

## INDUÇÃO DE DISLIPIDEMIA EM RATOS WISTAR E COMPARAÇÃO DO TRATAMENTO COM SINVASTATINA E QUERCETINA.

### *DYSLIPIDEMIA INDUCTION IN WISTAR RATS WITH COMPARISON OF TREATMENT WITH SINVASTATIN AND QUERCETIN.*

Rafael Koerich **RAMOS**<sup>1</sup>, Marina Bertuol **MESQUITA**<sup>1</sup>, Mariana Carolina Cunha **MACHOSKI**<sup>1</sup>, Nabil Muhd Khalil **MUSA**<sup>1</sup>, Kárita Cláudia **LIDANI**<sup>2</sup>, Beatriz **ESSENFELDER**<sup>3</sup>, Camila Moraes **MARQUES**<sup>4</sup>, Luiz Fernando **KUBRUSLY**<sup>5</sup>.

Rev. Méd. Paraná/1453

Ramos RK, Mesquita MB, Machoski MCC, Musa NMK, Lidani KC, Essenfelder B, Marques CM, Kubrusly LF. Indução de dislipidemia em ratos Wistar e comparação do tratamento com Sinvastatina e Quercetina. Rev. Méd. Paraná, Curitiba, 2017;75(2):25-33.

**RESUMO** - A Dislipidemia causa diversas doenças cardiovasculares e metabólicas, e as estatinas são seu tratamento padrão. Alternativas para o tratamento têm sido estudadas para reduzir efeitos colaterais. O flavonoide quercetina mostrou um potencial efeito antioxidante e redutor de colesterol. Objetivou-se analisar a diferença entre o tratamento atual com sinvastatina e outro com quercetina. 25 ratos Wistar foram divididos em 5 grupos: G1 com dieta padrão; G2 recebendo dieta hiperlipídica (DH); G3 DH e 10mg/Kg de sinvastatina; G4 DH e 2mg/Kg de quercetina após 10 dias da dieta; G5 DH e 2mg/Kg de quercetina desde o início. Todos foram mantidos por 90 dias até eutanásia, quando coletou-se tecidos e sangue para análise. Encontrou-se uma maior proporção de diabetes (GLI > 6mmol/dl) no G2 quando comparado ao G3 e G5. Além da glicemia, G2 teve maiores valores de triglicérides e do índice TG-HDL, porém não apresentaram diferença significativa entre os demais.

**DESCRITORES** - Dislipidemias, Sinvastatina, Quercetina, Flavonoides.

### INTRODUÇÃO

A dislipidemia é um distúrbio dos níveis lipídicos na corrente sanguínea, e que podem ser avaliados através de exames de análise bioquímica por um aumento no nível plasmático de triglicérides, colesterol, ambos ou por uma diminuição de lipoproteínas de baixa densidade (HDL). As dislipidemias são classificadas em primárias e secundárias, sendo que as primárias podem ser classificadas genotipicamente e fenotipicamente através de análises bioquímicas. Já as dislipidemias secundárias, que são mais interessantes para este estudo, possuem diversos fatores que contribuem para a doença, como: a ingestão excessiva de colesterol, gordura saturada e gordura trans; sedentarismo; resistência à insulina; etilismo; diabetes melitus e outras doenças metabólicas.<sup>1</sup>

Esse distúrbio está relacionado ao surgimento e agravamento de diversas doenças, em especial doenças cardiovasculares. Dentro das doenças cardiovasculares a aterosclerose chama muito a atenção como uma grave consequência das dislipidemias, e também está relacionada a estratificação do risco dos pacientes. A doença arterial coronariana é a principal causa de morte no Brasil e o aumento do colesterol pode ser considerado como o principal fator de risco modificável relacionado a essa doença. Portanto a redução do colesterol é logicamente uma das formas mais objetivas de reduzir as consequências das doenças vasculares, seja através de mudanças alimentares e de hábito de vida, ou através de fármacos<sup>2</sup>.

A lovastatina, o primeiro inibidor de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase

Trabalho Realizado no Instituto de Pesquisas Médicas.

1 - Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba, Brasil.

2 - Laboratório de Imunobiologia Humana do HC-UFPR, Curitiba, Brasil.

3 - Faculdades Pequeno Príncipe, Curitiba, Brasil

4 - Laboratório de Metabolismo Celular e do Núcleo de Investigação Experimental em Saúde do Centro Universitário Autônomo do Brasil (UniBrasil), Curitiba, Brasil.

5 - Hospital Vita e Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba, Brasil.

introduzido em 1987, permitiu o desenvolvimento de compostos similares, e assim a estatina tornou-se uma das classes terapêuticas mais utilizadas atualmente<sup>3</sup>. É eficaz em reduzir o LDL-colesterol e na prevenção de eventos isquêmicos coronários e cerebrais, além de possuir propriedades anti-inflamatórias<sup>4</sup> comprovadas em diversos estudos.

A sinvastatina (cujo mecanismo de ação consiste em inibir a hidroximetilglutaril-CoA redutase, enzima que participa da síntese do colesterol endógeno) é umas das estatinas utilizadas como primeira linha para redução colesterol LDL, apresentando redução em média de 15 a 55% de colesterol LDL em adultos. Entretanto, mesmo as estatinas tendo efetividade comprovada, elas apresentam diversas reações adversas desagradáveis aos pacientes<sup>5</sup>, que incluem o aparecimento de rhabdomiólise, bem como tem um uso restrito para gestantes<sup>6,7,8</sup>. Existem diversos artigos que buscam soluções para reduzir esses eventos<sup>9</sup> e alertar possíveis efeitos que, por sua vez, possam ainda ser desconhecidos<sup>10</sup>.

O efeito colateral mais comum com o uso de estatina são as miopatias de músculo esquelético. Chung *et al.* (2016) demonstraram que o exercício físico não exacerba a miopatia em pacientes que utilizam estatinas, porém o uso da medicação, segundo o estudo, dificulta a resposta adaptativa positiva do músculo ao treinamento<sup>11</sup>. Além do dano muscular, dados de pesquisas recentes têm demonstrado uma relação do uso de estatinas ao aparecimento de diabetes após o tratamento (NODM), indicando uma possível indução de diabetes pela droga. Um estudo retrospectivo realizado na Coreia identificou que a incidência de NODM ou *new-onset diabetes melitus* foi significativamente maior nos pacientes que faziam tratamento da dislipidemia com estatinas do que no grupo que não a utilizava. Sexo masculino, hipertensão e uso de tiazídicos demonstrou um maior risco para o aparecimento de NODM<sup>12</sup>.

