos, possibilitando uma redução na dosagem requerida e conseqüentemente a diminuição dos efeitos adversos; podendo então reduzir a toxicidade e melhorar a adesão do paciente ao tratamento

(FAROKHZAD; LANGER, 2009). A homogeneidade e amplitude de distribuição das partículas das formulações foram avaliadas pelos parâmetros Span e PDI. NB apresentou uma distribuição de partículas de $1,725 \pm 0,025$ Span, e PDI de $0,089 \pm 0,021$, enquanto OCN tinha a distribuição de $0,651 \pm 0,039$ Span e um PDI em torno de $0,109 \pm 0,022$. Esses resultados apontam que as nanoemulsões possuem estreita distribuição de tamanho, já que quanto menor o valor de Span mais estreita é a distribuição das partículas, e que elas se encontram monodispersas, já que possuem valores próximos de 0,1, valor de referência para as formulações farmacêuticas estáveis. Outras duas características importantes observadas foram o pH e o potencial Zeta. Ambas as formulações apresentaram um pH constante, e tendo NB o potencial Zeta de $-6,72 \pm 0,13$ e OCN de $-9,43 \pm 0,68$, valores negativos e próximos de zero, características que garantem a essas formulações, estabilidade durante a estocagem (TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007).

No presente estudo, a MC dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica aumentou progressivamente em relação aos animais alimentados com dieta padrão. Dados que corroboram com a literatura, no qual encontramos diversos trabalhos que relacionam a administração de uma dieta hiperlipídica com o aumento da MC de camundongos (WINZELL; AHRÉN, 2004; MASI et al., 2012). Além disto, já foi visto esse tipo de dieta desenvolve consequências como obesidade, hiperinsulinemia, hiperglicemia, hipertensão e danos hepáticos (ROCCHINI; MARKER; CERVENKA, 1997; WHITE et al., 2013).

A grande quantidade de gordura saturada na alimentação está intimamente relacionada ao desenvolvimento de RI e elevação da glicose plasmática (FORBES, et al., 2013), e independentemente de estar relacionada com a obesidade, a grande quantidade de AGs saturados têm sido relacionados com o desenvolvimento de disfunções metabólicas como intolerância a glicose e insensibilidade à insulina (RICCARDI, et al., 2004; JEROMSON et al., 2015). Em nosso dado vimos que a administração de dieta hiperlipídica foi responsável por aumentar os níveis de glicose no sangue, sugerindo uma possível resistência à insulina.

Ao avaliarmos os dados relativos a PA, no período pré-tratamento, observamos uma elevação significativa dos níveis de PAS nos animais que receberam a administração de dieta hiperlipídica quando comparados aos que receberam dieta padrão. Diversos estudos já mostraram uma associação entre o aumento da pressão arterial com o ganho de peso (YOUFA WANG PHD; QIONG JOANNA WANG MS, 2004), foi demonstrado que indivíduos obesos têm 3,5 vezes mais chances de ter hipertensão e que 60% da hipertensão é atribuível ao aumento das reservas adiposas (LANDSBERG et al., 2013). A fisiopatologia da PA ligada à obesidade depende de vários fatores (DEMARCO, et al., 2014), é um mecanismo complexo e, às vezes,

independente, e tem como papel principal, além de fatores genéticos e ambientais, a atuação do sistema nervoso simpático, à função renal e adrenal, o endotélio, às adipocinas e à RI (SERAVALLE; GRASSI, 2017). No entanto, na literatura, já foi visto uma correlação positiva da combinação de uma dieta rica em nutrientes, com um modesto nível de sódio e níveis elevados de PUFAs como tratamento da hipertensão (SIMOPOULOS, 2009; DEMARCO, et al., 2014).

Ao contrário dos AGs saturados, os MUFAs e PUFAs têm demonstrado atividades úteis ao metabolismo (JEROMSON et al., 2015). Em nosso estudo, observamos um aumento da MC, dos níveis de glicose plasmática e da PAS dos animais do grupo HL quando comparados ao grupo C. O óleo de capivara em sua formulação livre (OCL) atenuou apenas os parâmetros relacionados a PA nos animais HL, enquanto a formulação nanoemulsionada (OCN) foi capaz de atenuar todos os parâmetros citados anteriormente, e isso pode estar relacionado ao efeito que a nanotecnologia farmacêutica pode causar no composto.

O aumento do colesterol no sangue é uma comorbidade comum acarretada pela obesidade (Must et al., 1999). Sabe-se bem que a administração de uma dieta hiperlipídica é capaz de alterar o perfil lipídico sérico com maior concentração não só de colesterol total, mas também de TGs, LDL, VLDL e menor concentração de HDL (LI et al., 2020; FEINGOLD, 2020). Nós avaliamos os níveis séricos dos camundongos para avaliação do perfil lipídico e observamos que os níveis de colesterol total, TGs, LDL e VLDL, aumentaram significativamente no grupo HL quando comparado ao grupo C. Feingold, 2020, relaciona o aumento de TGs no sangue ao aumento da produção de partículas de VLDL hepático e à diminuição da depuração de lipoproteínas ricas em TGs. Já os níveis de LDL estão frequentemente na faixa normal, mas na obesidade, há um aumento no LDL pequeno e denso, resultando no aumento dos números dessas partículas. As partículas pequenas e densas de LDL têm uma afinidade diminuída com seu receptor, o que resulta no período prolongado do tempo de sua circulação no sangue (BAYS et al., 2013; XIAO et al., 2016; FEINGOLD, 2020).

Um outro parâmetro bioquímico avaliado, foram os níveis de ALT e AST, enzimas localizadas principalmente nas células hepáticas e que são responsáveis pela catalisação e transferência de aminoácidos entre aminoácidos e cetoácidos. Quando um hepatócito se lesiona, sua membrana plasmática vai ter sua permeabilidade aumentada, e ocorrerá a liberação de AST e ALT no sangue, tornando essas enzimas importantes marcadores bioquímicos para a avaliação da função hepática (CAO et al., 2015; XU et al., 2018). São cinco os principais preditores de DHGNA e lesão hepática, entre eles encontramos os níveis de ALT e AST, e um estudo classificou que dentre as duas enzimas, a AST apresentou as melhores propriedades preditivas

para essas comorbidades (ABDELMALEK, 2021). No nosso trabalho pudemos observar que os níveis de AST aumentaram significativamente no grupo HF comparado ao grupo C, no entanto os níveis de ALT não apresentaram diferença.

Poucos estudos avaliam a correlação do óleo de capivara com uma dieta rica em colesterol (FUKUSHIMA, et al., 1997; MARINHO, et al., 2018), porém, até o momento, observou-se uma correlação positiva dos níveis de colesterol e suas frações com o tratamento, assim como os níveis de TGs (FUKUSHIMA, et al., 1997), dados que corroboram com o presente estudo, no qual vimos que nos grupos HF, o tratamento com o óleo livre foi capaz de diminuir esses níveis em todos os parâmetros, exceto nos níveis de TGs, enquanto a nanoemulsão conseguiu diminuir em todos. Em relação às enzimas hepáticas, tanto o tratamento OCL, quanto o tratamento OCN, diminuíram significativamente os níveis da AST nos animais HL. Estudos apontam que suplementação com óleo de peixe é capaz de diminuir tanto níveis de ALT quanto de AST em animais com DHGNA (KUO et al., 2012; ZHANG et al., 2017), e apenas um estudo observou a análise dessas enzimas com o óleo de capivara, no qual obteve-se uma correlação positiva do tratamento com a redução da ALT, mas não apresentou resultados significativos em relação a AST (MARINHO, et al., 2018).

