



**Ministério da Educação
Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista**



CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

LUYZA GARCIA ALMEIDA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CAROTENOIDES NO ESTRESSE
OXIDATIVO E NO PROCESSO INFLAMATÓRIO RENAL EM RATOS
ADULTOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

**SANTOS
2022**

LUYZA GARCIA ALMEIDA

Efeito da suplementação de carotenoides no estresse oxidativo e no processo inflamatório renal em ratos adultos alimentados com dieta hiperlipídica

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Universidade Federal de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Pisani

Co-orientadora: Dra. Aline Boveto Santamarina

SANTOS
2022

Ficha catalográfica elaborada por sistema automatizado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Almeida, Luyza.
A447e Efeito da suplementação de carotenoides no estresse oxidativo e no processo inflamatório renal em ratos adultos alimentados com dieta hiperlipídica.
/ Luyza Almeida; Orientadora Profa. Dra. Luciana Pisani; Coorientadora Dra. Aline Santamarina. -- Santos, 2022.
39 p. ; 30cm

TCC (Graduação - Nutrição) -- Instituto Saúde e Sociedade, Universidade Federal de São Paulo, 2022.

1. Carotenoides. 2. Estresse oxidativo renal . 3. Processo inflamatório renal. 4. Dieta hiperlipídica.
I. Pisani, Profa. Dra. Luciana, Orient. II. Título.

CDD 613.2

Dedico esse trabalho a minha avó, Alice, que já não está mais entre nós, mas tinha o sonho de ver os seus formados.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu agradeço a Deus e a Santa Teresinha, por terem me dado saúde e discernimento para concluir essa etapa tão importante na minha vida em meio a uma pandemia.

Também agradeço à minha orientadora Prof^a Dr^a Luciana Pisani, por todo apoio, ajuda e por sempre se fazer presente mesmo de maneira remota. Agradeço em especial, a minha coorientadora Dr^a Aline Santamarina, por ter me acolhido e aceitado me ajudar mesmo o projeto não sendo seu inicialmente. Serei eternamente grata. As minhas amigas da faculdade, Maria Claudia, Sabrina e Larissa, o meu muito obrigado, não sei o que seria da minha graduação sem vocês ao meu lado.

Agradeço a minha mãe, Adriana, por estar sempre ao meu lado e por seu abraço reconfortante, que me acalmou em muitos momentos difíceis ao longo dessa jornada. Ao meu pai, Beto, que me ensinou a nunca desistir, aceitar todos os desafios e me faz todos os dias acreditar que sou capaz. A minha irmã, Letícia, meu maior orgulho. Esteve na linha de frente durante a pandemia de Covid-19 e através do seu amor pela área da saúde e pela Unifesp se tornou minha inspiração. A minha irmã, Juliana, que antes mesmo de eu ingressar na universidade, já apoiava a minha escolha e é minha maior incentivadora na profissão que escolhi exercer. Agradeço ao meu sobrinho, Guilherme, que apesar da pouca idade, transborda amor. Ao meu namorado, Iago, obrigada por todo amor, carinho, paciência e, principalmente, por nunca ter soltado a minha mão.

Por fim, gostaria de agradecer a Universidade e todos os funcionários que passaram pela minha vida ao longo dessa caminhada.

SUMÁRIO

RESUMO	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 CAROTENOIDES	10
2.2 Carotenoides, Inflamação e Estresse Oxidativo	12
2.3 Carotenoides, Inflamação e função renal	15
3. Hipótese.....	17
4. Objetivos.....	18
4.1 Objetivo Geral.....	18
5. Material e métodos	19
5.1 Desenho Experimental	19
5.2 Dose de suplementação de carotenoides	21
5.3 Análises Séricas	21
5.4 Análise Das Enzimas Antioxidantes	21
5.5 Ensaio De Imunoabsorção Enzimática (ELISA)	21
5.6 Análise Estatística	22
6. Resultados.....	23
6.1 Evolução Do Ganho De Peso Corporal E Tecidos.....	23
6.2 Análise De Concentrações De Biomarcadores Séricos	24
6.3 Marcadores De Estresse Oxidativo Nos Rins.....	26
6.4 Concentrações De Citocinas Nos Rins.....	27
7. Discussão	29
8. Conclusão.....	32
● REFERÊNCIAS	33

RESUMO

Os carotenoides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores: amarela, laranja e vermelha presentes em frutas e vegetais. Além disso, apresentam atividade biológica e através de sua atividade antioxidante, promovem benefícios à saúde. A suplementação desses compostos bioativos tem se mostrado uma das estratégias no tratamento da obesidade, visto que esse pigmento protege as células dos danos oxidativos e apresenta uma ação anti-adipogênica e anti-inflamatória. A obesidade é uma doença multifatorial relacionada a uma ingestão de dieta hipercalórica/hiperlipídica que pode ocasionar aumento do estresse oxidativo e está associada a um processo inflamatório de baixo grau. O processo inflamatório é caracterizado pela concentração elevada de citocinas pró-inflamatórias e diminuição na concentração de citocinas anti-inflamatórias. Este desequilíbrio estabelece uma relação de aumento de estresse oxidativo e um estado pró-inflamatório. O sistema renal é imprescindível para manutenção da homeostase, respondendo a estímulos inflamatórios rapidamente. Desta forma, o objetivo do estudo foi avaliar a suplementação de carotenoides nos animais alimentados com dieta hiperlipídica nos parâmetros inflamatórios e oxidativos do tecido renal. Para isso, foram utilizados ratos Wistar machos, com idade de 90 dias, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais que receberam durante uma semana por gavagem (óleo de girassol como veículo) com ou sem extrato de carotenoides e alimentados com os modelos de dieta controle (C), ou hiperlipídica (HFD). O presente estudo mostrou que os carotenoides provenientes do fruto da pupunha (*Bactris gasipaes*) exercem ação contra os efeitos do estresse oxidativo e da inflamação renal, reduzindo níveis de marcadores de estresse, como malondialdeído e proteínas carboniladas e a concentração de citocinas pró-inflamatórias, como Interleucina 1 β (IL-1 β); [B] Fator de necrose tumoral α (TNF- α); [C] Interleucina-6 (IL-6). Também foram capazes de aumentar as concentrações das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e de citocina anti-inflamatória interleucina-10. Os resultados evidenciaram, sobre o tecido renal, efeitos protetores dos carotenoides contra implicações negativas de uma dieta rica em gorduras.

1. INTRODUÇÃO

A obesidade decorre de um balanço energético positivo, pode levar ao acúmulo de gordura corporal e está associada a riscos para a saúde, devido à sua relação com conseqüentes complicações metabólicas. Tem caráter multifatorial, pois está relacionada a questões biológicas, históricas, ecológicas, econômicas, sociais, culturais e políticas^(1,2). Está bem descrito na literatura que se trata de um dos fatores de risco mais expressivos para outras doenças crônicas não transmissíveis, como: dislipidemia, hipertensão arterial, resistência à insulina e intolerância à glicose, alterações no sistema cardiovascular e nefropatias^(3,4). Estudo demonstrou associação de doenças renais com a obesidade e, em algumas circunstâncias, com o sobrepeso⁽⁵⁾.

Indivíduos com obesidade podem apresentar aumento na concentração sérica de citocinas pró-inflamatórias como: proteína C reativa, interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), além da diminuição na produção de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina-10 (IL-10). O desequilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias favorece o processo de inflamação de baixo grau, tornando o organismo mais suscetível a processos oxidativos^(6,7,8,9).

As espécies reativas de oxigênio são produzidas, principalmente pelas mitocôndrias e são importantes para manutenção da homeostase por mediar a transdução de sinal celular. Porém, a produção em excesso e seu desequilíbrio gera estresse oxidativo e danos a moléculas como lipídios, proteínas e DNA^(10,11,12).

O estresse oxidativo exacerbado leva à produção de marcadores de peroxidação lipídica como os malondialdeídos (MDA) e marcadores de oxidação de proteínas, como as proteínas carboniladas⁽¹³⁾. Esses danos podem desencadear desordens metabólicas e bioquímicas em diversos órgãos^(4,14).

A suplementação de carotenoides vem sendo associada à prevenção e ao tratamento do processo inflamatório e estresse oxidativo renal causado pela obesidade. Um estudo de Pierine et al. utilizou a suplementação de licopeno em ratos Wistar induzidos à obesidade, por meio de uma dieta rica em lipídios e sacarose. A dieta gerou inflamação e estresse oxidativo nos rins e os resultados mostraram que o licopeno, identificado tanto no plasma quanto nos rins dos animais, foi capaz de reduzir as concentrações renais de MDA e TNF- α , elucidando seu efeito benéfico na prevenção e tratamento na toxicidade causada pelo estresse oxidativo renal em função da obesidade⁽¹⁵⁾.

Os carotenoides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores: amarela, laranja ou vermelha presentes em frutas, vegetais, gema de ovo, crustáceos e alguns peixes. Os carotenoides além de contribuírem para a coloração dos alimentos, apresentam atividade biológica e promovem benefícios à saúde por possuírem atividade antioxidante, que protegem as células dos danos oxidativos e também apresentam uma ação anti-adipogênica e anti-inflamatória^(16,17,18,19).