Um relato de alguns casos realizado com médicos que faziam o uso de diferentes estatinas, incluindo a sinvastatina, mostrou que o uso da medicação prejudicou a saúde física e mental dos profissionais e também afetou sua vida profissional, podendo afetar a qualidade dos seus atendimentos aos pacientes. Os dois médicos que fizeram uso de sinvastatina relataram miopatia, neuropatia, intolerância ao exercício físico aos 50 anos, perda de força muscular e mialgia, confirmando de uma maneira mais subjetiva o impacto negativo da sinvastatina e das estatinas na qualidade de vida dos pacientes<sup>13</sup>.

Na tentativa de prevenir a dislipidemia e doenças cardiovasculares sem o uso de medicações com tantos efeitos colaterais, vários tipos de tratamento surgiram, utilizando não somente fármacos, mas alimentos contendo substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias, como flavonoides e carotenoides. Além desses, a introdução de mais fibras e a aplicação de hábitos e alimentos mais saudáveis, como os presentes na dieta mediterrânea, tem se mostrado muito promissores no

controle e prevenção das doenças cardiovasculares e metabólicas<sup>14</sup>.

A quercetina é um flavonoide natural encontrado em grande quantidade em alcaparras. Combate a oxidação do LDL, tendo uma ação antioxidante, e possui um potencial anti-inflamatório, fazendo um papel hipolipidêmico, evitando inflamações e a deposição de colesterol nas artérias. Estudos indicam que ele promove uma diminuição de 35,07% do colesterol total em coelhos<sup>15,16</sup>.

A quercetina tem sido estudada para ser utilizada no combate à diabetes e obesidade. Este potente polifenol derivado de plantas já demonstrou suas propriedades *in vitro* e em modelos experimentais, mostrando além de seu potencial anti-inflamatório um potencial anti-carcinogênico, antioxidante e antiviral, também. Essa substância tem se mostrado um interessante auxiliar na diminuição da peroxidação lipídica, agregação plaquetária e permeabilidade capilar<sup>17</sup>.

Os flavonoides estão distribuídos em diversas fontes alimentares como vegetais folhosos, frutas, tubérculos, ervas, chás e até no vinho. A quercetina compõe 75% da ingestão diária de flavonoides na população, porém há uma amplitude muito grande no consumo entre os diferentes hábitos alimentares. O consumo de quercetina tende a diminuir com o avançar da idade e também durante períodos de inverno. Estudos recentes sugerem que a quercetina age através de inibição de citocinas pró-inflamatórias, diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). Outros autores também demonstraram sua ação na inibição de ciclooxigenases (COX) e lipooxigenases (LOX)<sup>18</sup>.

Um estudo recente, utilizando cultura celular, avaliou o potencial antioxidante da quercetina e seus derivados. Encontrou-se que os derivados Monocloropivaloilquercetina (CPQ) e Cloronaptoquinaquercetina (CHNQ), mostraram-se mais potentes como antioxidantes do que a quercetina, tendo um efeito nas enzimas chave envolvidas na diabetes. Este estudo revelou a CPQ e CHPQ como potenciais medicamentos no combate a doenças inflamatórias e metabólicas crônicas relacionadas a idade, incluído a diabetes e doenças neurodegenerativas<sup>19</sup>.

Nesse mesmo sentido, o combate a diabetes através da quercetina foi estudado por Roslan *et al.* (2016). Estes autores avaliaram o estresse oxidativo, apoptose e inflamação no tecido cardíaco de ratos diabéticos e encontraram que a administração de quercetina reduziu a dosagem de glicose sanguínea, e reduziram os níveis de marcadores de lesão cardíaca com um aumento da insulina. Observou-se uma diminuição da apoptose, inflamação e estresse oxidativo no tecido cardíaco. Sendo assim, a quercetina novamente se mostra um importante instrumento de combate ao aparecimento de diabetes e redução de danos quando ela já está presente<sup>20</sup>.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados no estudo 25 ratos Wistar do criadouro da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), devidamente regularizado, respeitando as leis vigentes. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba no registro n. 9485/2014.

Os animais foram mantidos com uma ração equilibrada do próprio criadouro até completarem 8 semanas de idade, para garantir que estavam robustos o suficiente para retirada do sangue, bem como com apetite suficiente para a introdução de uma dieta para desenvolvimento de aterosclerose. Os ratos foram então divididos em cinco grupos distintos, o Grupo 1 contendo 5 animais que receberam apenas uma dieta comum para ratos (controle negativo), o Grupo 2 contendo 5 animais que receberam uma dieta hiperlipídica e gavagem de água destilada com carboxi metil celulose (CMC) a 5% (controle positivo) e os Grupos 3, 4 e 5 que foram constituídos por 5 animais cada – os três receberam uma dieta hiperlipídica, sendo diferenciados apenas pelo tratamento. O Grupo 3 recebeu, através da técnica de gavagem, uma quantidade de 20 mg/kg de Sinvastatina 10 mg diluída em água destilada com CMC a 5%. Já o Grupo 4 recebeu, através da mesma técnica de gavagem e após 10 dias de dieta hiperlipídica, 250 mg/kg de quercetina<sup>10</sup>, diluídos em água destilada com CMC a 5%. O Grupo 5, com 5 ratos, recebeu dieta hiperlipídica e quercetina desde o início do experimento<sup>21,22</sup>.

A gavagem foi realizada com uma agulha de gavagem curva em aço inox para ratos, com uma cânula de diâmetro 1,2mm, esfera de 2,25mm, e comprimento de 38 mm, acoplada a uma seringa descartável de 5mL.

Durante todo o experimento os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Pesquisas Médicas (IPEM) em um ambiente com luminosidade de 12h por dia, alimentação disponível e água *ad libitum* em um recipiente de vidro e bico de metal. Eles foram mantidos em caixas de plástico próprias para manutenção de ratos.

Cada caixa teve 3 ou 2 roedores, duas caixas para cada grupo, sendo ofertada ração comum ou hiperlipídica *ad libitum*.

### Dieta hiperlipídica

A dieta hiperlipídica foi baseada em uma ração comum para ratos Nuvilab®, composta de 19% de proteínas, 56% de carboidratos, 3,5% de lipídeos, 4,5% de celulose e 5% de vitaminas e minerais. Cada 100g de ração possuem 378 kcal. Para cada 300g de ração comercial foram adicionados 25g de gema de ovo desidratada (Mizumoto alimentos®), além de 30ml de óleo de milho (Liza®) e adição de 5g de gel de confeiteiro.