Na análise histológica, o grupo HL mostrou uma esteatose macro e micro vesicular mais intensa que no grupo C. Dados que corroboram com a literatura, visto que diversos estudos já mostraram que existe uma correlação entre obesidade e esteatose hepática (POLYZOS; KOUNTOURAS; MANTZOROS, 2019). De forma geral, a esteatose hepática ocorre devido a um desequilíbrio da absorção, produção e exportação de AGs no fígado. Os AGs livres podem ser derivados da dieta, da lipogênese *de novo* no fígado e da lipólise do tecido adiposo (OOI et al., 2021) e a interrupção de uma ou mais das vias ligadas de regulação da função hepática pode gerar a retenção de gordura intra-hepática causando esteatose e consequentemente DHGNA (BECHMANN et al., 2012; NGUYEN et al., 2008). O fígado possui transportadores de AGs em sua membrana que serão responsáveis por facilitar o transporte desses ácidos para diferentes compartimentos celulares dentro do citoplasma; concomitantemente a lipogênese *de novo* vai converter aceti-CoA em novos AGs que podem ser esterificados e armazenados como TGs; outro processo que ocorre é a oxidação de AGs, responsável por reduzir os níveis intra-hepáticos de gordura, processo que ocorre principalmente na mitocôndria. No entanto, qualquer sobrecarga lipídica e/ou uma disfunção mitocondrial vão resultar num acúmulo de uma ampla variedade de espécies lipídicas consequentemente afetarão as funções celulares (OOI et al., 2021; IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018).

A apoptose é um processo natural que ocorre durante toda a vida do indivíduo, desde o nascimento até o envelhecimento, é um mecanismo homeostático responsável por manter as populações celulares nos tecidos. No entanto, ela também pode ocorrer como um mecanismo de defesa, como em reações imunes ou quando as células são danificadas por doenças ou agentes nocivos; estando geralmente ligada com diversas patologias, incluindo a obesidade, e sendo caracterizada pela fragmentação nuclear, formação de corpos apoptóticos e encolhimento celular (TANG et al., 2019; NORBURY; HICKSON, 2001). É mediada por uma cascata de sinalização intracelular que envolve uma variedade de moléculas incluindo caspases, proteínas adaptadoras, proteínas da família Bcl-2 e proteínas inibidoras de apoptose (MUÑOZ-PINEDO, 2012). Até o momento, cerca de 25 genes foram identificados na família Bcl-2, entre eles a proteína anti-apoptótica Bcl-2 e a proteína pró-apoptótica Bax. Essas proteínas são essenciais por serem capazes de determinar se a célula se compromete com a apoptose ou aborta o processo (ELMORE, 2007). Existem duas vias envolvidas no processo apoptótico, (i) a via extrínseca - mediada por receptor - e (ii) a via intrínseca - também conhecida como via mitocondrial, que leva a liberação de Citocromo c - (DE MELLO et al., 2018). Em nossos achados, comparados o grupo HL e o grupo C, podemos observar que na imunomarcagem para Bax e Bcl-2 um aumento significativo dos níveis de Bax e da razão Bax/Bcl-2 no grupo HL e uma diminuição dos níveis de Bcl-2 nesse mesmo grupo, indicando uma possível ativação da via apoptótica desses animais.

Acredita-se que o principal mecanismo de ação da família de proteínas Bcl-2 seja a regulação da liberação do Citocromo c das mitocôndrias através da permeabilidade da membrana mitocondrial (ELMORE, 2007). O Citocromo C é uma proteína capaz de exercer uma variedade de funções, dependendo de sua localização celular e das condições em que opera, permitindo identificá-lo como uma proteína “extrema multifuncional” (SANTUCCI et al., 2019). É uma molécula de decisão de vida e morte celular, por ser capaz de regular o fornecimento de energia celular e a apoptose através de modificações pós-traducionais específicas do tecido. A via intrínseca, do processo apoptótico, vai gerar uma permeabilidade da membrana mitocondrial externa consequentemente liberando diversas proteínas para o citoplasma - como o Citocromo c - assim podendo ativar as caspases que têm como uma de suas funções a clivagem de substratos cruciais para induzir o desmantelamento das células (SANTUCCI et al., 2019; KALPAGE et al., 2020). Diversos estudos apontam que dietas ocidentais, geralmente com alta ingestão calórica, são capazes de gerar uma disfunção mitocondrial e aumentar a susceptibilidade da célula à apoptose (HERNÁNDEZ-AGUILERA et al.; 2013; PINTUS; FLORIS; RUFINI, 2012). Em nosso estudo não observamos diferença

significativa dos níveis de Citocromo c entre o grupo C e o grupo HL, no entanto na MET podemos observar que as mitocôndrias do grupo HL estão com sua ultraestrutura comprometida.

Alterações no metabolismo lipídico estão relacionadas com o processo de desenvolvimento da DHGNA e sua progressão, afetando organelas como a mitocôndria e o RE (CHEN et al., 2020). MARINHO et al., 2018, já mostrou que uma dieta hiperlipídica é capaz de gerar um comprometimento da ultraestrutura mitocondrial e uma desorganização na citoarquitetura. Dados que corroboram com nosso trabalho, no qual pudemos observar não só a perda da integridade da membrana mitocondrial e uma citoarquitetura mais desorganização, mas também o RE com cisternas bem dilatadas, indicando um comprometimento da função desses hepatócitos.

No presente estudo, o óleo de capivara livre (5000 mg/Kg/dia) foi capaz de reverter o grau de esteatose, melhorar a ultraestrutura, aumentar os níveis de Bcl-2 e diminuir a razão Bax/Bcl-2 nos animais do grupo HL enquanto a nanoemulsão foi capaz além de reverter o grau esteatótico e melhorar a ultraestrutura, também diminuiu os níveis de Bax e da razão Bax/Bcl-2. No entanto, ambos os tratamentos aumentaram significativamente a expressão de Citocromo c no grupo HL.

Na literatura, o tratamento com PUFA's já é apontado como eficaz para melhorar as alterações histopatológicas em fígados de ratos, causando uma diminuição do acúmulo de lípidios hepáticos (CHIU et al., 2018; AL-OKBI et al., 2018), e um estudo publicado pelo nosso grupo já mostrou a eficácia do óleo de capivara na melhoria da esteatose (MARINHO et al., 2018), dados que corroboram com os nossos achados. Outro achado de MARINHO et al., 2018, diz respeito à ultraestrutura dos animais com dieta hiperlipídica, no qual o estudo observou que o óleo de capivara recuperou a integridade mitocondrial e uma melhora na organização da citoarquitetura, corroborando com os nossos achados onde tanto o tratamento OCL quanto o tratamento OCN foram capazes de reverter as alterações causadas na ultraestrutura dos animais com dieta hiperlipídica. Em relação aos níveis Bax, KALOGEROU et al., 2022, mostrou uma diminuição da expressão de Bax em camundongos com atrofia óptica após o tratamento com ômega-3, sugerindo uma desativação da via de apoptose. Um outro estudo sugeriu que o tratamento com ômega-3 apresentou efeitos anti-apoptóticos na mucosa intestinal de ratos, com o aumento dos níveis de Bcl-2 mesmo sem alterações nos níveis de Bax (KOPPELMANN et al., 2021). Dados que sugerem que a administração de tratamentos ricos em ômega-3 apresenta relação positiva com a diminuição da ativação da via apoptótica, diminuindo Bax e aumentando Bcl-2. Logo, a utilização do óleo de capivara (rico em ômega-3) poderia ser uma boa alternativa,

assim como ocorreu no nosso estudo com a administração do tratamento com OCL e OCN no grupo HL.