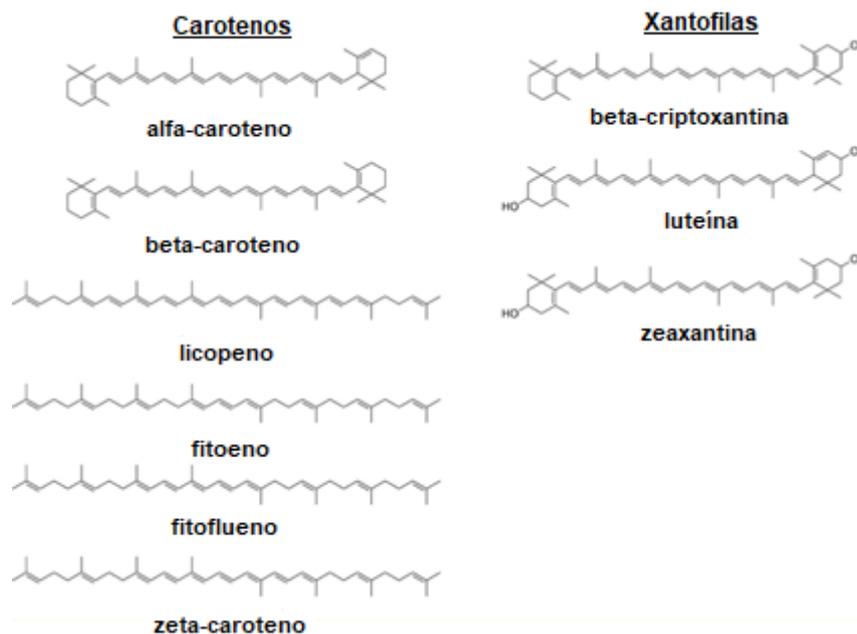
Desta forma, o presente estudo visa analisar o efeito da suplementação de carotenoides no processo inflamatório e estresse oxidativo renal em animais induzidos à obesidade através de uma dieta hiperlipídica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CAROTENOIDES

Os carotenoides são pigmentos encontrados na natureza e apresentam mais de 1100 estruturas diferentes. São hidrofóbicos, lipofílicos, insolúveis em água, porém solúveis em alguns solventes orgânicos. Geralmente, são tetraterpenóides, compostos de 40 átomos de carbono, mas também podem ser encontrados na natureza carotenoides com 30 e 50 átomos de carbono. Eles fornecem a coloração amarela, laranja e vermelha às frutas e vegetais^(18,20,21). Os carotenoides são divididos em dois grupos: carotenos – compostos de carbono e hidrogênio, como o β -caroteno e o licopeno; e grupo das xantofilas – são chamados também de carotenoides oxidados, pois apresentam oxigênio dentro da molécula, como por exemplo, luteína e zeaxantina. Sabe-se que apesar da grande quantidade de carotenoides existentes na natureza, menos de 50 deles estão presentes na dieta humana e, aproximadamente, metade pode ser encontrada no sangue e no tecido humano, sendo os principais encontrados na dieta e conseqüentemente no corpo humano: β -caroteno, α -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina e β -criptoxantina (Figura 1) ^(18,20,21,22,23,24).

Figura 1 - Estrutura química dos principais carotenoides incorporados na dieta



Fonte: Adaptado de Moran, Nancy E et al.⁽²³⁾.

Alguns desses carotenoides estão presentes em alimentos do cotidiano da dieta humana, como por exemplo o licopeno, que é o pigmento responsável pela coloração vermelha em

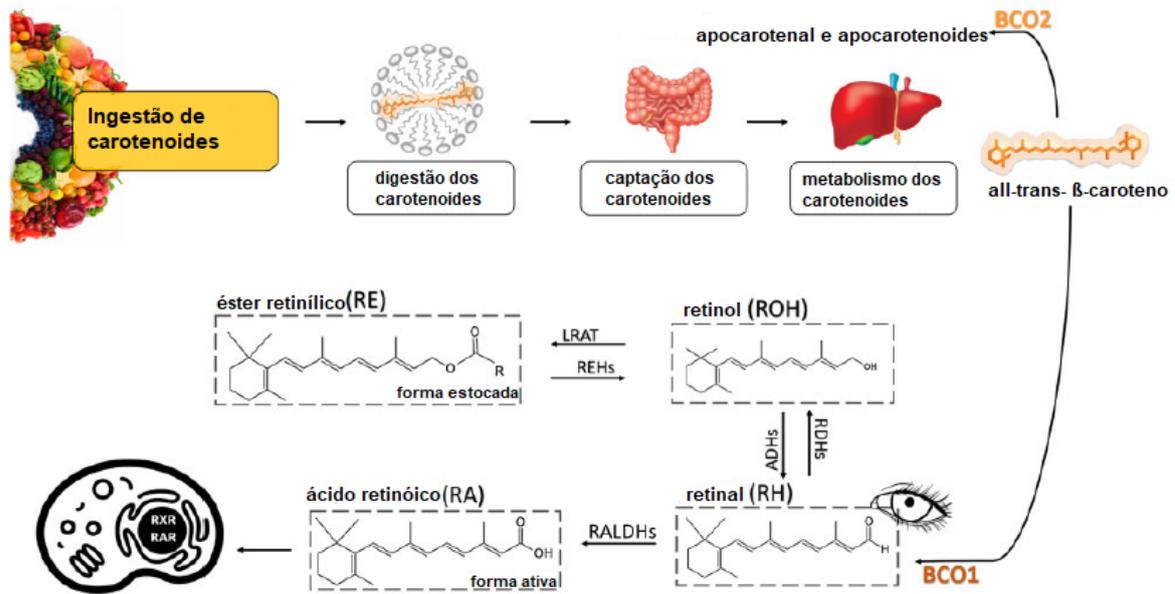
tomates maduros; a cor laranja das cenouras que contém β -caroteno; o pimentão vermelho que apresentam capsantina; a coloração rosa/avermelhada de crustáceos pela ação da astaxantina e a gema de ovo que é fonte de zeaxantina e luteína. Os carotenoides por serem insaturados estão sujeitos à oxidação por fatores como pH, luz e temperatura, que podem afetar tanto a cor quanto seu valor nutricional através de danos oxidativos aos carotenoides^(18,20,22,23,24,25).

Existem inúmeros fatores que podem influenciar positivamente e negativamente a absorção, o metabolismo e os efeitos dos carotenoides no organismo. Entre eles, a interação com outros carotenoides e nutrientes dietéticos. Segundo Corte-Real et al, durante a digestão, altas concentrações de minerais como cálcio, magnésio e zinco se relacionam com a diminuição da viscosidade e biodisponibilidade de carotenoides. Já o consumo de lipídios na dieta como óleos e gorduras aumentam efetivamente a absorção de carotenoides. Porém, a qualidade do lipídio consumido tem influência em sua absorção. Estudo de Goltz et al. apontou que a absorção de carotenoides, exceto do licopeno, foi maior quando o consumo esteve associado ao óleo de canola, rico em ácidos graxos monoinsaturados, em comparação ao óleo de soja, rico em ácidos graxos poli-insaturados^(23,26,27).

Durante o processo digestivo, a mastigação é capaz de dividir um alimento em partículas menores, aumentando a área de contato, o que leva a uma melhora na biodisponibilidade dos carotenoides. Após a ingestão, os carotenoides são separados das matrizes alimentares, emulsificados com gorduras e incorporados em micelas lipídicas no intestino delgado, onde serão absorvidos pelos enterócitos intestinais. No epitélio intestinal, a enzima β -Caroteno-15,15'-oxigenase (BCO1), que é uma dioxigenase responsável pela clivagem central de carotenoides provitamina A, converte parte dos carotenoides (β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina) em retinal e posteriormente, são reduzidos a retinol e transportados por quilomícrons ao fígado. Os carotenoides são encontrados em todo o corpo, porém o fígado é o principal local de armazenamento^(21,23,28,29).

Os alimentos vegetais fornecem carotenoides pró vitamínicos A, que são convertidos em vitamina A no organismo dos animais (Figura 2). A vitamina A, na forma de retinol, retinil, retinal e ácido retinóico é encontrada apenas em alimentos de origem animal^(21,30). Apesar da grande variedade de carotenoides disponíveis, apenas alguns deles são precursores de vitamina A. Para que um carotenoide seja considerado pró vitamínico A é necessário que ele apresente um anel β não substituído com uma cadeia de polieno C-11. Entre eles, o β -caroteno é o mais potente pró vitamínico A, com 100% de atividade atribuída e também é o carotenoide mais abundante nos alimentos, seja como menor ou principal componente do alimento, como por exemplo, cenoura e damasco^(21,31).

Figura 2 - Metabolismo de conversão de carotenoides em vitamina A



Fonte: Adaptado de Souza-Mesquita et al., 2020⁽³²⁾.

Os carotenoides que não são provitamina A também apresentam importantes funções fisiológicas, como prevenção de câncer, doenças cardiovasculares, doenças degenerativas e outras condições causadas por radicais livres. Este efeito pode ser atribuído à atividade antioxidante dos carotenoides através de mecanismos de extinção do oxigênio singlete e eliminação de radicais livres^(28,31).

2.2 CAROTENOIDES, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo deriva de um desequilíbrio entre a produção de moléculas pró e antioxidantes. As principais moléculas pró-oxidantes que se encontram elevadas no quadro de estresse oxidativo são as espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), o que inclui: oxigênio singlete, peróxidos lipídicos e óxido nítrico. Por outro lado, há uma redução na função da atividade de moléculas antioxidantes endógenas, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx). Entretanto, outras moléculas antioxidantes também podem ser obtidas de maneira exógena, através da dieta. Exemplos de antioxidantes provenientes da dieta são vitaminas A, C, E, flavonoides, antocianinas, carotenoides, cobre, zinco e selênio^(33,34).

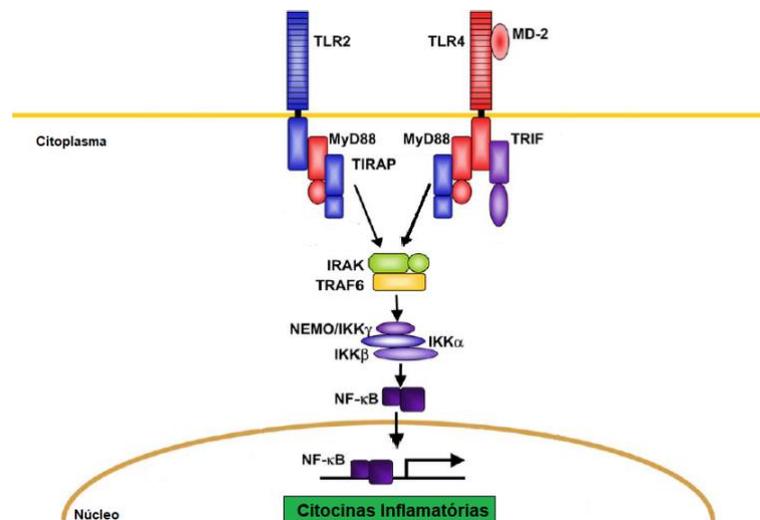
O ROS / RNS extracelular excessivo, caracterizado por malondialdeído (MDA), 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) e acúmulo de isoprastano, pode causar uma oxidação

em biomoléculas como RNA / DNA, lipídios ou proteínas, gerando modificações aberrantes, podendo levar a um quadro de inflamação sistêmica crônica. Esses estímulos inflamatórios induzem a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)^(33,34).