A ração hiperlipídica foi preparada semanalmente, em uma quantidade de 10kg, no laboratório do IPEM, através da adição de gel de confeiteiro (Mix®), na proporção de 7g/kg, à mistura da ração, além da gema em

pó e o óleo, para que a consistência da mistura se assemelhe a da ração original. Após a homogeneização da mistura, foram utilizados tubos plásticos para realização do processo de secagem e produção de “pellets”.

### Coleta de sangue

O sangue dos animais foi coletado de acordo com o *Guidelines for survival bleeding of mice and rats*, através da punção com uma agulha heparinizada da artéria lateral dorsal ou ventral da cauda, a fim de minimizar a contaminação por tecido. A coleta foi realizada no início do experimento e a cada 30 dias, perfazendo 10% do volume total do sangue do roedor a cada coleta.

Após a coleta, o sangue permaneceu incubado a 37°C durante 15 minutos e, em seguida, centrifugado por 10 minutos a 4220 rpm. O soro foi utilizado para realizar as análises bioquímicas das taxas de HDL, LDL, colesterol total e triglicérides.

Uma quarta coleta foi realizada ao final do experimento, após 90 dias do início, através de uma punção cardíaca, perfazendo um maior volume de sangue para que sejam avaliados também testes de função hepática.

### Pesagem

Os roedores foram pesados em uma balança digital devidamente calibrada no início do experimento (t=0) e sucessivamente a cada semana até o fim do experimento (t=90). Os valores foram anotados para posterior análise dos dados e comparação entre os grupos.

### Eutanásia

Após 90 dias de experimento, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de xetamina, na dose de 80 mg/kg, associado com cloridrato de xilasina, na dose de 15 mg/kg. Após jejum de 12h realizou-se coleta de sangue por punção cardíaca com agulha 25x9 e seringa heparinizada, perfazendo um volume de 5ml de sangue para análise das concentrações séricas de HDL, LDL, Triglicérides, TGO e TGP.

Após a coleta, os animais foram submetidos à eutanásia com injeção intraperitoneal de anestésico até completar a dose letal, de cerca de três vezes da dose anestésica normal.

### Histopatológico

Seguido à eutanásia, foi realizada uma toracotomia com uma incisão xifo-púbica e retirada das artérias aorta ascendente, aorta descendente, carótidas e ilíacas, esquerda e direita.

As peças foram fixadas em formalina (formol a 10%), durante 24 horas, e submetidas a uma sequência crescente de concentração de álcoois, branqueamento com xilol, glicerinadas e coradas em hematoxilina e eosina, para serem randomicamente analisadas. Com classificação da placa, padronizada pela *American Heart Association*, em lesões tipo I, II, III intermediárias e IV, V e VI avançadas.

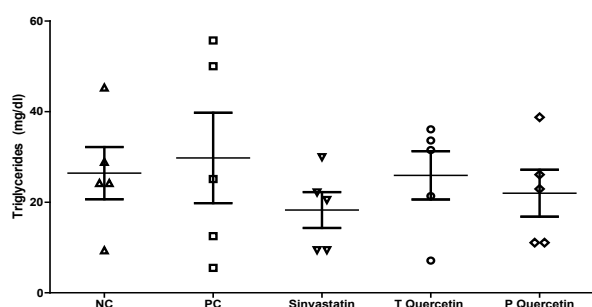
## RESULTADOS

### Análises Bioquímicas

A comparação estatística das análises bioquímicas do sangue dos animais foi feita através dos métodos de Kruskal Wallis e Mann-Witney e em ambos não houve diferença significativa entre os grupos quando considerado o valor de  $p < 0,05$ . Porém, ao analisar as variáveis individualmente percebemos que em alguns parâmetros os maiores valores observados foram no grupo de controle positivo. Entretanto, a disparidade de valores dentro de um mesmo grupo, além da quantidade reduzida de animais por grupo contribuiu para esse resultado da avaliação estatística. O número de animais por grupo foi reduzido para evitar a perda de muitos animais.

Nos valores analisados separadamente, foram observados índices de triglicerídeos elevados do grupo de controle positivo, indicando que possivelmente a dieta hiperlipídica associada a ausência de tratamento contribuem para esse aumento. Ao mesmo tempo, apesar de não ser estatisticamente significativo, o grupo que recebeu sinvastatina mostrou os menores valores de triglicerídeos observados no estudo, como mostra o gráfico com os valores de cada animal, por grupo, abaixo:

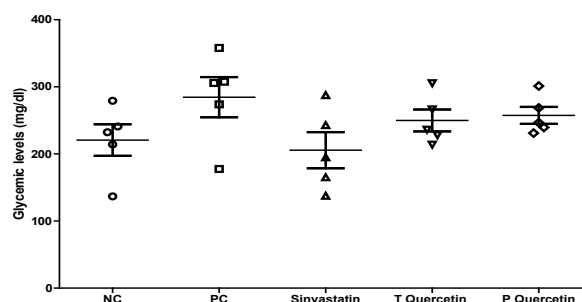
GRÁFICO I: VALORES DE TRIGLICERÍDEOS EM MG/DL PARA CADA GRUPO ANALISADO. OS DOIS MAIORES VALORES DE TRIGLICERÍDEOS ENCONTRADOS FORAM DE ANIMAIS DO GRUPO NÃO TRATADO.



NC: CONTROLE NEGATIVO OU G1; PC: CONTROLE POSITIVO OU G2; SINVATATIN: G3, T QUERCETIN: APÓS 10 DIAS OU G4 E P QUERCETIN: DESDE O INÍCIO OU G5.

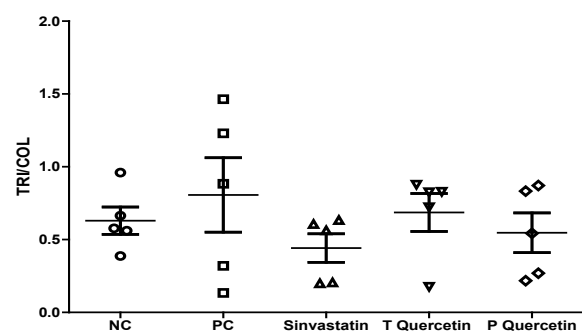
Outro achado foi um maior valor de glicemia nos ratos do grupo controle positivo, no qual foram encontrados 4 ratos diabéticos ( $GLI > 6 \text{ mmol/dl}$ ) dentre os 5 animais do grupo. Nos animais tratados com sinvastatina apenas um ficou diabético (1:5), no grupo tratado com quercetina apenas dois (2:5). O gráfico abaixo mostra a predominância de valores elevados da glicemia nos ratos sem tratamento<sup>13,14</sup>.