Quando avaliada a expressão de Citocromo C, esperava-se que ela acompanhasse os resultados de Bax, no entanto, no grupo HL, notamos que a administração do tratamento causou um aumento da expressão dessa proteína. Não se sabe ao certo o motivo da elevação dos níveis de Citocromo c, porém, por ser uma proteína “extrema multifuncional” pode apresentar diversas funções completamente diferentes (VLADIMIROV; PROSKURNINA; ALEKSEEV, 2013). SANTUCCI et al., 2019, em seu trabalho diz que o Citocromo c pode participar como um agente antioxidante eficaz dentro das células, logo, sugiro que o tratamento com PUFA's pode estar conferindo propriedades antioxidantes a essa proteína.

O tratamento com OCL apresentou resultados positivos e benéficos para os animais obesos, porém, no grupo controle, esse tratamento causou alterações histopatológicas similares às encontradas nos animais que ingeriram a dieta hiperlipídica. Alguns estudos já falam que diferentes proporções de ômega-6/ômega-3 podem gerar diferentes reações no organismo. GÓMEZ-LECHÓN et al., 2007, relacionou uma alta proporção de ácido palmítico com o aumento da probabilidade de um modelo celular de esteatose em que os AG livres saturados promovem um efeito nocivo agudo de superacumulação de gordura no fígado. No entanto, no grupo HL temos as mesmas proporções presentes na suplementação do grupo controle. Um artigo de revisão avaliou as evidências científicas para uma ingestão equilibrada de ômega-6/ômega-3, focando nos aspectos evolutivos da dieta, nas funções biológicas e metabólicas e nas implicações para a saúde (SIMOPOULOS, 2002). Neste, diversas proporções desses ômegas apresentaram efeitos benéficos no tratamento de pacientes com diversas patologias, entretanto, um estudo com pacientes asmáticos, a proporção 10/1 (maior concentração de ômega-6) apresentou consequências adversas. SIMOPOULOS, conclui falando que a proporção ideal desses ômegas pode variar com a doença considerada, visto que, as doenças crônicas são multigênicas e multifatoriais, e que a dose terapêutica depende do grau de gravidade da doença resultante. Logo, a dosagem administrada no grupo C + OCL não seria a mais indicada, já que o animal controle não apresenta nenhuma patologia.

Nossos dados apontam que as duas formulações contendo óleo de capivara apresentam resultados eficazes no tratamento da obesidade e DHGNA, podendo ser promissoras para o tratamento em humanos.

CONCLUSÃO

Com base nas informações apresentadas, a nanoemulsão foi mais eficaz no tratamento das alterações metabólicas causadas pela obesidade do que a formulação de óleo de capivara livre a 5000 mg/kg/dia, visto que OCL reverteu apenas a PA e a bioquímica plasmática, enquanto OCN apresentou efeito positivo em todos os parâmetros analisados. Nossos achados indicam que tanto o óleo livre (OCL), quanto a nanoemulsão (OCN), possuem efeitos na histopatologia do fígado, melhorando a esteatose hepática e diminuindo a ativação da via apoptótica, além de ser capaz de restaurar a ultraestrutura dos hepatócitos de animais obesos.

Esses achados são relevantes e sugerem que, as duas formulações farmacêuticas, tem um grande potencial para o desenvolvimento de novas terapias translacionais em humanos para o tratamento da obesidade e da DHGNA.

REFERÊNCIAS

ABDELMALEK, Manal F. Nonalcoholic fatty liver disease: another leap forward. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 85–86, 2021. DOI: 10.1038/s41575-020-00406-0.

AGUILA, Márcia Barbosa; PINHEIRO, Alessandra da Rocha; PARENTE, Lyana Barbosa; MANDARIM-DE-LACERDA, Carlos Alberto. Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology. *Liver International*, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 363–370, 2003. DOI: 10.1034/j.1478-3231.2003.00858.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1478-3231.2003.00858.x>.

ALBRACHT-SCHULTE, Kembra; KALUPAHANA, Nishan Sudheera; RAMALINGAM, Latha; WANG, Shu; RAHMAN, Shaikh Mizanoor; ROBERT-MCCOMB, Jacalyn; MOUSTAID-MOUSSA, Naima. Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: a mechanistic update. *Journal of Nutritional Biochemistry*, [S. l.], v. 58, n. 2017, p. 1–16, 2018. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2018.02.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.012>.

AL-OKBI, S. Y., EL-QOUSY, S. M., EL-GHLBAN, S., & MOAWAD, H. F. (2018). Role of Borage Seed Oil and Fish Oil with or without Turmeric and Alpha- Tocopherol in Prevention of Cardiovascular Disease and Fatty Liver in Rats. *Journal of Oleo Science*. doi:10.5650/jos.ess18064

ANGULO, Paul. Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrition Reviews*, [S. l.], v. 65, n. 6, p. S57–S63, 2007. DOI: 10.1301/nr.2007.jun.S57–S63.

AYDOS, Leonardo Recena; AMARAL, Luane Aparecida Do; SOUZA, Roberta Serafim De; JACOBOWSKI, Ana Cristina; SANTOS, Elisvânia Freitas Dos; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. Nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in C57BL/6 models. *Nutrients*, [S. l.], v. 11, n. 12, p. 1–12, 2019. DOI: 10.3390/nu11123067.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 238–252, 1965. DOI: 10.1016/S0022-2836(65)80093-6. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6).

BAYS, Harold E. et al. Obesity, adiposity, and dyslipidemia: A consensus statement from the National Lipid Association. *Journal of Clinical Lipidology*, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 304–383, 2013. DOI: 10.1016/j.jacl.2013.04.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacl.2013.04.001>.

BECHMANN, Lars P.; HANNIVOORT, Rebekka A.; GERKEN, Guido; HOTAMISLIGIL, Gökhan S.; TRAUNER, Michael; CANBAY, Ali. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of Hepatology*, [S. l.], v. 56, n. 4, p. 952–964, 2012. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.08.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2011.08.025>.

BORSONELO, E. C.; GALDURÓZ, J. C. F. The role of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in development, aging and substance abuse disorders: Review and propositions. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, [S. l.], v. 78, n. 4–5, p. 237–245, 2008. DOI: 10.1016/j.plefa.2008.03.005.

BUZZETTI, Elena; PINZANI, Massimo; TSOCHATZIS, Emmanuel A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*, [S. l.], v. 65, n. 8, p. 1038–1048, 2016. DOI: 10.1016/j.metabol.2015.12.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>.

CALDER, Philip C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: From molecules to man. *Biochemical Society Transactions*, [S. l.], v. 45, n. 5, p. 1105–1115, 2017. DOI: 10.1042/BST20160474.