A via inflamatória que leva a essa inflamação sistêmica pode ser ativada através dos *toll-like receptors* (TLRs). Os TLRs são uma família de receptores transmembrana, com capacidade de reconhecimento específico de uma variedade de *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) ou ligantes endógenos, responsáveis por desencadear a formação de respostas celulares. Estes receptores podem ser agrupados em duas categorias: os TLRs que estão localizados intracelular, nos endossomos, e reconhecem, principalmente, ácidos nucleicos, derivados de vírus e bactérias sendo eles: TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 enquanto os TLRs de superfície celular, TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, reconhecem vários componentes bacterianos, como lipopeptídeos bacterianos (BLP) por TLR2 e lipopolissacarídeos (LPS) por TLR4. A literatura tem demonstrado que os TLRs desempenham papéis críticos em diversas doenças crônicas não transmissíveis^(35,36,37,38,39,40).

A sinalização celular necessária para a ativação dos TLR2 e TLR4 representa um mecanismo complexo, mediado através de reações envolvendo fosforilação e ubiquitinação de proteínas alvo que desencadeia o desacoplamento do fator nuclear *Kappa B* (NF κ B), por meio da fosforilação da sua proteína inibidora I κ -B. O NF κ B, uma vez liberado, migra para o núcleo ligando-se ao DNA, exacerbando a expressão gênica das citocinas relacionadas à inflamação (Figura 3)^(41,42).

Figura 3 - Cascata de sinalização dos receptores toll-like 4 e 2 (TLR4/TLR2).



Fonte: Adaptado de Takeda & Akira 2004⁽⁴³⁾.

A inflamação representa uma resposta importante do sistema imune apto. No entanto, indivíduos que apresentam inflamação crônica de baixo grau têm um sistema imunológico inato desregulado e estão mais propícios a processos infecciosos. A inflamação sistêmica está presente em várias condições e doenças, dentre elas as doenças renais^(33,34,44).

Os antioxidantes são substâncias que podem atrasar ou inibir a oxidação de um substrato. São formados por compostos enzimáticos como as enzimas superóxido-dismutase, glutatona- peroxidase e catalases e de compostos não enzimáticos como minerais, vitaminas e também pelos carotenoides^(14,45). A proteção antioxidante é fornecida pelos carotenoides acíclicos com nove ou mais duplas ligações conjugadas. Quanto mais duplas ligações, maior a eficácia. Desta forma, os carotenoides são capazes de remover do meio espécies altamente reativas^(46,47).

Os radicais livres, por possuírem elétrons desemparelhados de um átomo ou molécula, são instáveis e muito reativos. Essas características os tornam prejudiciais às muitas funções fisiológicas no organismo, pois uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celular^(48,49,50). Os carotenoides são capazes de interagir com os radicais livres de três maneiras principais: pela transferência de elétrons (equação 1), abstração de hidrogênio (equação 2) e adição de uma espécie de radical (equação 3) (Figura 4)⁽⁵¹⁾.

Figura 4 - Interação de carotenoides com radicais livres.



Fonte: Adaptado de Young, A. J., & Lowe, G. M. (2001)⁽⁵²⁾.

A eliminação dos radicais livres pelos carotenoides é dependente da natureza dos EROs. Os β -carotenos são muito reativos aos radicais peroxil, mas não são tão eficazes em resposta aos radicais OH e O^2 ^(47,51). Os β -carotenos são enfáticos neutralizadores de EROS e sequestradores de radicais livres, à baixas pressões parciais de oxigênio, como as encontradas nos tecidos de mamíferos. Assim, exercem sua atividade antioxidante reagindo com radicais livres, preferencialmente, com peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e com o oxigênio molecular singlete, inibindo a peroxidação lipídica no interior das membranas, mantendo sua integridade e fluidez^(47,53,54).

2.3 CAROTENOIDES, INFLAMAÇÃO E FUNÇÃO RENAL

Fatores como drogas, toxinas, além da própria inflamação, lesam os túbulos renais. Essas lesões provocam respostas inflamatórias que resultam em fibrose renal, por meio das ações de moléculas imunoestimulatórias, que são chamadas de DAMPs (padrões moleculares associados a danos). DAMPs são moléculas heterogêneas, podendo ser tanto moléculas intracelulares liberadas no processo de necrose celular quanto moléculas presentes na remodelação da matriz extracelular^(52,55).

Há três tipos de morte celular em mamíferos: apoptose, necrose e autofagia. A necrose, é considerada uma “morte acidental”, ou seja, não programada das células. Ocorrem alterações morfológicas das organelas celulares como retículo endoplasmático, há perda da integridade da membrana plasmática com lise celular e extravasamento de conteúdo intracelular. As espécies reativas de oxigênio podem ser responsáveis pela necrose^(56,57).

Nas últimas décadas, tornou-se evidente que a necrose também pode ser considerada um modo alternativo de morte celular programada, ou chamada de "necroptose". Esse termo refere-se a uma morte regulada, que apesar de distinta a apoptose, apresenta vários receptores de morte como TNFR1 (Receptor TNF α 1) e TNFR2 (Receptor TNF α 2), TRAILR1 (Receptor TRAIL 1) e TRAILR2 (Receptor TRAIL 2) em comum. A necroptose também pode ser iniciada por PRR (receptor de reconhecimento de patógenos) que detectam PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) ou quando DAMPS entram na circulação e ativam células imunes inatas. Desta forma, a morte celular atua como alerta para o organismo sobre a necessidade de respostas defensivas/reparadoras. E dentre os três tipos de morte celular, está presente na literatura que a morte celular induzida por lesão envolve, principalmente, a morte por necrose regulada^(56,57).

Os TLRs são divididos em subfamílias e cada uma delas reconhece PAMPs diferentes. Os TLR4 encontram-se na superfície celular e reconhecem LPS^(58,59). Nos rins, a expressão de TLR4 localiza-se, majoritariamente, no epitélio tubular, mas também pode ser encontrada nos glomérulos e no endotélio vascular⁽⁶⁰⁾. A ativação de TLR4 induz à produção de citocinas pró inflamatórias, como TNF α , IL-1 β e IL-6. Em grandes concentrações essas citocinas tornam-se nocivas aos rins^(59,61).

Inúmeras doenças renais podem ser causadas por distúrbios no metabolismo de lipídios⁽⁶⁰⁾. Um estudo de Zhang et al. realizado com camundongos, mostrou que uma dieta hiperlipídica prolongada gera um depósito ectópico de lipídios nos rins e aumenta concentrações renais de citocinas pró inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-18 e TNF- α , o que

pode gerar uma disfunção renal. Este mesmo estudo também elucidou o efeito benéfico do resveratrol, uma antitoxina polifenólica, na redução da inflamação renal de camundongos resistentes à insulina alimentados com dieta hiperlipídica⁽⁶²⁾.

Assim, é possível sugerir que há uma relação entre o aumento de estresse oxidativo e o estado pró-inflamatório renal promovidos por fatores externos, como o consumo de uma dieta hiperlipídica. Da mesma forma, o consumo de carotenoides pode ser sugerido como fator protetor, prevenindo a instalação de um processo inflamatório e estresse oxidativo exacerbado.

3. HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é de que a suplementação de carotenoides em animais alimentados com dieta hiperlipídica pode exercer um efeito protetivo no tecido renal contra o processo oxidativo e inflamatório de baixo grau gerado pelo aumento na concentração de lipídios circulantes e na deposição de gordura ectópica provindos do consumo de uma dieta obesogênica.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da suplementação de carotenoides no status inflamatório e estresse oxidativo renal de ratos Wistar adultos alimentados com dieta hiperlipídica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evolução do peso corporal e comprimento;
- Eficiência metabólica;
- Concentração sérica de triacilglicerol, colesterol e frações, e lipopolissacarídeos (LPS);
- Analisar atividade antioxidante: catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) no rim; e o acúmulo de proteínas carboniladas (PC) e malondialdeído (MDA) nos rins;
- Analisar a concentração de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) e anti-inflamatória (IL-10) no rim.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DESENHO EXPERIMENTAL

O presente estudo integra um projeto de doutorado intitulado “Extração de carotenoides de *Bactris gasipaes* com líquidos iônicos e sua aplicação em modelo de programação metabólica”, previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA-UNIFESP) sob o n° 1193300317. Este projeto também foi submetido e aprovado pela CEUA-UNIFESP sob o n° 6088081121 (**Anexo 1**), respeitando os padrões estabelecidos pela diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos proposta pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal - CONCEA em 2013⁽⁶³⁾.

Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em gaiolas coletivas no Biotério Central – UNIFESP *campus* Baixada Santista. A temperatura ambiente da sala foi mantida em $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade do ar mantida em $60 \pm 5\%$ com ciclo claro/escuro de 12/12 horas.

Foram utilizados ratos Wistar machos, com idade de 90 dias, procedentes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina – UNIFESP (CEDEME). Após uma semana de aclimação, os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, e então suplementados por 1 semana por gavagem (óleo de girassol como veículo) com o extrato de carotenoides, ou apenas por óleo de girassol, em ambos os modelos de dieta controle (C), ou hiperlipídica (HFD), conforme descrito abaixo.

- **Grupo CTL:** Dieta controle *ad libitum* associado à gavagem com óleo de girassol;
- **Grupo CTL-C:** Dieta controle *ad libitum* associado à gavagem com extrato rico em carotenoides;
- **Grupo HFD:** Dieta hiperlipídica *ad libitum* associado à gavagem com óleo de girassol;
- **Grupo HFD-C:** Dieta hiperlipídica *ad libitum* associada à gavagem com extrato rico em carotenoides.