GRÁFICO II: VALORES DE GLICEMIA EM MG/DL PARA CADA ANIMAL DOS GRUPOS ANALISADOS. OBSERVE QUE APESAR DE APRESENTAREM UM VALOR VARIÁVEL, OS MAIORES VALORES ESTÃO CONCENTRADOS NO G2 QUE RECEBEU DIETA HIPERLIPÍDICA.



Quanto ao índice de triglicerídeos-HDLcolesterol, que está relacionado a maior mortalidade em doenças coronarianas e cardiovasculares, além de ser um fator que contribui para o surgimento de síndrome metabólica em homens, observaram-se valores maiores para o grupo controle positivo quando comparados aos valores dos outros grupos<sup>15</sup>.

GRÁFICO III: ÍNDICE TRIGLICERÍDEOS-HDLCOLESTEROL, MOSTRANDO A PREDOMINÂNCIA DE VALORES ELEVADOS NO GRUPO CONTROLE POSITIVO.



NC: CONTROLE NEGATIVO OU G1; PC: CONTROLE POSITIVO OU G2; SINVATATIN: G3, T QUERCETIN: APÓS 10 DIAS OU G4 E P QUERCETIN: DESDE O INÍCIO OU G5.

### Análise Histológica

Ao analisar as amostras de tecido obtidas após a eutanásia dos animais, percebemos uma discreta presença de esteatose hepática nos animais do grupo 2 (G2), o qual foi submetido a uma dieta hiperlipídica sem a realização de nenhum tratamento. Quando comparado aos outros grupos, o G2 teve mais vesículas de gordura. Entre os grupos que receberam tratamento (G3, G4 e G5) não percebemos uma diferença significativa no comprometimento hepático. Quanto a análise das artérias, não conseguimos identificar placas de aterosclerose evidente em nenhum dos grupos. Não foi observado nenhum espessamento da íntima desses vasos. Sendo este achado o primeiro estágio no desenvolvimento de aterosclerose segundo a classificação de Stary.

FIGURAS 1 E 2: FÍGADO DE ANIMAIS DO G1, MOSTRANDO ARQUITETURA ORGANIZADA E HEPATÓCITOS ÍNTEGROS.

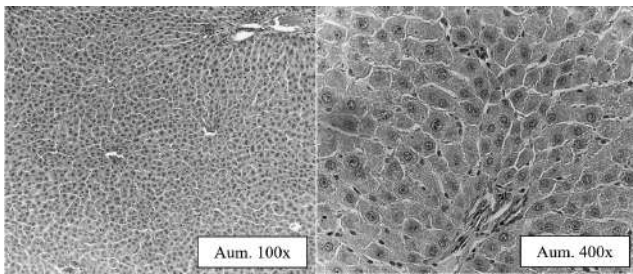
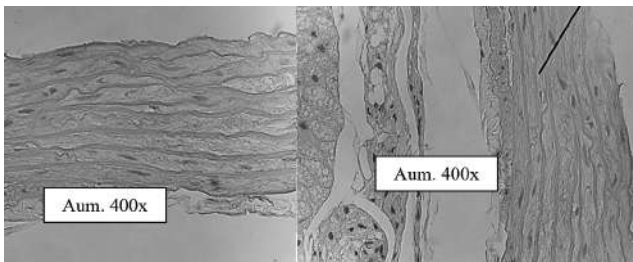
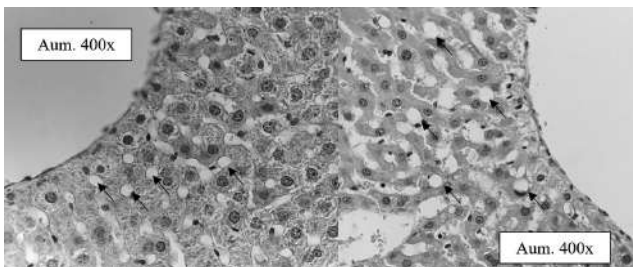


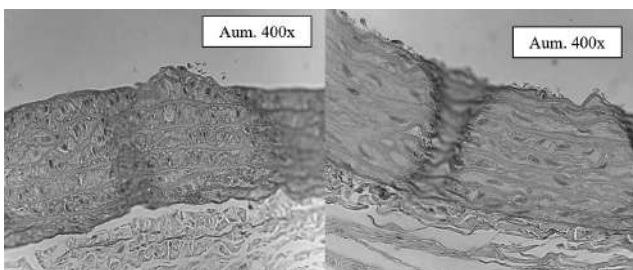
FIGURA 3: AORTA TORÁCICA DE UM RATO DO G1. INTIMA NORMAL E SEM ESPESSEAMENTO, SEM SINAL DE PRESENÇA DE ESPUMÓCITOS QUE INDICARIAM UM PROCESSO ATROSCLERÓTICO.



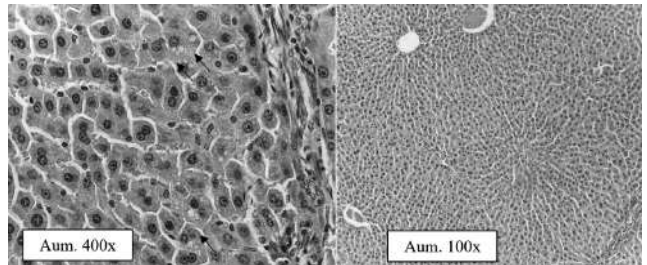
FIGURAS 4 E 5: AMOSTRA DO FÍGADO DE ANIMAIS DO G2, NA SETA GOTÍCULAS DE GORDURA, COM PREDOMÍNIO EXTRACELULAR OBSERVADAS NA HISTOLOGIA INDICANDO UM INÍCIO DE ESTEATOSE.