CAO, Yi Wei; JIANG, Yun; ZHANG, Da Yong; WANG, Meng; CHEN, Wan Sheng; SU, Huanxing; WANG, Yi Tao; WAN, Jian Bo. Protective effects of *Penthorum chinense* Pursh against chronic ethanol-induced liver injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, [S. l.], v. 161, p. 92–98, 2015. DOI: 10.1016/j.jep.2014.12.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.013>.

CHEN, Bing Huei; INBARAJ, Baskaran Stephen. Nanoemulsion and nanoliposome based strategies for improving anthocyanin stability and bioavailability. *Nutrients*, [S. l.], v. 11, n. 5, 2019. DOI: 10.3390/nu11051052.

CHEN, Ze; TIAN, Ruifeng; SHE, Zhigang; CAI, Jingjing; LI, Hongliang. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*, [S. l.], v. 152, n. September 2019, p. 116–141, 2020. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025>.

CHIANESE, Rosanna et al. Impact of Dietary Fats on Brain Functions. *Current Neuropharmacology*, [S. l.], v. 16, n. 7, p. 1059–1085, 2017. DOI: 10.2174/1570159x15666171017102547.

CHIU, C.-Y., WANG, L.-P., LIU, S.-H., & CHIANG, M.-T. (2018). Fish Oil Supplementation Alleviates the Altered Lipid Homeostasis in Blood, Liver, and Adipose Tissues in High-Fat Diet-Fed Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(16), 4118–4128. doi:10.1021/acs.jafc.8b00529

COUVREUR, Patrick; BARRATT, Gillian; FATTAL, Elias; VAUTHIER, Christine. Nanocapsule Technology: A Review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, [S. l.], v. 19, n. 2, p. 99–134, 2002. DOI: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v19.i2.10. Disponível em: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/3667c4ae6e8fd136,13237f906e958e8d,12624a520b8f6730.html>.

COUVREUR, Patrick; VAUTHIER, Christine. Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. [s.l: s.n.]. v. 23 DOI: 10.1007/s11095-006-0284-8.

D'ALMEIDA, Ana Paula et al. α -bisabolol-loaded lipid-core nanocapsules reduce lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in mice. *International Journal of Nanomedicine*, [S. l.], v. Volume 12, n. 12, p. 4479–4491, 2017. DOI: 10.2147/IJN.S130798.

Disponível em: <https://www.dovepress.com/alpha-bisabolol-loaded-lipid-core-nanocapsules-reduce-lipoplysacchari-peer-reviewed-article-IJN>.

DE ALMEIDA, Cecília de Fátima castello Branco Rangel; DE ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): um estudo de caso. *Journal ArticleSR Electronic*, [S. l.], v. 27, n. 6, p. 276–285, 2002.

De Mello, A. H., Costa, A. B., Engel, J. D. G., & Rezin, G. T. (2018). Mitochondrial dysfunction in obesity. *Life Sciences*, 192, 26–32. doi:10.1016/j.lfs.2017.11.019

DONNELLY, Kerry L.; SMITH, Coleman I.; SCHWARZENBERG, Sarah J.; JESSURUN, Jose; BOLDT, Mark D.; PARKS, Elizabeth J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation*, [S. l.], v. 115, n. 5, p. 1343–1351, 2005. DOI: 10.1172/JCI23621. Disponível em: <http://www.jci.org/articles/view/23621>.

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

ENDALIFER, Melese Linger; DIRESS, Gedefaw. Epidemiology, Predisposing Factors, Biomarkers, and Prevention Mechanism of Obesity: A Systematic Review. *Journal of Obesity*, [S. l.], v. 2020, p. 1–8, 2020. DOI: 10.1155/2020/6134362. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7281819/pdf/JOBE2020-6134362.pdf>.

ERICKSON, Sandra K. Nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Lipid Research*, [S. l.], v. 50, n. SUPPL., p. 412–416, 2009. DOI: 10.1194/jlr.R800089-JLR200.

FAROKHZAD, Omid C.; LANGER, Robert. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano*, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 16–20, 2009. DOI: 10.1021/nn900002m. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089609001953>.

FEDERICO, Paula; CANZIANI, Graciela Ana. Modeling the population dynamics of capybara *Hydrochaeris hydrochaeris*: A first step towards a management plan. *Ecological Modelling*, [S. l.], v. 186, n. 1 SPEC. ISS., p. 111–121, 2005. DOI: 10.1016/j.ecolmodel.2005.01.011.

Feingold KR. Obesity and Dyslipidemia. [Updated 2020 Nov 2]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305895/>

FERRARI, Mauro. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 161–171, 2005. DOI: 10.1038/nrc1566.

FLACHS, Pavel; ROSSMEISL, Martin; BRYHN, Morten; KOPECKY, Jan. Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. *Clinical Science*, [S. l.], v. 116, n. 1, p. 1–16, 2009. DOI: 10.1042/CS20070456. Disponível em: <https://portlandpress.com/clinsci/article/116/1/1/68608/Cellular-and-molecular-effects-of-n-3>.

FORBES, J. M.; COWAN, S.P.; ANDRIKOPOULOS, S. et al. Glucose homeostasis can be differentially modulated by varying individual components of a western diet. *J Nutr Biochem*, v. 24, p. 1251–1257 2013.

FRAULOB, J. C.; SOUZA-MELLO, V.; AGUILA, M. B.; et al. Beneficial effects of rosuvastatin on insulin resistance, adiposity, inflammatory markers and non-alcoholic fatty liver disease in mice fed on a high-fat diet, *Clinical Science*, v. 123, p. 259–270, 2012.

FRIEDMAN, Scott L.; NEUSCHWANDER-TETRI, Brent A.; RINELLA, Mary; SANYAL, Arun J. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nature Medicine*, [S. l.], v. 24, n. 7, p. 908–922, 2018. DOI: 10.1038/s41591-018-0104-9. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41591-018-0104-9>.

FUKUSHIMA, Michihiro; TAKAYAMA, Yasuyoshi; HABAGUCHI, Tsuyoshi; NAKANO, Masuo. Comparative hypocholesterolemic effects of capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris dabbenei*) oil, horse oil, and sardine oil in cholesterol-fed rats. *Lipids*, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 391–395, 1997. DOI: 10.1007/s11745-997-0050-z.

GART, Eveline et al. Krill oil treatment increases distinct pufas and oxylipins in adipose tissue and liver and attenuates obesity-associated inflammation via direct and indirect mechanisms. *Nutrients*, [S. l.], v. 13, n. 8, 2021. DOI: 10.3390/nu13082836.

GARVEY, W. Timothy; MECHANICK, Jeffrey I. Proposal for a Scientifically Correct and Medically Actionable Disease Classification System (ICD) for Obesity. *Obesity*, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 484–492, 2020. DOI: 10.1002/oby.22727. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.22727>.

GIRARDI, Fernanda; CARDOZO, Rejane M.; DE SOUZA, Vera L. F.; DE MORAES, Gentil V.; DOS SANTOS, Clovis R.; VISENTAINER, Jesui V.; ZARA, Ricardo F.; DE SOUZA, Nilson E. Proximate composition and fatty acid profile of semi confined young capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris hydrochaeris* L. 1766) meat. *Journal of Food Composition and Analysis*, [S. l.], v. 18, n. 7, p. 647–654, 2005. DOI: 10.1016/j.jfca.2004.06.004.