Os animais alocados no grupo controle foram alimentados com ração comercial padrão para roedores Nuvilab CR1 (Nuvital, Brasil), a composição da dieta hiperlipídica segundo Dornellas et al.⁽⁶⁴⁾ conforme descrita na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais

Componentes	Dieta (g/100g)	
	CTL	HFD
Dieta padrão *	100	50
Sacarose	-	10
Caseína	-	20
Óleo de soja	-	2
Banha de porco		18
Butil-hidroquinona	-	0,004
Mix de minerais® §		0,5
Mix de vitaminas® &		1,75
Energia (Kcal/100g)	270	410

Fonte: Dornellas et al, 2015

* Foi utilizada a ração comercial padrão para roedores Nuvilab CR1® (Nuvital, Brasil); § mistura mineral (AIN-93M, mistura mineral, Rhoster, Brasil); & mistura de vitaminas (AIN-93M, mistura de vitaminas, Rhoster, Brasil).

Durante o período experimental agudo de 7 dias os grupos receberam as respectivas dietas e água *ad libitum*. O ganho de massa corporal dos animais e o consumo de dieta foi aferido diariamente durante o período experimental. Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório e eutanasiados por decapitação no período da manhã, após jejum de 12 horas. As amostras de soro e tecido renal foram coletadas e armazenadas a -80 °C para análises futuras.

A obtenção dos extratos ricos em carotenoides foi realizada a partir do mesocarpo e exocarpo de frutos de pupunha (*Bactris gasipaes*) coletados no estado da Bahia, região nordeste do Brasil. A extração dos carotenoides a partir da polpa do fruto da pupunha foi realizada com auxílio de solventes alternativos (C4mim] Cl e [C4mim] [PF6]).

5.2 DOSE DE SUPLEMENTAÇÃO DE CAROTENOIDES

A dose de 1mg de carotenoide/kg de peso do rato foi escolhida com base no artigo de GRASA-LÓPEZ et al.⁽⁶⁵⁾ como dose efetiva, fisiológica e não tóxica para suplementação. O extrato usado no presente estudo continha em 143 µg de carotenoides/g de extrato, sendo os carotenoides mais prevalentes *all-trans*-β-caroteno 45,34 µg/g, *all-trans*-licopeno 15,23 µg/g e *all-trans*-γ-caroteno 19,38 µg/g, considerando o peso médio da pupunha úmida de 57 g (sendo que a umidade da pupunha é de 66 %). A partir disto, a dose proporcional para o consumo humano foi calculada com base nos fatores alométricos propostos pela *Food and Drug Administration*⁽⁶⁶⁾, concluindo que, para um humano adulto de 70 Kg, a dose escolhida de 1mg/Kg, corresponde ao consumo de 4 frutas úmidas. Esse consumo representaria 2 porções frutas ao dia, o que pode ser incluído em um plano alimentar saudável, respeitando as recomendações dietéticas para uma dieta balanceada.

5.3 ANÁLISES SÉRICAS

Foram verificadas as concentrações séricas de triacilglicerol (TAG), colesterol total e HDL-c (Labtest®). Os níveis de LDL-c foram estimados indiretamente pela equação de Friedewald ($LDL-c = CT - (HDL-c) (TG/5)$)⁽⁶⁷⁾. As análises seguiram as recomendações dadas pelos fabricantes nos manuais que acompanham os produtos.

5.4 ANÁLISE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A análise das atividades de catalase (CAT), e superóxido dismutase (SOD) foram realizadas com o sobrenadante obtido de amostras homogeneizadas de 100 mg de amostras de tecido do rim direito (homogeneizador *Tissue Master 125*, OMNI) em tampão fosfato e centrifugadas a 4000 g a 5°C por 10 minutos. A atividade de CAT foi avaliada de acordo com o método de Aebi⁽⁶⁸⁾ pela mensuração da cinética de decomposição do peróxido de hidrogênio. Já a atividade da SOD foi avaliada pelo método de pirogallol, baseado na habilidade desta enzima de catalisar a reação do superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio.

5.5 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA)

As amostras do rim esquerdo foram rapidamente homogeneizadas em 800µL de tampão específico [Trizma base 100 mM pH 7,5, EDTA 20 mM, fluoreto de sódio 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF (Fluoreto de Fenilmetilsulfonila) 2 mM e 0.1 mg de aprotinina por mL], adiciona-se 80 µL de 1% Triton X-100. Após 30 minutos

de incubação as amostras foram centrifugadas por 40 minutos a 20.800 x g a 4°C. O sobrenadante foi coletado e o teor de proteínas determinado por método de Bradford (*LGC Laboratories, Inc., Cotia, SP, Brasil*) usando como referência a albumina de soro bovino (*Amresco Inc., Ohio, EUA*). Os extratos proteicos foram submetidos à análise em kits comerciais espécie-específico para quantificar TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 por método de ELISA (*R&D Systems®*).

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de Grubbs' (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA*) para a remoção de *outliers*. As amostras foram consideradas *outliers* quando o valor de alfa foi ≤ 0.05 . As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via ou ANOVA para medidas repetidas seguida do teste *post hoc* de Tukey. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa IBM SPSS Statistics 22. As demais tarefas foram realizadas no programa Microsoft Excel 2010. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e o nível de significância adotado foi de $p \geq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 EVOLUÇÃO DO GANHO DE PESO CORPORAL E TECIDOS

Quanto ao ganho de massa corporal, a figura 5 [A] mostra a evolução do peso corporal (em gramas) analisado todos os dias durante os 7 dias de experimento. Podemos observar que os animais alimentados com dieta HFD apresentaram um ganho de peso expressivo comparado com os animais alimentados com dieta controle (CTL e CTL-C) a partir do quarto dia de consumo ($p < 0,05$). Também se destaca o fato de que o grupo HFD-C apresentou menor ganho de peso comparado ao grupo HFD apesar de expostos ao mesmo tipo de dieta, demonstrando o efeito protetor da suplementação de carotenoides no grupo HFD-C. A respeito do comprimento naso-anal, os resultados da figura 5 [B] apontam um ligeiro aumento do grupo HFD comparado ao CTL-C e ao HFD-C ($p < 0,05$). Conforme a figura 5 [C] a eficiência metabólica da dieta se mostrou maior no grupo CTL-C em comparação com os demais grupos experimentais. A figura 5 [D] mostra o peso relativo dos rins (g/100g de peso) dos animais dos grupos ao fim do experimento. Verificamos que os animais dos grupos tratados apresentaram menor peso relativo desse tecido quando comparado com os demais grupos experimentais ($p < 0,05$).

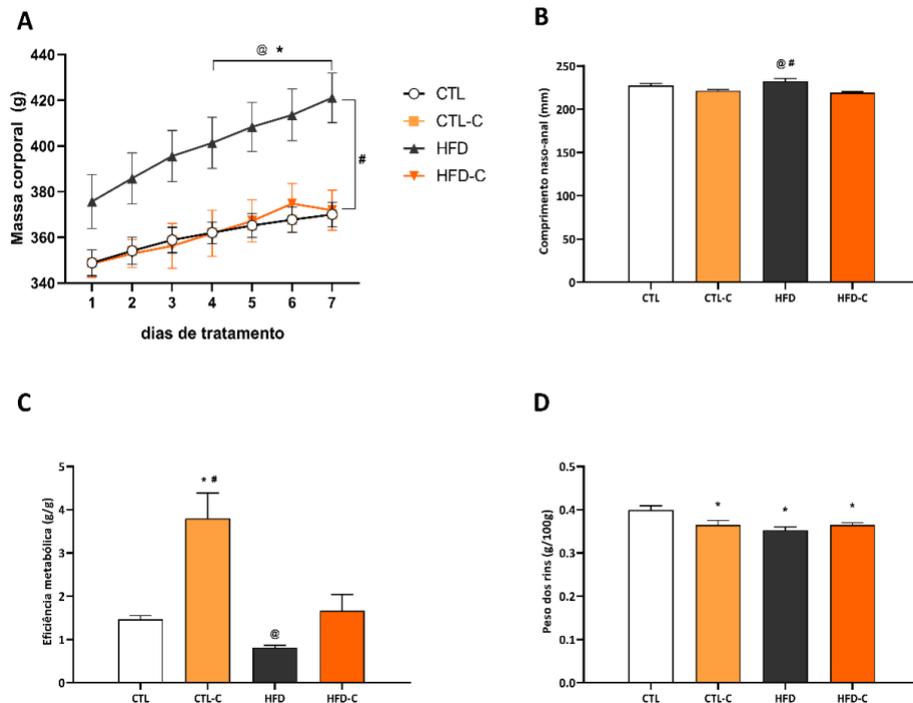


Figura 5 - [A] Evolução de ganho de massa corporal; [B] média de comprimento naso-anal; [C] eficiência metabólica da dieta (g de ingestão de dieta / g de ganho de peso); [D] peso relativos dos rins (g/100g de peso). * $p < 0,05$ comparado ao grupo CTL; # $p < 0,05$ comparado ao grupo HFD-C; @ $p < 0,05$ comparado ao grupo CTL.

0.05 comparado ao grupo CTL-C (n=6-8 por grupo). As comparações foram realizadas por ANOVA de uma via ou ANOVA para medidas repetidas e teste post hoc de Tukey.

6.2 ANÁLISE DE CONCENTRAÇÕES DE BIOMARCADORES SÉRICOS

Os parâmetros bioquímicos analisados no soro foram: triacilglicerol, colesterol total e frações (HDL, LDL, VLDL), e lipopolissacarídeos (LPS). Os resultados demonstrados na figura 6 [A] mostraram que não houve alteração estatisticamente significativa de triacilgliceróis séricos. Assim como o colesterol total [B] e a fração de VLDL [E]. A fração de HDL [C] apresentou um aumento significativo no grupo HFD-C em relação aos dois grupos alimentados com dieta controle – CTL e CTL-C ($p < 0,05$). Já as concentrações de LDL [D] foram reduzidas no grupo HFD comparado ao grupo CTL, sendo que não houve diferença nos grupos suplementados com carotenoides. Após os 7 dias de tratamento, não houve diferença estatística nas concentrações de LPS.