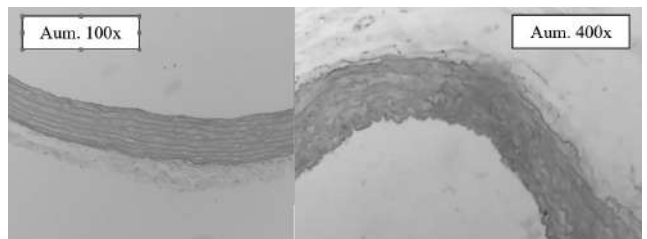
FIGURAS 6 E 7: AORTA TORÁCICA DE DOIS ANIMAIS DO G2 COM DISCRETO ESPESSEAMENTO DA CAMADA ÍNTIMA MAS COM AUSÊNCIA DE ESPUMÓCITO QUE CARACTERIZARIA O INÍCIO DE UM PROCESSO ATROSCLERÓTICO.



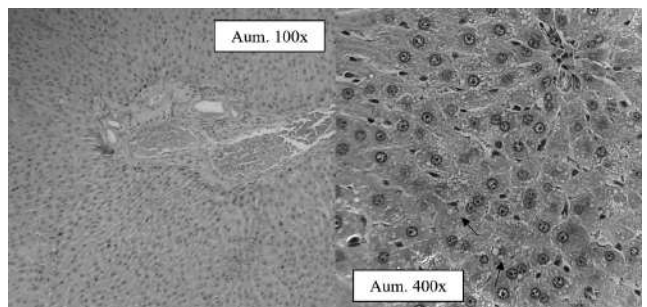
FIGURAS 7 E 8: HEPATÓCITOS DE ANIMAL DO G3 COM POUCAS GOTÍCULAS DE GORDURA INTRACELULAR (SETAS), E À DIREITA, NO MENOR AUMENTO, A ARQUITETURA DO FÍGADO ESTÁ PRESERVADA. O FÍGADO DO ANIMAL TRATADO COM SINVASTATINA MOSTROU, PORTANTO, MENOS ACÚMULO DE GORDURA QUANDO COMPARADO AO G2 (SEM TRATAMENTO).



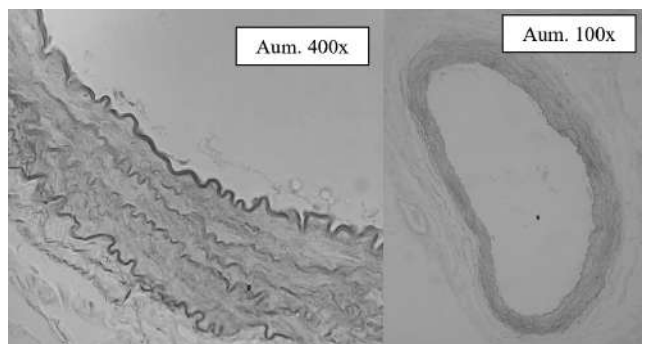
FIGURAS 9 E 10: ARTÉRIAS DE ANIMAIS DO G3. SEM NENHUMA ALTERAÇÃO OBSERVADA.



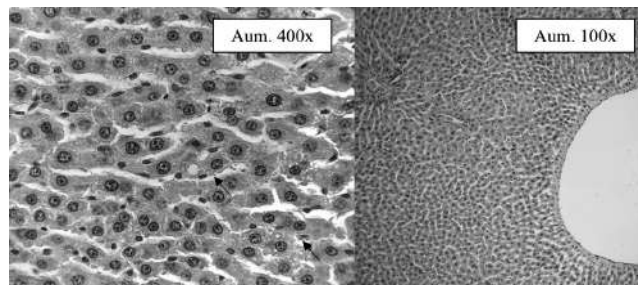
FIGURAS 11 E 12: FÍGADO DE ANIMAIS DO GRUPO 4 MOSTRANDO POUCO ACÚMULO DE GORDURA INTRACELULAR E UM ACÚMULO MICROGOTICULAR.



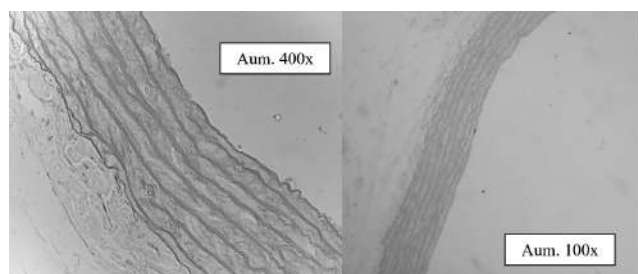
FIGURAS 13 E 14: ARTÉRIAS DE ANIMAIS DO G4 APRESENTARAM-SE NORMAIS NA ANÁLISE HISTOLÓGICA, SEM AUMENTO DA CAMADA ÍNTIMA.



FIGURAS 15 E 16: FÍGADO DE ANIMAIS DO G5, OBSERVOU-SE POUCA QUANTIDADE DE GORDURA, SEMELHANTE AO OBSERVADO NOS OUTROS GRUPOS EM QUE FOI REALIZADO TRATAMENTO.



FIGURAS 17 E 18: ARTÉRIAS DE ANIMAIS DO G5 QUE SE MOSTRAM NORMAIS A ANÁLISE HISTOLÓGICA.



#### Peso

Os animais do G1 tiveram um ganho de peso de 15,2g, que representa um aumento de 3,83% do peso médio inicial; G2 de 20,6g, representando 5,75%; G3 de 25g, representando 6,36%; G4 de 27,1g, representando 6,6% e G5, que apresentou o maior ganho de peso, de 60,6g, representando um aumento de 15,7% em relação ao peso médio inicial dos animais. Quando comparados os valores entre os grupos não foi observada uma diferença estatisticamente relevante, o que pode ser explicado pela pequena amostragem e pelo curto tempo de experimento. Porém, podemos observar que o grupo que não recebeu dieta hipercalórica (G1) teve o menor ganho de peso (tanto absoluto quanto relativo) dentre os cinco grupos, o que comprova a eficácia da dieta na indução de dislipidemia e ganho de peso.

## DISCUSSÃO

Conforme observado nos resultados dos experimentos, houve um menor aparecimento de esteatose hepática nos animais suplementados com quercetina e sinvastatina.

A quercetina melhora a perfusão hepática, o que acelera a eliminação de toxinas, além de estimular a secreção da bile no fígado, que protege este órgão da ação prejudicial de fatores exógenos. Alguns estudos concluíram que a quercetina inibe a superexpressão da proteína que interage com a Tiorredoxina (TXNIP), regulador de estresse oxidativo celular. Sua inibição hepática contribui em uma redução da inflamação local e acúmulo de lipídios sob condições hiperglicêmicas. A

segmentação da TXNIP hepática por quercetina pode ter implicações terapêuticas para a prevenção do tipo 1 da doença hepática gordurosa não alcoólica associada a diabetes. Acreditamos que tais fatos expliquem a ação protetora da quercetina quanto ao aparecimento de esteatose hepática nos ratos através da diminuição do processo oxidativo<sup>26</sup>.