Gómez-Lechón, M. J., Donato, M. T., Martínez-Romero, A., Jiménez, N., Castell, J. V., & O'Connor, J.-E. (2007). A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chemico-Biological Interactions*, 165(2), 106–116. doi:10.1016/j.cbi.2006.11.004

GÓMEZ-LECHÓN, María José; DONATO, María Teresa; MARTÍNEZ-ROMERO, Alicia; JIMÉNEZ, Nuria; CASTELL, José Vicente; O'CONNOR, José Enrique. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chemico-Biological Interactions*, [S. l.], v. 165, n. 2, p. 106–116, 2007. DOI: 10.1016/j.cbi.2006.11.004.

HARRISON, Stephen A.; TORGERSON, Sigurd; HAYASHI, Paul H. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a clinical histopathological study. *The American Journal of Gastroenterology*, [S. l.], v. 98, n. 9, p. 2042–2047, 2003. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2003.07659.x. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1111/j.1572-0241.2003.07659.x>.

Hernández-Aguilera A, Rull A, Rodríguez-Gallego E et al (2013) Mitochondrial dysfunction: a basic mechanism in inflammation-related non-communicable diseases and therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm* 2013:135698

HOET, Peter H. M.; BRÜSKE-HOHLFELD, Irene; SALATA, Oleg V. Nanoparticles - Known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology*, [S. l.], v. 2, p. 1–15, 2004. DOI: 10.1186/1477-3155-2-12.

HØJLAND IPSEN, David; TVEDEN-NYBORG, Pernille; LYKKESFELDT, Jens. Normal weight dyslipidemia: Is it all about the liver? *Obesity*, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 556–567, 2016. DOI: 10.1002/oby.21443.

HURR, Chansol; SIMONYAN, Hayk; MORGAN, Donald A.; RAHMOUNI, Kamal; YOUNG, Colin N. Liver sympathetic denervation reverses obesity-induced hepatic steatosis. *The Journal of Physiology*, [S. l.], v. 597, n. 17, p. 4565–4580, 2019. DOI: 10.1113/JP277994. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/JP277994>.

IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde 2019: informações sobre domicílios, acesso e utilização dos serviços de saúde. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv91110.pdf>.

IDILMAN, Ilkay S.; OZDENIZ, Ilknur; KARCAALTINCABA, Musturay. Hepatic Steatosis: Etiology, Patterns, and Quantification. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, [S. l.], v. 37, n. 6, p. 501–510, 2016. DOI: 10.1053/j.sult.2016.08.003.

IPSEN, David H.; TVEDEN-NYBORG, Pernille; LYKKESFELDT, Jens. Dyslipidemia: Obese or Not Obese-That Is Not the Question. *Current obesity reports*, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 405–412, 2016. DOI: 10.1007/s13679-016-0232-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13679-016-0232-9>.

IPSEN, David Højland; LYKKESFELDT, Jens; TVEDEN-NYBORG, Pernille. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, [S. l.], v. 75, n. 18, p. 3313–3327, 2018. DOI: 10.1007/s00018-018-2860-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2860-6>.

IZAOLA, Olatz; DE LUIS, Daniel; SAJOUX, Ignacio; DOMINGO, Joan Carles; VIDAL, Montserrat. Inflamación y obesidad (Lipoinflamación). *Nutricion Hospitalaria*, [S. l.], v. 31, n. 6, p. 2352–2358, 2015. DOI: 10.3305/nh.2015.31.6.8829.

JEROMSON, Stewart; GALLAGHER, Iain J.; GALLOWAY, Stuart D. R.; HAMILTON, D. Lee. Omega-3 fatty acids and skeletal muscle health. *Marine Drugs*, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 6977–7004, 2015. DOI: 10.3390/md13116977.

JUMP, Donald B.; DEPNER, Christopher M.; TRIPATHY, Sasmita; LYTLE, Kelli A. Impact of dietary fat on the development of non-alcoholic fatty liver disease in Ldlr^{-/-} mice. *Proceedings of the Nutrition Society*, [S. l.], v. 75, n. 1, p. 1–9, 2016. DOI: 10.1017/S002966511500244X.

JUNQUEIRA, LUIZ CARLOS, U. E JOSÉ CARNEIRO. *Histologia Básica - Texto e Atlas* (13th edição). Grupo GEN, 2017.

KALPAGE, Hasini A. et al. Cytochrome c phosphorylation: Control of mitochondrial electron transport chain flux and apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, [S. l.], v. 121, p. 105704, 2020. DOI: 10.1016/j.biocel.2020.105704. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272520300212>.

KAPOOR, Bharat; KAPOOR, Dhriti; GAUTAM, Shristy; SINGH, Rahul; BHARDWAJ, Savita. Dietary Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs): Uses and Potential Health Benefits. *Current Nutrition Reports*, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 232–242, 2021. DOI: 10.1007/s13668-021-00363-3.

KAWANO, Y., COHEN, D. E. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in nonalcoholic fatty liver disease, *J Gastroenterol*, v. 48, p. 434–441, 2013.

Koppelmann T, Pollak Y, Ben-Shahar Y, Gorelik G, Sukhotnik I. The Mechanisms of the Anti-Inflammatory and Anti-Apoptotic Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids during Methotrexate-Induced Intestinal Damage in Cell Line and in a Rat Model. *Nutrients*. 2021;13(3):888. Published 2021 Mar 10. doi:10.3390/nu13030888

Kuo JJ, Chang HH, Tsai T, Lee TY. Positive effect of curcumin on inflammation and mitochondrial dysfunction in obese mice with liver steatosis. *International Journal of Molecular Medicine* 2012; 30:673-679.

LAZZA, Chiara; PAGANO, Cristina; NAVARRA, Giovanna; PASTORINO, Olga; PROTO, Maria Chiara; FIORE, Donatella; PISCOPO, Chiara; GAZZERRO, Patrizia; BIFULCO, Maurizio. The endocannabinoid system: A target for cancer treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, [S. l.], v. 21, n. 3, 2020. DOI: 10.3390/ijms21030747.

LANDSBERG, Lewis; ARONNE, Louis J.; BEILIN, Lawrence J.; BURKE, Valerie; IGEL, Leon I.; LLOYD-JONES, Donald; SOWERS, James. Obesity-Related Hypertension: Pathogenesis, Cardiovascular Risk, and Treatment: A Position Paper of The Obesity Society and the American Society of Hypertension Landsberg et al. *Obesity Related Hypertension*. *Journal of Clinical Hypertension*, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 14–33, 2013. DOI: 10.1111/jch.12049.

LANZA, I, R.; BLACHNIO-ZABIELSKA, A.; JOHNSON, M. L.; et al. Influence of fish oil on skeletal muscle mitochondrial energetics and lipid metabolites during high-fat diet, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 304, p. E1391–E1403, 2013.

LAU, Jennie Ka Ching; ZHANG, Xiang; YU, Jun. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *The Journal of Pathology*, [S. l.], v. 241, n. 1, p. 36–44, 2017. DOI: 10.1002/path.4829. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.4829>.

LENGERT, Ekaterina V.; TALNIKOVA, Ekaterina E.; TUCHIN, Valery V.; SVENSKAYA, Yulia I. Prospective Nanotechnology-Based Strategies for Enhanced Intra- And Transdermal Delivery of Antifungal Drugs. *Skin Pharmacology and Physiology*, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 261–269, 2020. DOI: 10.1159/000511038.