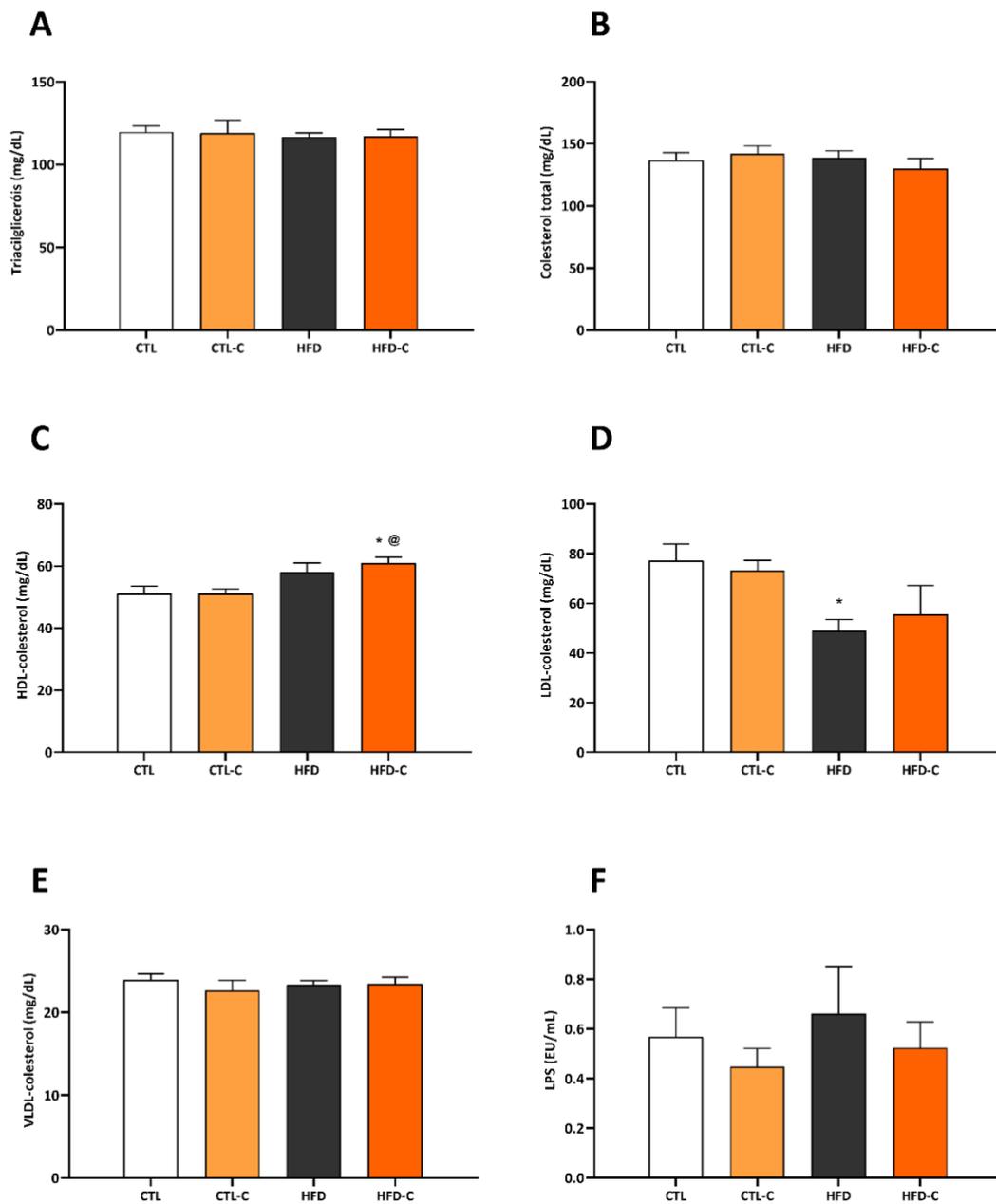


Figura 6 - Níveis séricos ao final do período experimental de: [A] Triacilgliceróis; [B] Colesterol total; [C] HDL-colesterol; [D] LDL-colesterol; [E] VLDL-colesterol e [F] Lipopolissacarídeos (LPS). * $p < 0.05$ comparado ao grupo CTL; # $p < 0.05$ comparado ao grupo HFD-C; @ $p < 0.05$ comparado ao grupo CTL-C ($n = 6-8$ por grupo). As comparações foram realizadas por ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey.

6.3 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS RINS

As concentrações do marcador de peroxidação lipídica, malondialdeído (MDA), se mostraram elevadas no grupo HFD em comparação aos grupos CTL e HFD-C ($p < 0,05$) demonstrado na figura 7 [A]. Já a figura 7 [B] apontou concentrações de proteínas carboniladas, marcadores de oxidação de proteínas, elevadas nos rins dos animais alimentados com dieta hiperlipídica (grupo HFD) comparado aos demais grupos experimentais. Além disso, o grupo alimentado com dieta hiperlipídica associada à carotenoides (HFD-C) apresentou maiores concentrações de proteínas carboniladas em comparação ao grupo CTL ($p < 0.05$). Avaliando a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) nos rins, foi possível observar um aumento expressivo de SOD nos grupos que receberam a suplementação de carotenoides (CTL-C e HFD-C) comparado aos grupos HFD e CTL (figura 7 [C]). Considerando a atividade antioxidante da enzima catalase (CAT), é possível afirmar que a dieta hiperlipídica reduziu sua atividade no grupo HFD comparado aos demais grupos experimentais. No entanto a suplementação de carotenoides foi capaz de reverter este efeito conforme observado no grupo HFD-C com aumento da atividade da catalase em comparação aos grupos CTL e CTL-C ($p < 0.05$). O conjunto desses resultados sugere uma associação do estresse oxidativo renal e a ingestão excessiva de lipídios, com efeito protetor promovido pela suplementação de carotenoides.

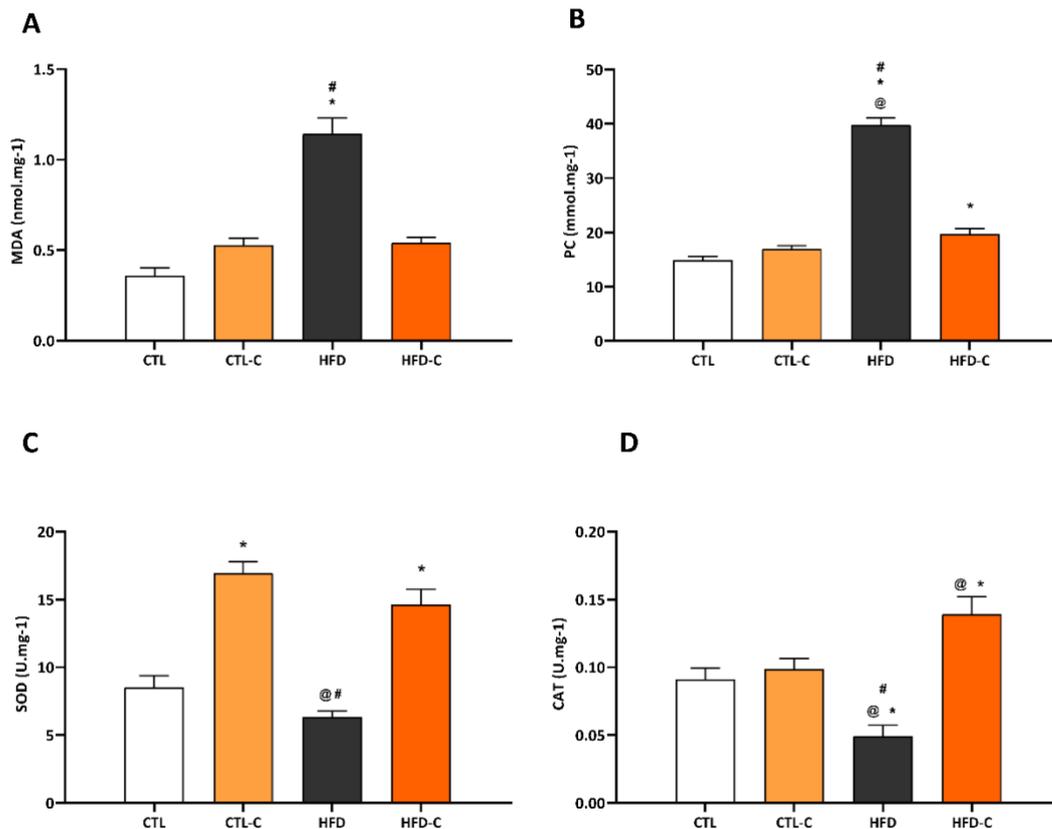


Figura 7 - Marcadores de estresse oxidativo nos rins: [A] Malondialdeído (MDA); [B] Proteínas carboniladas (PC); [C] Enzima superóxido dismutase (SOD); [D] Enzima catalase (CAT). * $p < 0.05$ comparado ao grupo CTL; # $p < 0.05$ comparado ao grupo HFD-C; @ $p < 0.05$ comparado ao grupo CTL-C ($n = 6-8$ por grupo). As comparações foram realizadas por ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey.

6.4 CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS NOS RINS

A concentração da citocina pró inflamatória Fator de necrose tumoral α (TNF- α) foi significativamente alterada após os 7 dias de dieta hiperlipídica no grupo HFD comparado ao grupo CTL ($p < 0,05$) (Figura 8 [B]). A concentração das demais citocinas pró-inflamatórias avaliadas - Interleucina 1 β (IL-1 β) e Interleucina-6 (IL-6) - não foram alteradas no tecido renal (Figura 4 [A], [C]). O grupo HFD também apresentou redução de Interleucina-10 (IL-10) ($p < 0,05$) em relação aos grupos CTL e HFD-C, demonstrando o efeito anti-inflamatório protetor dos carotenoides (Figura 4 [D]).