Outro dado obtido nos resultados do experimento foi a maior presença de ratos diabéticos em grupos não tratados quando comparados aos grupos que receberam tratamento com quercetina e sinvastatina.

Os ratos desenvolveram diabetes devido a dieta hipercalórica rica em colesterol e ácidos graxos, sendo muitos deles saturados, além de receberem um aporte calórico maior do que a ração padrão prevê para a necessidade diária do animal. Esta dieta simula uma dieta de cafeteria que possui quantidades excessivas de ácidos graxos saturados como uma característica marcante. Sabe-se que tanto o colesterol quanto a gordura saturada, que aumenta os níveis sanguíneos de colesterol, estão associados a um maior risco cardiovascular, e aliado a este fato o diabetes aumenta ainda mais o risco cardiovascular nos indivíduos<sup>26</sup>.

Já foi comprovado que a resistência à insulina induz o aparecimento de aterosclerose antes mesmo do desenvolvimento da diabetes, sendo que este é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares<sup>27</sup>.

A menor quantidade de ratos diabéticos no grupo tratado com quercetina pode ser explicado pelo papel da quercetina em controlar a glicemia pós-prandial e em jejum. Estudos sugerem que a quercetina protege o pâncreas contra o estresse oxidativo. Além deste papel protetor do flavonoide, estudos *in vitro* mostraram que ele atua inibindo a  $\alpha$ -glucosidase, atuando, portanto, como um agente hipoglicemiante, que inibe a digestão de carboidratos no intestino, retardando o aumento de glicemia no período pós prandial<sup>27</sup>.

Um estudo realizado com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina comparou a glicemia dos animais tratados com acarbose e quercetina. A quercetina apresentou uma redução significativa na glicemia dos animais, além de não ter diferença significativa quando comparada com a acarbose, que é utilizada como hipoglicemiante no tratamento da diabetes<sup>28</sup>.

A indução de diabetes nos ratos alimentados com a dieta hiperlipídica é corroborada por outros trabalhos publicados na literatura, e ambos mostram a importante ligação entre o consumo de ácidos graxos saturados, o aumento de peso nos animais e a alteração do perfil lipídico dos animais. Outros estudos também mostraram o aumento significativo do estresse oxidativo nos tecidos dos animais, principalmente no fígado e no coração, o qual parece ser combatido pelos flavonoides utilizados nos estudos. Portanto, a diminuição do estresse oxidativo está ligada ao menor aparecimento de diabetes, esteatose e lesões intimais nas artérias<sup>28</sup>.

Ainda em relação à dieta recebida pelos animais,

sabe-se que o tipo de gordura e a quantidade em que é consumida influencia diretamente na concentração de lipídeos e de lipoproteínas plasmáticas, na resistência à insulina e no risco cardiovascular. Vários estudos já demonstraram o aumento de colesterolemia ligado ao consumo elevado de colesterol na dieta dos animais e, conseqüentemente, ao aumento de aterosclerose. Além da influência direta do colesterol alimentar, que está em grande quantidade na gema do ovo, sabe-se que os ácidos graxos saturados quando consumidos em excesso na alimentação têm um papel preponderante no aumento da colesterolemia. Isso ocorre pelo aumento de excreção e redução da síntese de colesterol<sup>29</sup>.

A dieta rica em gordura saturada é responsável pelo aumento do colesterol total e pela diminuição das partículas de LDL mediadas pelo seu receptor específico. Quando essa gordura está associada à um excesso de colesterol na alimentação, ela também é capaz de reduzir a expressão de mRNA do receptor de LDL e também da sua atividade. Além de alterar as lipoproteínas, os ácidos graxos saturados são também conhecidos por ativar uma resposta inflamatória no organismo através de vários fatores, principalmente através da ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB) e a expressão de COX 2, Interleucina 1α e óxido nítrico sintetase induzida por meio da interação com o receptor TLR 4<sup>29</sup>.

A ausência de aparecimento evidente de uma lesão aterosclerótica na parede arterial dos animais pode ser explicada por uma resistência natural dos ratos da linhagem wistar para o desenvolvimento de aterosclerose. Vários trabalhos da literatura utilizam camundongos com knock-out de apolipoproteína E (apoE) com intenção de contornar esta dificuldade, porém o presente estudo decidiu por utilizar os ratos Wistar por sua melhor viabilidade econômica e por sua maior resistência a adversidades, que possibilitou a sobrevivência de todos os animais durante o experimento. Apesar de não apresentarem aterosclerose, os animais responderam a dieta hiperlipídica com aumento de glicemia e de triglicérides<sup>30</sup>.

Apesar da ausência de placas, a relação entre diabetes tipo 2 e a resistência à insulina com as doenças cardiovasculares, como a aterosclerose, é muito evidente clinicamente. A resistência à insulina tem como consequência diversos fatores como a dislipidemia, hipertensão, intolerância à glicose, disfunção endotelial, inflamação e estresse oxidativo. Além destas consequências diretas, a resistência à insulina leva a uma disfunção na sinalização em células que participam do processo aterosclerótico, como os macrófagos e células endoteliais<sup>31</sup>.

Estudos recentes têm demonstrado que além de atuar através de efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, a quercetina deve atuar de outras formas no combate da hiperlipidemia e, conseqüentemente, a aterosclerose e a diabetes. Uma delas é através de um aumento no transporte reverso do colesterol (RCT) dos macrófagos. Porém, outros autores já investigaram suas proprieda-

des *in vitro* em ativar a proteína transmembrana, responsável pelo efluxo de colesterol (ABCA1), através de supra-regulação de receptores nos peroxissomos e no fígado, ou também através de macrófagos<sup>32</sup>.

Acredita-se que o RCT facilita o transporte do excesso de colesterol de regiões periféricas para o fígado e intestino para a sua eliminação. A quercetina aumentou o RCT em camundongos apo-E submetidos a uma dieta rica em gordura e, quando comparados a um grupo controle, houve um aumento de 30,3% na excreção de colesterol no fígado e 50,1% de aumento da excreção através da bile. Mais trabalhos têm sido realizados recentemente para investigar a redução de colesterol e diminuição de dislipidemia em animais com a utilização de quercetina, e cada vez mais reforçam o papel de prevenção de doenças crônicas não transmissíveis deste flavonoide<sup>32</sup>.