LI, Junjun; PANG, Bing; SHAO, Dongyan; JIANG, Chunmei; HU, Xinzhong; SHI, Junling. Artemisia sphaerocephala Krasch polysaccharide mediates lipid metabolism and metabolic endotoxaemia in associated with the modulation of gut microbiota in diet-induced obese mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, [S. l.], v. 147, p. 1008–1017, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.069. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.069>.

LIANGPUNSAKUL, S., & CHALASANI, N. (2019). Lipid mediators of liver injury in nonalcoholic fatty liver disease. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 316(1), G75–G81. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00170.2018>

LIN, Xihua; LI, Hong. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Frontiers in Endocrinology*, [S. l.], v. 12, n. September, p. 1–9, 2021. DOI: 10.3389/fendo.2021.706978.

LIONG, Monty; LU, Jie; KOVOCHICH, Michael; XIA, Tian; RUEHM, Stefan G.; NEL, Andre E.; TAMANOI, Fuyuhiko; ZINK, Jeffrey I. Multifunctional Inorganic Nanoparticles for Imaging, Targeting, and Drug Delivery. *ACS Nano*, [S. l.], v. 2, n. 5, p. 889–896, 2008. DOI: 10.1021/nn800072t. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nn800072t>.

MACHADO, Mariana Verdelho; CORTEZ-PINTO, Helena. Diet, microbiota, obesity, and NAFLD: A dangerous quartet. *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 2016. DOI: 10.3390/ijms17040481. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27043550/>. Acesso em: 26 abr. 2021.

MACIEJEWSKA, Dominika et al. Diet-induced rat model of gradual development of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) with Lipopolysaccharides (LPS) secretion. *Diagnostics*, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 1–10, 2019. DOI: 10.3390/diagnostics9040205.

MACMAHON, S. et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: Collaborative analyses of 57 prospective studies. *The Lancet*, [S. l.], v. 373, n. 9669, p. 1083–1096, 2009. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60318-4. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60318-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60318-4).

MAGKOS, Faidon; MANTZOROS, Christos S. Body fat redistribution and metabolic abnormalities in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy: novel insights into pathophysiology and emerging opportunities for treatment. *Metabolism*, [S. l.], v. 60, n. 6, p. 749–753, 2011. DOI: 10.1016/j.metabol.2010.09.011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049510003355>.

Maria Kalogerou, Sotiris Ioannou, Panagiotis Kolovos, Ekatherine Prokopiou, Louiza Potamiti, Kyriacos Kyriacou, Michail Panagiotidis, Maria Ioannou, Eleni Fella, Elena Panayiotou Worth, Tassos Georgiou. Omega-3 fatty acids promote neuroprotection, decreased apoptosis and reduced glial cell activation in the retina of a mouse model of OPA1-related autosomal dominant optic atrophy. *Experimental Eye Research*, Volume 215, 2022, 108901, ISSN 0014-4835. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108901>.

Marinho, P. C., Vieira, A. B., Pereira, P. G., Rabelo, K., Ciambarella, B. T., Nascimento, A. L. R., ... de Carvalho, J. J. (2018). Capybara Oil Improves Hepatic Mitochondrial Dysfunction, Steatosis, and Inflammation in a Murine Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1–9. doi:10.1155/2018/4956079

MARINHO, Polyana Cury; NETO-FERREIRA, Rodrigo; JOSÉ DE CARVALHO, Jorge. Evaluation of therapeutic intervention with a natural product in Cutaneous wound healing: The use of capybara oil. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, [S. l.], v. 2013, 2013. DOI: 10.1155/2013/217198.

MARRA, Fabio; SVEGLIATI-BARONI, Gianluca. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *Journal of Hepatology*, [S. l.], v. 68, n. 2, p. 280–295, 2018. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.11.014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.11.014>.

MASI, Laureane Nunes; MARTINS, Amanda Roque; NETO, José César Rosa; AMARAL, Cátia Lira Do; CRISMA, Amanda Rabello; VINOLO, Marco Aurélio Ramirez; DE LIMA JÚNIOR, Edson Alves; HIRABARA, Sandro Massao; CURI, Rui. Sunflower Oil Supplementation Has Proinflammatory Effects and Does Not Reverse Insulin Resistance in Obesity Induced by High-Fat Diet in C57BL/6 Mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, [S. l.], v. 2012, p. 1–9, 2012. DOI: 10.1155/2012/945131. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/945131/>.

MATRAVADIA, Sarthak; HERBST, Eric A. F.; JAIN, Swati S.; MUTCH, David M.; HOLLOWAY, Graham P. Both linoleic and α -linolenic acid prevent insulin resistance but have divergent impacts on skeletal muscle mitochondrial bioenergetics in obese Zucker rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, [S. l.], v. 307, n. 1, p. E102–E114, 2014. DOI: 10.1152/ajpendo.00032.2014. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.00032.2014>.

MECHANICK, Jeffrey I.; HURLEY, Daniel L.; GARVEY, W. Timothy. Adiposity-based chronic disease as a new diagnostic term: The American association of clinical endocrinologists and American college of endocrinology position statement. *Endocrine Practice*, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 372–378, 2017. DOI: 10.4158/EP161688.PS.

MEHTA, Kapil; VAN THIEL, David H.; SHAH, Nikunj; MOBARHAN, Sohrab. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and the Role of Antioxidants. *Nutrition Reviews*, [S. l.], v. 60, n. 9, p. 289–293, 2002. DOI: 10.1301/002966402320387224. Disponível em: <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article/60/9/289/1891680>.

MOLFINO, Alessio; AMABILE, Maria Ida; MONTI, Massimo; MUSCARITOLI, Maurizio. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Critical Illness: Anti-Inflammatory, Proresolving, or Both? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, [S. l.], v. 2017, p. 1–6, 2017. DOI: 10.1155/2017/5987082.

MUNDI, Manpreet S.; VELAPATI, Saketh; PATEL, Janki; KELLOGG, Todd A.; ABU DAYYEH, Barham K.; HURT, Ryan T. Evolution of NAFLD and Its Management. *Nutrition in Clinical Practice*, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 72–84, 2020. DOI: 10.1002/ncp.10449. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ncp.10449>.

Muñoz-Pinedo (2012) Signaling pathways that regulate life and cell death: evolution of apoptosis in the context of self-defense. *Adv Exp Med Biol* 738:124-143

Must, A., Spadano, J., Coakley, E. H., Field, A. E., Colditz, G., & Dietz, W. H. (1999). The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA*, 282(16), 1523–1529. <https://doi.org/10.1001/jama.282.16.1523>

NGUYEN, P.; LERAY, V.; DIEZ, M.; SERISIER, S.; LE BLOC'H, J.; SILIART, B.; DUMON, H. Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, [S. l.], v. 92, n. 3, p. 272–283, 2008. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x.

Norbury, C. J., & Hickson, I. D. (2001). CELLULARRESPONSES TODNA DAMAGE. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41(1), 367–401. doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.367

Ooi, G. J., Meikle, P. J., Huynh, K., Earnest, A., Roberts, S. K., Kemp, W., ... Watt, M. J. (2021). Hepatic lipidomic remodeling in severe obesity manifests with steatosis and does not evolve with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology*, 75(3), 524–535. doi:10.1016/j.jhep.2021.04.013

ORGANIZATION WH. Obesity and overweight. World Health Organization; 2021 [updated 2021; cited 2022 06/08/2022]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.