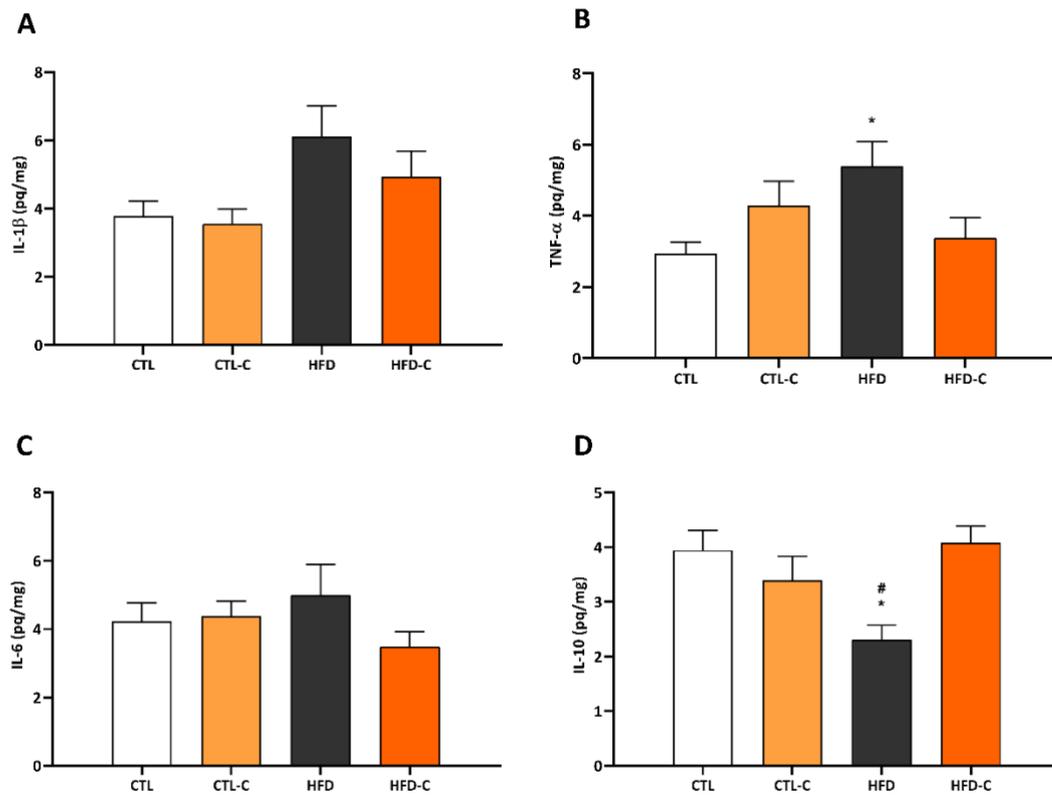


Figura 8 - Concentração de citocinas nos rins: [A] Interleucina 1β (IL-1β); [B] Fator de necrose tumoral α (TNF-α); [C] Interleucina-6 (IL-6); [D] Interleucina-10 (IL-10). * $p < 0.05$ comparado ao grupo CTL; # $p < 0.05$ comparado ao grupo HFD-C; @ $p < 0.05$ comparado ao grupo CTL-C ($n = 6-8$ por grupo). As comparações foram realizadas por ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo elucidou os efeitos protetores da suplementação de carotenoides associados a uma dieta obesogênica no tecido renal. Os efeitos benéficos atribuídos à ingestão de carotenoides são bem conhecidos e amplamente descritos na literatura como uma molécula precursora de vitamina A, prevenindo patologias associadas à hipovitaminose⁽⁶⁹⁾. Além disso, os carotenoides são geralmente descritos como moléculas antioxidantes potentes que exercem efeitos protetores contra o estresse oxidativo, mitigando espécies reativas de oxigênio (ROS) e promovendo resultados anti-inflamatórios⁽⁷⁰⁾.

A homeostase lipídica é fundamental para a manutenção da saúde humana⁽⁷¹⁾. Dietas desequilibradas de longo prazo alteram o metabolismo lipídico gerando obesidade e distúrbios metabólicos relacionados⁽⁷²⁾. De acordo com o estudo de Hairiri et al, dietas com alto teor de ácidos graxos saturados são mais obesogênicas do que as de alto teor de mono e poli-insaturados. Isso ocorre porque as gorduras saturadas são usadas de forma menos eficiente pelo organismo para a produção de energia e assim, são facilmente armazenadas nos tecidos⁽⁷³⁾.

Uma das consequências da HFD prolongada é a lipotoxicidade, proveniente do desequilíbrio da captação e descarte de lipídios, gerando acúmulo desses lipídios, primeiramente, nos tecidos adiposos, e quando este tecido não é mais capaz de armazenar esse excesso de calorias, a gordura é depositada em outros órgãos como fígado e rins⁽⁷⁴⁾.

Nessa perspectiva, um estudo de Gammone; D'Orazio revelou que a fucoxantina, um carotenoide presente em algas, pode exercer um efeito anti-obesogênico por meio de diversos mecanismos, como a diminuição dos níveis de triacilglicerol plasmático e hepático, ^(72,75) e também causam um efeito positivo nas enzimas reguladoras de colesterol, como: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase e acil-coenzima A como foi apontado na pesquisa de Hu et al.⁽⁷⁶⁾.

A fucoxantina é convertida em fucoxantanol e pode ser armazenado em diversos órgãos, entre eles, nos rins ⁽⁷⁷⁾. Porém sua absorção vai depender da matriz alimentar, sendo mais solúvel em óleo de peixe do que óleo de soja, por exemplo. É importante pontuar que os carotenoides dependem das micelas intestinais para serem absorvidos. Desta forma, um consumo adequado de lipídios aumenta a eficácia da absorção de carotenoides e assim, o organismo pode usufruir ainda mais dos seus efeitos benéficos⁽⁷⁸⁾.

Concomitante a esse estudo, a pesquisa de Maeda et al., também examinou os efeitos anti-obesogênicos e antidiabéticos da associação de fucoxantina e lipídios na obesidade induzida por HFD e constatou que dieta rica em gordura com suplementação de fucoxantina

pode reduzir o risco de dislipidemias em camundongos, visto que os níveis de colesterol LDL foram menores nos grupos que receberam a suplementação em comparação ao grupo controle de dieta hiperlipídica⁽⁷⁵⁾. Os resultados do presente estudo não apontaram uma redução de LDL nos grupos suplementados, porém a concentração de HDL foi maior no grupo HFD-C do que nos grupos de dieta controle.

Outro carotenoide com potente efeito antioxidante é a astaxantina, um pigmento de cor vermelha, que pertence a subclasse das xantofilas, capaz de gerar efeitos inibitórios no desenvolvimento de doenças associadas ao estresse oxidativo e disfunção mitocondrial⁽⁷⁹⁾. Como as mitocôndrias são a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (EROS), elas tendem a ser alvo das EROS em situações patológicas. Pois em condições normais, antioxidantes como, SOD, CAT e glutathione peroxidase, removem as espécies reativas de oxigênio mitocondriais, porém em situações patológicas há o acúmulo dos radicais oxidantes que causam respostas inflamatórias, gerando disfunção celular e apoptose em diversos órgãos, como nos rins^(80,81). Tais resultados podem ser exemplificados no presente estudo, visto que os ratos alimentados apenas com HFD, apresentaram as menores quantidades de enzimas antioxidantes nos rins, enquanto os grupos que receberam o extrato de carotenoides apresentaram os maiores valores.

Já está consolidado em literatura a respeito da associação de obesidade com diabetes, pois o aumento da adiposidade é um dos principais fatores para o desenvolvimento da diabetes. Um estudo de Sila et al. testou os efeitos da astaxantina em ratos diabéticos e obteve resultados promissores a respeito do carotenoide. O estudo mostrou que os ratos diabéticos que suplementaram astaxantina obtiveram uma expressiva redução dos níveis de MDA no plasma (42%) e nos rins (38%) em comparação ao grupo que não fez uso da suplementação^(82,83). Essas evidências vêm em encontro aos resultados apresentados nesta pesquisa, já que a suplementação de carotenoides foi capaz de reduzir significativamente os níveis de MDA no tecido renal do grupo HFD-C, provendo efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido pelo consumo de HFD.

Por fim, na pesquisa de Li et al., no qual a suplementação de licopeno no tratamento de ratos diabéticos reduziu a formação de MDA e aumentou a atividade de SOD nos tecidos renais, comprovando seu potente efeito antioxidante no diabetes, o presente estudo revelou que os níveis de MDA e PC renais no grupo HFD-C foram significativamente menores que o grupo de dieta hiperlipídica não recebeu a suplementação e a atividade renal de SOD E CAT que diminuíram no grupo HFD, aumentou expressivamente no grupo que recebeu tratamento⁽⁸⁴⁾.

A inflamação é um dos principais fatores na fisiopatologia da obesidade. O excesso de gordura visceral, gera inflamação e estresse oxidativo pela ação de citocinas inflamatórias, como: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas 6 (IL-6). Essa ação pode gerar complicações como, resistência à insulina, hipertensão e dislipidemia, que contribuem para a progressão da lesão renal na obesidade^(85,86).

As citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , são mediadas pela ativação de vias de sinalização de inflamassomas, que são componentes moleculares do sistema imune inato. A ativação desencadeia as respostas inflamatórias e pode ser avaliada através de análise de inflamassomas e/ou citocinas pró-inflamatórias em células imunes^(87,88). À luz desses fatos, um estudo de Lee et al., teve como objetivo analisar efeitos da fucoxantina em resposta a citocinas pró-inflamatórias através de inflamação estimulada por LPS/ATP, usando macrófagos e células dendríticas derivados de medula óssea medidas por ensaio ELISA. O estudo concluiu que a fucoxantina diminuiu a secreção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α induzida por LPS / ATP nos macrófagos derivados de medula óssea e nas células dendríticas houve redução dos níveis de IL-1 β e IL-6⁽⁸⁸⁾. Estes estudos corroboram os achados presentes, onde a suplementação de carotenoides foi capaz de modular a concentração de citocinas relacionadas à via da inflamação no tecido renal. Nossos dados mostram que os carotenoides foram capazes de proteger contra os efeitos deletérios da HFD atuando especificamente sobre a concentração de TNF- α e IL-10, promovendo um efeito anti-inflamatório no grupo HFD-C.

Desta forma, assim como citado, diversos estudos com diferentes tipos de carotenoides e de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, os carotenoides surgem como uma proposta de intervenção para os danos renais causados pelo estresse oxidativo gerado pelo consumo excessivo e prolongado de lipídios.