Os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes são fortemente embasados em estudos científicos já realizados, principalmente ensaios *in vitro* que mimetizam o processo de aparecimento de aterosclerose. Xue F. *et al* demonstraram, através da estimulação com lipopolissacarídeos ou lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (oxi-LDL) para gerar um processo aterosclerótico, que a quercetina foi responsável pela diminuição de várias citocinas inflamatórias a nível transcripcional, incluindo interleucina (IL)-1α, IL-1β, IL-2, IL-10, proteína quimioatrativa de macrófagos 1 e ciclooxigenase<sup>33</sup>.

Além desta supressão de citocinas, a quercetina foi responsável pela diminuição da expressão de diversos fatores que contribuem para o desenvolvimento de aterosclerose como a metaloproteinase de matriz 1 (MMP-1). Outra função encontrada pela quercetina foi corrigir a deposição lipídica e a superprodução de reativos de oxigênio induzidos pelo oxi-LDL, e bloquear a expressão do receptor LDL oxidado semelhante a lectina (LOX-1) em macrófagos cultivados<sup>34</sup>.

O presente estudo reforça a importância de uma alimentação saudável e a teoria de que a ingestão de flavonoides na dieta está associada à diminuição de fatores de risco cardiovasculares e tratamento da obesidade<sup>25</sup>. Uma revisão sistemática e meta análise realizada em 2013, analisou diversos estudos que utilizavam flavonoides, entre eles a quercetina, em de uma forma geral estes trabalhos convergiam para um consenso de que o consumo de flavonoides tinha uma associação inversa com o risco cardiovascular total<sup>36</sup>.

Um estudo realizado com jovens de 19 anos que participaram do National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2012, investigou a associação do consumo de flavonoides na dieta e o risco cardiovascular desses pacientes. Descobriu-se que o aumento de HDL estava associado a um maior consumo de flavonoides. Os triglicérides e a relação TG:HDL foram inversamente proporcionais a quantidade de ingestão de flavonoides. Outro achado foi sua relação inversa com o aparecimento de intolerância à insulina<sup>37</sup>.

## CONCLUSÃO

Como conclusão verificamos que a dieta hiperlipídica induziu diabetes e esteatose hepática nos animais do Grupo 2 – controle positivo, verificados pelos exames laboratoriais e histológicos, respectivamente, porém não apresentando sinais de aterosclerose segundo a classificação de Stary da *American Heart Association*, o que pode ser explicado pela curta duração do experimento e pela resistência natural dos animais. Houve uma redução no número de ratos diabético nos grupos tratados com quercetina e sinvastatina.

Não houve diferença significativa entre os trata-

mentos com sinvastatina e quercetina, podendo ser um indicativo do uso deste método alternativo para a prevenção e tratamento de dislipidemias e aterosclerose. A quercetina tem seu papel anti-inflamatório e antioxidante já bem estabelecida e confirmada pela literatura, sustentando seu papel no combate as dislipidemias.

Este trabalho também reforça o fato de que a dieta está intimamente ligada ao aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis, e que a introdução de flavonoides na alimentação diária, que estão presentes em diversos tipos de vegetais, pode ter um impacto importante na qualidade de vida e saúde das pessoas a longo e curto prazo.

---

Ramos RK, Mesquita MB, Machoski MCC, Musa NMK, Lidani KC, Essenfelder B, Marques CM, Kubrusly LF. Dyslipidemia induction in Wistar rats with comparison of treatment with Sinvastatin and Quercetin.. *Rev. Méd. Paraná, Curitiba*, 2017;75(2):25-33.

**ABSTRACT** - Dyslipidemia causes diverse cardiovascular and metabolic diseases, and statins are its standard treatment. Alternatives treatments to reduce side effects are in study. The flavonoid quercetin showed a potential antioxidant and cholesterol lowering effect. The aim was to analyze the difference between the current treatment with simvastatin and other with quercetin. 25 Wistar rats were divided into 5 groups: G1 with standard diet; G2 receiving hyperlipidic diet (HD); G3 HD and 10mg / kg simvastatin; G4 HD and 2 mg / kg quercetin after 10 days of diet; G5 HD and 2mg / kg quercetin from the beginning. All groups were kept for 90 days until euthanasia, when tissue and blood were collected for analysis. A higher proportion of diabetes (GLI>6Mmol / dl) was found in G2 compared to G3 and G5. In addition, G2 had higher levels of triglycerides and TG-HDL, but lack a significant difference between the others.