PAGOTTO, Uberto; MARSICANO, Giovanni; COTA, Daniela; LUTZ, Beat; PASQUALI, Renato. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocrine Reviews*, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 73–100, 2006. DOI: 10.1210/er.2005-0009.

PANAHI, Yunes; DASHTI-KHAVIDAKI, Simin; FARNOOD, Farahnoosh; NOSHAD, Hamid; LOTFI, Mahsa; GHAREKHANI, Afshin. Therapeutic effects of omega-3 fatty acids on chronic kidney disease-associated pruritus: A literature review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 509–514, 2016. DOI: 10.15171/apb.2016.064.

PAWLINA, W. (2021). *Ross Histologia - Texto e Atlas (8th edição)*. Grupo GEN.

PIERANTONELLI, Irene; SVEGLIATI-BARONI, Gianluca. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Basic Pathogenetic Mechanisms in the Progression from NAFLD to NASH. *Transplantation*, [S. l.], v. 103, n. 1, p. E1–E13, 2019. DOI: 10.1097/TP.0000000000002480.

PINHEIRO, M. S. A criação em sistema semi-intensivo e o manejo sustentável de capivaras na natureza. *Pelotas: Embrapa Clima Temperado (Documentos 232)*, p.1-36, 2008.

PINHEIRO, M. S.; SILVA, J. J. C.; RODRIGUES, R. C. Utilização sustentável e domesticação da capivara. *Pelotas: Embrapa Clima Temperado*, v 31, 86p, 2001.

Pintus F, Floris G, Rufini A (2012) Nutrient availability links mitochondria, apoptosis, and obesity. *Aging (Albany NY)* 4:734-741

POLYZOS, Stergios A.; KOUNTOURAS, Jannis; MANTZOROS, Christos S. Adipose tissue, obesity and non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva Endocrinology*, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 92–108, 2017. DOI: 10.23736/S0391-1977.16.02563-3. Disponível em: <https://www.minervamedica.it/index2.php?show=R07Y2017N02A0092>.

POLYZOS, Stergios A.; KOUNTOURAS, Jannis; MANTZOROS, Christos S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism: Clinical and Experimental*, [S. l.], v. 92, p. 82–97, 2019. DOI: 10.1016/j.metabol.2018.11.014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.014>.

POLYZOS, Stergios A.; KOUNTOURAS, Jannis; ZAVOS, Christos; DERETZI, Georgia. Nonalcoholic fatty liver disease: Multimodal treatment options for a pathogenetically multiple-hit disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*, [S. l.], v. 46, n. 4, p. 272–284, 2012. DOI: 10.1097/MCG.0b013e31824587e0.

POLYZOS, Stergios A.; MANTZOROS, Christos S. Leptin in Health and Disease: Facts and Expectations at its Twentieth Anniversary. *Metabolism*, [S. l.], v. 64, n. 1, p. 5–12, 2015. DOI: 10.1016/j.metabol.2014.10.017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049514003114>.

POTOČNIK J. Recomendação da Comissão de 18 de Outubro de 2011 sobre a definição de nanomaterial. *Jornal Oficial da União Europeia*, [S. l.], n. 2005, p. 2010–2012, 2011.

RICCARDI, G.; GIACCO, R.; RIVELLESE, A. A. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome, *Clin Nutr*, v. 23(4), p. 447-56, 2004.

RIVES, Clémence; FOUGERAT, Anne; ELLERO-SIMATOS, Sandrine; LOISEAU, Nicolas; GUILLOU, Hervé; GAMET-PAYRASTRE, Laurence; WAHLI, Walter. Oxidative Stress in NAFLD: Role of Nutrients and Food Contaminants. *Biomolecules*, [S. l.], v. 10, n. 12, p. 1702, 2020. DOI: 10.3390/biom10121702. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/12/1702>.

ROCCHINI, Albert P.; MARKER, Paul; CERVENKA, Tereza. Time course of insulin resistance associated with feeding dogs a high- fat diet. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, [S. l.], v. 272, n. 1 35-1, 1997. DOI: 10.1152/ajpendo.1997.272.1.e147.

SACKS, Frank M. et al. Comparison of Weight-Loss Diets with Different Compositions of Fat, Protein, and Carbohydrates. *New England Journal of Medicine*, [S. l.], v. 360, n. 9, p. 859–873, 2009. DOI: 10.1056/NEJMoa0804748. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa0804748>.

SANTUCCI, Roberto; SINIBALDI, Federica; COZZA, Paola; POLTICELLI, Fabio; FIORUCCI, Laura. Cytochrome c: An extreme multifunctional protein with a key role in cell fate. *International Journal of Biological Macromolecules*, [S. l.], v. 136, p. 1237–1246, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.180. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.180>.

SERAVALLE, Gino; GRASSI, Guido. Obesity and hypertension. *Pharmacological Research*, [S. l.], v. 122, p. 1–7, 2017. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.05.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.013>.

SHERATT, Samuel C. R.; LERO, Michael; MASON, R. Preston. Are dietary fish oil supplements appropriate for dyslipidemia management? A review of the evidence. *Current opinion in lipidology*, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 94–100, 2020. DOI: 10.1097/MOL.0000000000000665.

SHUKLA, Vijai K. S.; PERKINS, Edward G. The presence of oxidative polymeric materials in encapsulated fish oils. *Lipids*, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 23–26, 1991. DOI: 10.1007/BF02544019.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, [S. l.], v. 56, n. 8, p. 365–379, 2002. DOI: 10.1016/S0753-3322(02)00253-6.

SIMOPOULOS, Artemis P. Omega-6/omega-3 essential fatty acids: biological effects. *World review of nutrition and dietetics*, [S. l.], v. 99, n. 2, p. 1–16, 2009. DOI: 10.1159/000192755.

SIRIWARDHANA, Nalin; KALUPAHANA, Nishan S.; CEKANOVA, Maria; LEMIEUX, Monique; GREER, Betty; MOUSTAID-MOUSSA, Naima. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *Journal of Nutritional Biochemistry*, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 613–623, 2013. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2012.12.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.12.013>.

SVEGLIATI-BARONI, Gianluca; PIERANTONELLI, Irene; TORQUATO, Pierangelo; MARINELLI, Rita; FERRERI, Carla; CHATGILIALOGLU, Chryssostomos; BARTOLINI, Desirée; GALLI, Francesco. Lipidomic biomarkers and mechanisms of lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*, [S. l.], v. 144, n. May, p. 293–309, 2019. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.029. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.029>.

TAKAHASHI, Yoshihisa; SOEJIMA, Yurie; FUKUSATO, Toshio. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/ nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, [S. l.], v. 18, n. 19, p. 2300–2308, 2012. DOI: 10.3748/wjg.v18.i19.2300.

Tang, D., Kang, R., Berghe, T. V., Vandenabeele, P. & Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*, 29, 347-364.

TEERANACHAIDEEKUL, Veerawat; SOUTO, Eliana B.; JUNYAPRASERT, Varaporn B.; MÜLLER, Rainer H. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q10 - Development, physicochemical characterization and in vitro release studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, [S. l.], v. 67, n. 1, p. 141–148, 2007. DOI: 10.1016/j.ejpb.2007.01.015.