8. CONCLUSÃO

Em conclusão, a suplementação de carotenoides mostrou propriedades protetoras contra os efeitos negativos da ingestão de HFD, não apenas no ganho de massa corporal, mas também no metabolismo. O presente estudo apontou fortes evidências de que os carotenoides provenientes do fruto da pupunha (*Bactris gasipaes*) exercem efeitos positivos sobre o estresse oxidativo e processo inflamatório gerando uma diminuição dos marcadores de estresse e reduzindo os valores de citocinas pró inflamatórias renais em ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Portanto, o carotenoide pode ser considerado uma ferramenta promissora no controle dos efeitos deletérios decorrentes da obesidade.

● REFERÊNCIAS

1. (WHO) World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva, Switzerland: WHO 2000. (WHO Technical Report Series, n. 894).
2. Effting PS, Brescianini SMS, Sorato HR, Fernandes BB, Fidelis GDSP, Silva PRLD, Silveira PCL, Nesi RT, Ceddia RB, Pinho RA. Resistance Exercise Modulates Oxidative Stress Parameters and TNF- α Content in the Heart of Mice with Diet-Induced Obesity. *Arq Bras Cardiol.* 2019 May;112(5):545-552. doi: 10.5935/abc.20190072.
3. ANJOS, LA. Agravos à saúde e epidemiologia da obesidade. In: *Obesidade e saúde pública* [online]. 2006; (20):29-39
4. Silva Junior GB, Bentes AC, Daher EF, Matos SM. Obesity and kidney disease. *J Bras Nefrol.* 2017 Mar;39(1):65-69. doi: 10.5935/0101-2800.20170011.
5. Kopple JD, Feroze U. The effect of obesity on chronic kidney disease. *J Ren Nutr.* 2011 Jan;21(1):66-71. doi: 10.1053/j.jrn.2010.10.009.
6. Das UN. Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition.* 2001 Nov-Dec;17(11-12):953-66. doi: 10.1016/s0899-9007(01)00672-4.
7. Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc.* 2001 Aug;60(3):349-56. doi: 10.1079/pns2001110.
8. Speretta GFF, Leite RD, Duarte, ACGO. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF- α e IL-10. *Rev. HUPE.* 2014; 13 (1):61-69. doi:10.12957/rhupe.2014.9807
9. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004 Dec;114(12):1752-61. doi: 10.1172/JCI21625.
10. Zielinska-Blizniewska H, Sitarek P, Merez-Sadowska A, Malinowska K, Zajdel K, Jablonska M, Sliwinski T, Zajdel R. Plant Extracts and Reactive Oxygen Species as Two Counteracting Agents with Anti- and Pro-Obesity Properties. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 14;20(18):4556. doi: 10.3390/ijms20184556.
11. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1245049. doi: 10.1155/2016/1245049.
12. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:8416763. doi: 10.1155/2017/8416763.
13. Vasconcelos, SML, Goulart, MOF, Moura, JBF, Manfredini, V, Benfato, MS, Kubota, LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quím Nova.* 2007 Out; 30(5): 1323-38. doi: 10.1590/S0100-40422007000500046.
14. Navarro, MEL, Dos Santos KC, Nascimento, AF, Francisqueti, FV, Minatel, IG, Pierine, DT, Luvizotto, RAM, Ferreira, ALA, Corrêa, CR. Inflamação renal, alterações metabólicas e oxidativas após 6 semanas de dieta de cafeteria em ratos. *J. Bras. Nefrol.* 2016 Mar; 38(1):9-14. doi:10.5935/0101-2800.20160003.
15. Pierine DT, Navarro ME, Minatel IO, Luvizotto RA, Nascimento AF, Ferreira AL, Yeum KJ, Corrêa CR. Lycopene supplementation reduces TNF- α via RAGE in the kidney of obese rats. *Nutr Diabetes.* 2014 Nov 10;4(11):e142. doi: 10.1038/nutd.2014.39.
16. Mesquita, SS, Teixeira, CMLL, Servulo, EFC. Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Mercado. *Rev. Virtual Quim.* 2017 Abr 17: 9(2).

17. Martins, N, Roriz, CL, Morales, P, Barros, L, Ferreira, ICFR. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agroindustries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science & Technology*. 2016 Jun; 52: 1-15. doi: 10.1016/j.tifs.2016.03.009
18. Bohn T. Carotenoids and Markers of Oxidative Stress in Human Observational Studies and Intervention Trials: Implications for Chronic Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2019 Jun 17;8(6):179. doi: 10.3390/antiox8060179.
19. Bonet ML, Canas JA, Ribot J, Palou A. Carotenoids in Adipose Tissue Biology and Obesity. *Subcell Biochem*. 2016;79:377-414. doi: 10.1007/978-3-319-39126-7_15.
20. Uenojo, M, Junior, MRM, Pastore, GM, Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Quim. Nova [online]*. 2007; 30(3):616-22. doi: 10.1590/S0100-40422007000300022.
21. Ambrósio, CLB, Campos, FACS, Faro, ZP. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. *Rev. Nutr. [online]* 2006; 19(2):233-43. doi: 10.1590/S1415-52732006000200010.
22. Gomes, FS. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. *Rev. Nutr. [online]*. 2007; 20(5):537-48. doi: 10.1590/S1415-52732007000500009.
23. Moran NE, Mohn ES, Hason N, Erdman JW Jr, Johnson EJ. Intrinsic and Extrinsic Factors Impacting Absorption, Metabolism, and Health Effects of Dietary Carotenoids. *Adv Nutr*. 2018 Jul 1;9(4):465-492. doi: 10.1093/advances/nmy025.
24. Milani A, Basirnejad M, Shahbazi S, Bolhassani A. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *Br J Pharmacol*. 2017 Jun;174(11):1290-1324. doi: 10.1111/bph.13625.
25. Tan BL, Norhaizan ME. Carotenoids: How Effective Are They to Prevent Age-Related Diseases? *Molecules*. 2019 May 9;24(9):1801. doi: 10.3390/molecules24091801.
26. Corte-Real J, Iddir M, Soukoulis C, Richling E, Hoffmann L, Bohn T. Effect of divalent minerals on the bioaccessibility of pure carotenoids and on physical properties of gastro-intestinal fluids. *Food Chem*. 2016 Apr 15;197(Pt A):546-53. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.10.075.
27. Goltz SR, Campbell WW, Chitchumroonchokchai C, Failla ML, Ferruzzi MG. Meal triacylglycerol profile modulates postprandial absorption of carotenoids in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2012 Jun;56(6):866-77. doi: 10.1002/mnfr.201100687.
28. Priyadarshani AM. A review on factors influencing bioaccessibility and bioefficacy of carotenoids. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017 May 24;57(8):1710-1717. doi: 10.1080/10408398.2015.1023431.
29. Bohn T, Desmarchelier C, Dragsted LO, Nielsen CS, Stahl W, Rühl R, Keijer J, Borel P. Host-related factors explaining interindividual variability of carotenoid bioavailability and tissue concentrations in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2017 Jun;61(6):1600685. doi: 10.1002/mnfr.201600685.
30. Campos, FM, Rosado, GP. Novos fatores de conversão de carotenóides provitamínicos A. *Food Sci. Technol. [online]*. 2005 Set; 25(3):571-78. doi: 10.1590/S0101-20612005000300029
31. Rodriguez-Amaya, D.B. (1999). *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*.
32. de Souza Mesquita LM, Mennitti LV, de Rosso VV, Pisani LP. The role of vitamin A and its pro-vitamin carotenoids in fetal and neonatal programming: gaps in knowledge and metabolic pathways. *Nutr Rev*. 2021 Jan 1;79(1):76-87. doi: 10.1093/nutrit/nuaa075. .
33. Iddir M, Brito A, Dingeo G, Fernandez Del Campo SS, Samouda H, La Frano MR, Bohn T. Strengthening the Immune System and Reducing Inflammation and Oxidative Stress through Diet and Nutrition: Considerations during the COVID-19 Crisis. *Nutrients*. 2020 May 27;12(6):1562. doi: 10.3390/nu12061562.

34. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MC, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:7432797. doi: 10.1155/2016/7432797.
35. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1793-801. doi: 10.1172/JCI29069. Erratum in: *J Clin Invest*. 2006 Aug;116(8):2308.
36. Brikos C, O'Neill LA. Signalling of toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2008;(183):21-50. doi: 10.1007/978-3-540-72167-3_2.
37. O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev*. 2008 Dec;226:10-8. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00701.x.
38. Gomariz RP, Arranz A, Abad C, Torroba M, Martinez C, Rosignoli F, Garcia-Gómez M, Leceta J, Juarranz Y. Time-course expression of Toll-like receptors 2 and 4 in inflammatory bowel disease and homeostatic effect of VIP. *J Leukoc Biol*. 2005 Aug;78(2):491-502. doi: 10.1189/jlb.1004564.
39. Ferraz, EG, Silveira, BBB, Sarmiento, VA, Dos Santos, JN. Toll-like receptors: regulation of the immune responses. *Rev. Gaúch. Odontol*. [online]. 2011 Set; 59(3):483-90.
40. Li L, Acioglu C, Heary RF, Elkabes S. Role of astroglial toll-like receptors (TLRs) in central nervous system infections, injury and neurodegenerative diseases. *Brain Behav Immun*. 2021 Jan;91:740-755. doi: 10.1016/j.bbi.2020.10.007.
41. Estadella D, da Penha Oller do Nascimento CM, Oyama LM, Ribeiro EB, Dâmaso AR, de Piano A. Lipotoxicity: effects of dietary saturated and transfatty acids. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:137579. doi: 10.1155/2013/137579.
42. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014 Sep 25;5:461. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.
43. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004 Feb;16(1):3-9. doi: 10.1016/j.smim.2003.10.003.
44. Kimura T, Isaka Y, Yoshimori T. Autophagy and kidney inflammation. *Autophagy*. 2017 Jun 3;13(6):997-1003. doi: 10.1080/15548627.2017.1309485.
45. Halliwell, B, Gutteridge, JMC. Antioxidants from the diet. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2015; (5):153-198. doi: 10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001..
46. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys*. 1989 Nov 1;274(2):532-8. doi: 10.1016/0003-9861(89)90467-0.
47. Burton GW, Ingold KU. beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*. 1984 May 11;224(4649):569-73. doi: 10.1126/science.6710156.
48. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*. 1994 Aug;52(8 Pt 1):253-65. doi: 10.1111/j.1753-4887.1994.tb01453.x.
49. Bianchi. MLP, Antunes, LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr*. [online]. 1999 Ago; 12(2):123-30. doi: 10.1590/S1415-52731999000200001
50. Anderson D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res*. 1996 Feb 19;350(1):103-8. doi: 10.1016/0027-5107(95)00096-8.
51. Young AJ, Lowe GM. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys*. 2001 Jan 1;385(1):20-7. doi: 10.1006/abbi.2000.2149.
52. Kimura T, Isaka Y, Yoshimori T. Autophagy and kidney inflammation. *Autophagy*. 2017 Jun 3;13(6):997-1003. doi: 10.1080/15548627.2017.1309485.