**KEYWORDS** - Dyslipidemias, Simvastatin, Quercetin, Flavonoids.

---

## REFERÊNCIAS

- Goldberg AC. Dyslipidemia. In: Merck Manual of Diagnosis and Therapy [Internet]. Whitehouse Station (NJ).19th edition. 2011. Reviewed online 2015. Available from:<http://www.merckmanuals.com/professional/endocrine-and-metabolic-disorders/lipid-disorders/dyslipidemia>
  - Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*. 2013;101(4):01-22.
  - Stein EA. New statins an new doses of older statins. *Curr Atheroscler Rep*. 2001; 3: 14-8
  - Holme I. Relation of coronary heart disease incidence and total mortality to plasm cholesterol reduction in randomised trials: use of meta-analysis. *Br Heart J*. 1993; 69: 42-7.
  - Wright DF, Pavan Kumar VV, Al-Sallami HS, Duffull SB. The influence of dosing time, variable compliance and circadian ldl production on the effect of simvastatin: Simulations from a pkpd model. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011;109(6):494-8.
  - Pedro LM. Prevenção secundária com estatinas na patologia arterial periférica aterosclerótica. *Rev Port Cardiol*. 2011;30(7-8):665-73.
  - Dahlof, B. Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. *Am. J. Cardiol*.2010;105(1):3-9.
  - Lloyd-jones, D. M. Cardiovascular risk prediction: basic concepts, current status, and future directions.*Circulation*.2010;121(1):1768-1777.
  - 
  - Koh KK, Sakuma I, Quon MJ. Differential metabolic effects of distinct statins. *Atherosclerosis*. 2011;215(1):1-8.
  - Accioly MF, Camargo Filho JC, Padulla SA, Lima AL, Bonfim MR, Carmo EM, et al. Efeito do exercício físico e estatinas na função muscular em animais com dislipidemia. *Rev Bras Med Esporte*. 2012;18(3):198-202.
  - Chung HR, Vakil M, Munroe M, Parikh A, Meador BM, Wu PT, et al. The Impact of Exercise on Statin-Associated Skeletal Muscle Myopathy. *PLoS One*. 2016;11(12):1-18.
  - Yoon D, Sheen SS, Lee S, Choi YJ, Park RW, Lim H. Statins and risk for new-onset diabetes mellitus. 2016;95(46):1-7.
  - Koslik HJ, Meskimen AH, Golomb BA. Physicians' Experiences as Patients with Statin Side Effects: A Case Series. *Drug Saf - Case Reports*. 2017;4(1):1-7.
  - Porras D, Nistal E, Martinez-Flirez S, Pisonero-Vaquero S, Olcoz JL, Jover R, et al. Protective effect of quercetin on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice is mediated by modulating intestinal microbiota imbalance and related gut-liver axis activation. *Free Radic Biol Med*. 2017;102:188-202.
  - Lima, L. R. P.; Oliveira, T. T. DE; Nagem, T. J.; et al. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. *Brazilian J. vet. Res. anim. Sci.*, 2001;38(4):196-200.
  - Widowati W, Ratnawati H, Mozefis T, Pujimulyani D, Yellianty Y. Hypolipidemic and Antioxidant Effects of Black Tea Extract and Quercetin in Atherosclerotic Rats. 2013;7(10):64-71.
  - M. P. Portillo. Beneficial effects of quercetin on obesity and diabetes. *The Open Nutraceuticals Journal*.2011;4(1):189-198.
  - Chen S, Jiang H, Wu X, Fang J. Therapeutic Effects of Quercetin on Inflammation, Obesity, and Type 2 Diabetes. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:1-5.
  - Zizkova P, Stefek M, Rackova L, Prnova M, Horakova L. Novel quercetin derivatives: From redox properties to promising treatment of oxidative stress related diseases. *Chem Biol Interact*. 2017;265:36-46.
  - Roslan J, Giribabu N, Karim K, Salleh N. Quercetin ameliorates oxidative stress, inflammation and apoptosis in the heart of streptozotocin-nicotinamide-induced adult male diabetic rats. *Biomed Pharmacother*
  - Ellison S. et al. Attenuation of experimental atherosclerosis by interleukin-19. *Atherosclerosis, thrombosis, and vascular biology*.2013;33(10):2316-2320.
  - Jawien J., Nastalek P., Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of physiology and pharmacology*. 2004;55(3):503-505.
  - Narasimhan A, Chinnaiyan M, Karundevi B. Ferulic acid regulates hepatic
-

- GLUT2 gene expression in high fat and fructose-induced type-2 diabetic adult male rat. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2015;1–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299915004057>
25. Hu J, Wang F, Sun R, Wang Z, Yu X, Wang L, et al. Effect of combined therapy of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from umbilical cord with sitagliptin in type 2 diabetic rats. *Endocrine* [Internet]. 2013;(16). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23686639>
  26. Vega GL, Barlow CE, Grundy SM, Leonard D, DeFina LF. Triglyceride-to-high-density-lipoprotein-cholesterol ratio is an index of heart disease mortality and of incidence of type 2 diabetes mellitus in men. *J Investig Med* [Internet]. 2014;62(2):345–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24402298>
  27. Heeba GH, Mahmoud ME, EL Hanafy a. a. Anti-inflammatory potential of curcumin and quercetin in rats: Role of oxidative stress, heme oxygenase-1 and TNF-. *Toxicol Ind Health*. 2012;30(6):551–60.
  28. Cai X, Bao L, Dai X, Ding Y, Zhang Z, Li Y. Quercetin protects RAW264.7 macrophages from glucosamine-induced apoptosis and lipid accumulation via the endoplasmic reticulum stress pathway. *Mol Med Rep* [Internet]. 2015;7545–53. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2015.4340>
  29. Kim J-H, Kang M-J, Choi H-N, Jeong S-M, Lee Y-M, Kim J-I. Quercetin attenuates fasting and postprandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus. *Nutr Res Pract*. 2011;5(2):107–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21556223><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3085798>
  30. Samout N, Ettaya A, Bouzenna H, Ncib S, Elfeki A, Hfaiedh N. Beneficial effects of *Plantago albicans* on high-fat diet-induced obesity in rats. *Bio-med Pharmacother*. 2016;84:1768–75. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332216313403>
  31. Figueiredo RM. Efeito dos ácidos graxos saturados , poli-insaturados e trans no desenvolvimento de aterosclerose e esteatose hepática em camundongos com ablação gênica do receptor de LDL. 2012.
  32. Fernandes SATF, Natali AJ, Teodoro BG, Franco FSC, Matta SLP da, Larterza MC, et al. Ácido Linoléico Conjugado E Exercício Físico: Efeitos Na Aterosclerose De Camundongos Apoe<sup>-/-</sup>. *Revista brasileira de atividade física e saúde*. 2011;16(3):217–222.
  33. Aguilar EC, Horizonte B. Suplementação oral com Butirato de Sódio reduz o desenvolvimento da Aterosclerose e aumenta a estabilidade da placa em camundongos Apoe<sup>-/-</sup> - Suplementação oral com Butirato de Sódio reduz o desenvolvimento da Aterosclerose e aumenta a estabilidade da plac. 2014.
  34. Cui Y, Hou P, Li F, Liu Q, Qin S, Zhou G, et al. Quercetin improves macrophage reverse cholesterol transport in apolipoprotein E-deficient mice fed a high-fat diet. *Lipids Health Dis*. 2017;16(1):9.
  35. Xue F, Nie X, Shi J, Liu Q, Wang Z, Li X, et al. Quercetin Inhibits LPS-Induced Inflammation and ox-LDL-Induced Lipid Deposition. *Front Pharmacol* [Internet]. 2017;8(February):1–8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00040/full>
  36. Nabavi SF, Russo GL, Daglia M, Nabavi SM. Role of quercetin as an alternative for obesity treatment: You are what you eat! *Food Chem* [Internet]. 2015;179:305–10. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615001715>
  37. Wang X, Ouyang YY, Liu J, Zhao G. Flavonoid intake and risk of CVD: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Br J Nutr* [Internet]. 2013;111:1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23953879>
  38. Kim K, Vance TM, Chun OK. Greater flavonoid intake is associated with improved CVD risk factors in US adults. *Br J Nutr* [Internet]. 2016;1–8. Available from: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0007114516000519](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114516000519)
-