TISHINSKY, J. M.; GULLI, R. A.; MULLEN, K. L.; et al. Fish oil prevents high-saturated fat diet-induced impairments in adiponectin and insulin response in rodent soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 302, p. R598–R605, 2012.

TREFTS E, GANNON M, WASSERMAN DH. The liver. *Curr Biol*. 2017;27(21):R1147-R1151. doi:10.1016/j.cub.2017.09.019

TREFTS, Elijah; GANNON, Maureen; WASSERMAN, David H. The liver. *Current Biology*, [S. l.], v. 27, n. 21, p. R1147–R1151, 2017. DOI: 10.1016/j.cub.2017.09.019.

VAN HERCK, Mikhaïl A.; VONGHIA, Luisa; FRANCQUE, Sven M. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease—a starter’s guide. *Nutrients*, [S. l.], v. 9, n. 10, p. 1–13, 2017. DOI: 10.3390/nu9101072.

Vladimirov, Y. A., Proskurnina, E. V., & Alekseev, A. V. (2013). Molecular mechanisms of apoptosis. Structure of cytochrome c-cardiolipin complex. *Biochemistry (Moscow)*, 78(10), 1086–1097. doi:10.1134/s0006297913100027

WAGNER, Volker; DULLAART, Anwyn; BOCK, Anne Katrin; ZWECK, Axel. The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotechnology*, [S. l.], v. 24, n. 10, p. 1211–1217, 2006. DOI: 10.1038/nbt1006-1211.

WANG, Y. Claire; MCPHERSON, Klim; MARSH, Tim; GORTMAKER, Steven L.; BROWN, Martin. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK *The Lancet Elsevier B.V.*, , 2011. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60814-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21872750/>. Acesso em: 26 abr. 2021.

WEST, David B.; YORK, Barbara. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: Lessons from animal models. *American Journal of Clinical Nutrition*, [S. l.], v. 67, n. 3 SUPPL., 1998. DOI: 10.1093/ajcn/67.3.505S.

WHARTON, Sean et al. Obesity in adults: A clinical practice guideline. *Cmaj*, [S. l.], v. 192, n. 31, p. E875–E891, 2020. DOI: 10.1503/cmaj.191707.

WHITE, Pollyanna A. S. et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, [S. l.], v. 57, n. 5, p. 339–345, 2013. DOI: 10.1590/S0004-27302013000500002.

WINZELL, Maria Sörhede; AHRÉN, Bo. The High-Fat Diet–Fed Mouse. *Diabetes*, [S. l.], v. 53, n. suppl_3, p. S215–S219, 2004. DOI: 10.2337/diabetes.53.suppl_3.S215. Disponível em: <http://10.0.3.248/j.jcnc.2005.01.002%0Ahttp://0-search.ebscohost.com.fama.us.es/login.aspx?direct=true&db=edselp&AN=S0883944105000286&lang=es&site=eds-live&scope=site>.

WITZIGMANN, D., KULKARNI, J. A., LEUNG, J., CHEN, S., CULLIS, P. R., & VAN DER MEEL, R. (2020). Lipid nanoparticle technology for therapeutic gene regulation in the liver. *Advanced drug delivery reviews*, 159, 344–363.

XIAO, Changting; DASH, Satya; MORGANTINI, Cecilia; HEGELE, Robert A.; LEWIS, Gary F. Pharmacological targeting of the atherogenic dyslipidemia complex: The next frontier in CVD prevention beyond lowering LDL cholesterol. *Diabetes*, [S. l.], v. 65, n. 7, p. 1767–1778, 2016. DOI: 10.2337/db16-0046.

XU, Lu; YU, Yifan; SANG, Rui; LI, Jinxia; GE, Bingjie; ZHANG, Xuemei. Protective effects of taraxasterol against ethanol-induced liver injury by regulating CYP2E1/Nrf2/HO-1 and NF- κ B signaling pathways in mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, [S. l.], v. 2018, 2018. DOI: 10.1155/2018/8284107.

YAMAZAKI, Tomomi; LI, Dongyang; IKAGA, Reina. Fish oil increases diet-induced thermogenesis in mice. *Marine Drugs*, [S. l.], v. 19, n. 5, 2021. DOI: 10.3390/md19050278.

YOUFA WANG PHD, M. D.; QIONG JOANNA WANG MS, M. D. The Prevalence of Prehypertension and Hypertension Among US Adults According to the New Joint National Committee Guidelines. *Arch Intern Med.*, [S. l.], v. 164, p. 2126–2134, 2004.

YOUNOSSI, Zobair M.; KOENIG, Aaron B.; ABDELATIF, Dinan; FAZEL, Yousef; HENRY, Linda; WYMER, Mark. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, [S. l.], v. 64, n. 1, p. 73–84, 2016. DOI: 10.1002/hep.28431. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.28431>.

YUMUK, Volkan; TSIGOS, Constantine; FRIED, Martin; SCHINDLER, Karin; Busetto, Luca; MICIC, Dragan; TOPLAK, Hermann. European Guidelines for Obesity Management in Adults. *Obesity Facts*, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 402–424, 2015. DOI: 10.1159/000442721.

Zhang, X., H. Wang, P. Yin, H. Fan, L. Sun, and Y. Liu. 2017. Flaxseed oil ameliorates alcoholic liver disease via anti-inflammation and modulating gut microbiota in mice. *Lipids in Health and Disease* 16:44.

ZHANG, Xiaoxia; WANG, Hao; YIN, Peipei; FAN, Hang; SUN, Liwei; LIU, Yujun. Flaxseed oil ameliorates alcoholic liver disease via anti-inflammation and modulating gut microbiota in mice. *Lipids in Health and Disease*, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1186/s12944-017-0431-8.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

ibrag Instituto
de Biologia
Roberto
Alcantara
Gomes

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito de ácidos graxos insaturados sobre a doença renal causada pela obesidade", registrada com o nº 031/2018, sob a responsabilidade de Jorge José de Carvalho - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ, em reunião de 24/05/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	24/05/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	126
Peso/Idade	18 - 20 g / 4 - 6 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 24 de Maio de 2018.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ

ANEXO B – Depósito de patente



12/11/2021 870210104808
12:27
29409161937641413

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 022799 0

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): NANOEMULSÕES DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS PARA O TRATAMENTO DAS DOENÇAS ASSOCIADAS À OBESIDADE, USO E PROCESSO DE OBTENÇÃO

Resumo: A presente invenção se refere a uma nanoemulsão do óleo de capivara de liberação controlada, com alto teor de ômega-3 e maiores estabilidade e biodisponibilidade de fármacos e ao uso para produção de medicamentos para prevenção e tratamento de doenças associadas à obesidade, como doença renal crônica e esteatose hepática não alcoólica. A presente invenção ainda se refere ao processo de obtenção da referida composição farmacêutica.

Figura a publicar: 0

Nome: LUCIANA LONTRO ALVES

CPF: 13539690700

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: AV. ROBERTO SILVEIRA, 251 APTº 801

Cidade: Niterói

Estado: RJ

CEP: 24230-151

País: BRASIL

Telefone: (21) 976 535534

Fax:

Email: lucianalontro@gmail.com

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 12/11/2021 às 12:27, Petição 870210104808