53. Burton GW. Antioxidant action of carotenoids. *J Nutr.* 1989 Jan;119(1):109-11. doi: 10.1093/jn/119.1.109.
54. Rousseau EJ, Davison AJ, Dunn B. Protection by beta-carotene and related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and genotoxicity: implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 1992 Oct;13(4):407-33. doi: 10.1016/0891-5849(92)90183-h.
55. Anders HJ, Schaefer L. Beyond tissue injury-damage-associated molecular patterns, toll-like receptors, and inflammasomes also drive regeneration and fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2014 Jul;25(7):1387-400. doi: 10.1681/ASN.2014010117.
56. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med.* 2009 Oct 15;361(16):1570-83. doi: 10.1056/NEJMra0901217.
57. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Dec;1833(12):3448-3459. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.001.
58. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
59. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* 2011 May 27;34(5):637-50. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.006.
60. Anderberg SB, Luther T, Frithiof R. Physiological aspects of Toll-like receptor 4 activation in sepsis-induced acute kidney injury. *Acta Physiol (Oxf).* 2017 Mar;219(3):573-588. doi: 10.1111/apha.12798.
61. Zhang Q, Wang L, Wu M, Liu X, Zhu Y, Zhu J, Xing C. Humanized anti-TLR4 monoclonal antibody ameliorates lipopolysaccharide-related acute kidney injury by inhibiting TLR4/NF- κ B signaling. *Mol Med Rep.* 2021 Aug;24(2):608. doi: 10.3892/mmr.2021.12245.
62. Mount PF, Juncos LA. Obesity-Related CKD: When Kidneys Get the Munchies. *J Am Soc Nephrol.* 2017 Dec;28(12):3429-3432. doi: 10.1681/ASN.2017080850.
63. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA. CONCEA. Portaria nº 465, de 23 de maio de 2013. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0226/226494.pdf>.
64. Dornellas AP, Watanabe RL, Pimentel GD, Boldarine VT, Nascimento CM, Oyama LM, Ghebremeskel K, Wang Y, Bueno AA, Ribeiro EB. Deleterious effects of lard-enriched diet on tissues fatty acids composition and hypothalamic insulin actions. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2015 Dec;102-103:21-9. doi: 10.1016/j.plefa.2015.10.003.
65. GRASA-LÓPEZ, A. et al. Undaria pinnatifida and fucoxanthin ameliorate lipogenesis and markers of both inflammation and cardiovascular dysfunction in an animal model of diet-induced obesity. *Marine Drugs*, v. 14, n. 8, 2016.
66. CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH. Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. US Department of Health and Human Services, n. July, p. 1–27, 2005.
67. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972 Jun;18(6):499-502.
68. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.
69. Blaner, WS. Vitamin A signaling and homeostasis in obesity, diabetes, and metabolic disorders. *Pharmacol Ther.* 2019; *197*(1), 153–178. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.01.006>.
70. Beydoun, MA, Chen, X, Jha, K, Beydoun, HA, Zonderman, AB, & Canas, JA. Carotenoids, vitamin A, and their association with the metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev.* 2019;77(1), 32–45. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy044>.

71. Li, X, Chen, Y, Li, S, Chen, M, Xiao, J, Xie, B, Sun, Z. Oligomer procyanidins from lotus seedpod (LSOPC) regulates lipid homeostasis partially by modifying fat emulsification and digestion. *J. Agric. Food Chem.* 2019;67, 4524–4534 doi:10.1021/acs.jafc.9b01469 .
72. Gammone MA, D'Orazio N. Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin. *Mar Drugs.* 2015;13(4):2196-2214. Published 2015 Apr 13. doi:10.3390/md13042196.
73. Hariri N, Gougeon R, Thibault L. A highly saturated fat-rich diet is more obesogenic than diets with lower saturated fat content. *Nutr Res.* 2010 Sep;30(9):632-43. doi: 10.1016/j.nutres.2010.09.003. PMID: 20934605.
74. Heydemann A. An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res.* 2016;2016:2902351. doi:10.1155/2016/2902351.
75. Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Murakami-Funayama K, Miyashita K. Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. *Mol Med Rep.* 2009 Nov-Dec;2(6):897-902. doi: 10.3892/mmr_00000189.
76. Hu X, Li Y, Li C, Fu Y, Cai F, Chen Q, Li D. Combination of fucoxanthin and conjugated linoleic acid attenuates body weight gain and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced obese rats. *Arch Biochem Biophys.* 2012 Mar 1;519(1):59-65. doi: 10.1016/j.abb.2012.01.011.
77. Sangeetha RK, Bhaskar N, Divakar S, Baskaran V. Bioavailability and metabolism of fucoxanthin in rats: structural characterization of metabolites by LC-MS (APCI). *Mol Cell Biochem.* 2010 Jan;333(1-2):299-310. doi: 10.1007/s11010-009-0231-1.
78. Moritz, B, Tramonte, VLC. Biodisponibilidade do licopeno. *Rev. Nutr.* 19 (2) • Abr 2006 • <https://doi.org/10.1590/S1415-52732006000200013>.
79. Kim SH, Kim H. Inhibitory Effect of Astaxanthin on Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction-A Mini-Review. *Nutrients.* 2018;10(9):1137. Published 2018 Aug 21. doi:10.3390/nu10091137.
80. Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Dec;1147:37-52. doi: 10.1196/annals.1427.015. PMID: 19076429; PMCID: PMC2869479.
81. Murillo AG, Fernandez ML. Potential of Dietary Non-Provitamin A Carotenoids in the Prevention and Treatment of Diabetic Microvascular Complications. *Adv Nutr.* 2016;7(1):14-24. Published 2016 Jan 15. doi:10.3945/an.115.009803
82. Sila A, Ghilisi Z, Kamoun Z, Makni M, Nasri M, Bougateg A, Sahnoun Z. Astaxanthin from shrimp by-products ameliorates nephropathy in diabetic rats. *Eur J Nutr.* 2015 Mar;54(2):301-7. doi: 10.1007/s00394-014-0711-2.
83. Ng ACT, Delgado V, Borlaug BA, Bax JJ. Diabetes: the combined burden of obesity and diabetes on heart disease and the role of imaging. *Nat Rev Cardiol.* 2021 Apr;18(4):291-304. doi: 10.1038/s41569-020-00465-5.
84. Li W, Wang G, Lu X, Jiang Y, Xu L, Zhao X. Lycopene ameliorates renal function in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(8):5008-5015.
85. De Faria, AP, Ritter, AMV, Gasparetti, CS, Corrêa, NB, Brunelli, V, Almeida, A, Pires, NF, Modolo, R, Junior, HM. Proposta de um escore inflamatório de citocinas e adipocinas plasmáticas associado à hipertensão resistente, mas dependendo dos parâmetros da obesidade. *Arq. Bras. Cardiol.* 112 (4) • Abr 2019 • <https://doi.org/10.5935/abc.20190032>.
86. Aroor AR, McKarns S, Demarco VG, Jia G, Sowers JR. Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. *Metabolism.* 2013 Nov;62(11):1543-52. doi: 10.1016/j.metabol.2013.07.001.
87. Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H, Shi F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis.* 2019 Feb 12;10(2):128. doi: 10.1038/s41419-019-1413-8.

88. Lee AH, Shin HY, Park JH, Koo SY, Kim SM, Yang SH. Fucoxanthin from microalgae *Phaeodactylum tricorutum* inhibits pro-inflammatory cytokines by regulating both NF- κ B and NLRP3 inflammasome activation. *Sci Rep.* 2021;11(1):543. Published 2021 Jan 12. doi:10.1038/s41598-020-80748-6.

ANEXO 1 - Comissão de ética no uso de animais UNIFESP/HSP



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da suplementação de carotenoides no estresse oxidativo e no processo inflamatório renal em ratos adultos alimentados com dieta hiperlipídica ", protocolada sob o CEUA nº 6088081121 (ID 011265), sob a responsabilidade de **Luciana Pellegrini Pisani e equipe; Luciana Pellegrini Pisani; Aline Boveto Santamarina; LUYZA GARCIA ALMEIDA** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 02/12/2021.

We certify that the proposal "Effect of carotenoid supplementation on oxidative stress and renal inflammatory process in adult rats fed a high-fat diet", utilizing 0 Heterogenics rats (), protocol number CEUA 6088081121 (ID 011265), under the responsibility of **Luciana Pellegrini Pisani and team; Luciana Pellegrini Pisani; Aline Boveto Santamarina; LUYZA GARCIA ALMEIDA** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 12/02/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **12/2021 a 05/2022** Área: **Biociências**

Origem: **Amostras biológicas estocadas**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **90 a 90 dias**

N: **0**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **200 a 300 g**

Local do experimento: Os procedimentos experimentais serão realizados no Laboratório de Nutrição e Fisiologia Endócrina sob a responsabilidade da Profa. Dra. Luciana Pellegrini Pisani. Não será necessária a compra de modelos animais de experimentação, uma vez que as amostras serão obtidas a partir de projeto pré-existente em nosso grupo de pesquisa (CEUA-UNIFESP nº 1193300317).

São Paulo, 06 de dezembro de 2021

Prof. Dra. Daniela Santoro Rosa
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dra. Kátia De Angelis Lobo d'Avila
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo