



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

KALLEU FERNANDO DE ALENCAR CARVALHO

**EFEITO HIPOLIPEMIANTE DA RIPARINA I EM MODELO DE DISLIPIDEMIA
INDUZIDA POR POLOXAMER 407 EM CAMUNDONGOS C57BL/6**

FORTALEZA

2025

KALLEU FERNANDO DE ALENCAR CARVALHO

EFEITO HIPOLIPEMIANTE DA RIPARINA I EM MODELO DE DISLIPIDEMIA
INDUZIDA POR POLOXAMER 407 EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa (UFC).

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C324e Carvalho, Kalleu Fernando de Alencar.

Efeito hipolipemiante da Riparina I em modelo de dislipidemia induzida por poloxamer 407 em camundongos C57BL/6 / Kalleu Fernando de Alencar Carvalho. – 2025.
72 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.

1. Dislipidemia. 2. Riparina. 3. Hipolipemiante. 4. Antioxidante. 5. Toxicidade. I. Título.

CDD 615.1

KALLEU FERNANDO DE ALENCAR CARVALHO

EFEITO HIPOLIPEMIANTE DA RIPARINA I EM MODELO DE DISLIPIDEMIA
INDUZIDA POR POLOXAMER 407 EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Aprovada em: __/__/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Sthefane Gomes Feitosa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Eduardo Ribeiro Honório Júnior
Centro Universitário Christus (Unichristus)

A Deus.

À minha família, em especial, meu padrasto
Carlos Kleber Magalhães de Freitas “*In
Memoriam*”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por possibilitar foco e dedicação para a conclusão deste trabalho.

À minha família, em especial, minha mãe, Anna Karynne Rogério de Alencar Magalhães de Freitas, meu padrasto, Carlos Kleber Magalhães de Freitas “*In Memoriam*”, meu irmão, Carlos Kleber Magalhães de Freitas Filho, meus padrinhos, John Roosevelt de Alencar e Kátia Mireille de Alencar; e minha avó, Zeleida Rogério de Alencar “*In Memoriam*”, por todo o apoio dado durante minha trajetória pessoal, escolar e acadêmica.

Aos meus amigos, Catulo Coelho, Luiz Pedro Leite, Enoque de Souza, Pablo Cauet Giffone, Falco Miller Araújo, Carlos Daniel Castro, João Victor Machado, Vitória Nobre e Isadora Freitas, por estarem ao meu lado durante o meu crescimento pessoal e profissional, desde a infância e adolescência à atual conclusão deste mestrado.

À minha orientadora, profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa (UFC), por acreditar em meu potencial, aceitar orientar-me nesta pesquisa e incentivar-me a continuar os trabalhos em períodos de dificuldade.

Aos professores doutores Tiago Lima Sampaio (UFC) e Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes (UFC), e a equipe dos laboratórios de Toxicologia Experimental e Analítica, e Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica, ambos do Departamento de Farmácia (UFC), pelo suporte e parceria, proporcionando toda a base para o desenvolvimento dos protocolos desta pesquisa.

À equipe do Biotério Setorial Prof. Eduardo Torres do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina (UFC), em especial, os servidores Dr. Wesley Lyevertton (veterinário), Dra. Gabrielle Freire (bioterista) e Dr. Augusto César (bioterista), por todo suporte na execução dos protocolos animais, orientações e conselhos durante os meses de convivência.

À Dra. Sthefane Gomes Feitosa (UFC) e a equipe do Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens (NEMPI/UFC), pela parceria nas análises histológicas desta pesquisa.

À equipe do Laboratório de Neuropsicofarmacologia do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM/UFC), em especial, à Dra. Iardja Stéfane Sales, doutorando Pedro Janelson Lima, Dr. Victor Celso Capibaribe, Dra. Jéssica Rabelo Bezerra, Ketysa Oliveira, Letícia Rizzia, Amanda Barroso, Guendalina Corsi e Carina Kesia; e as professoras doutoras, Silvânia Vasconcelos, Danielle Macêdo e Marta Fonteles.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina (UFC), em especial, os professores doutores Roberto César Lima Jr., Alexandre Havt, Kalyne Leal, Pedro Filho Sousa, Cláudia Pessoa, Pedro Magalhães e Deysi Viviana Wong, e as secretarias do programa, Laura Alves e Milena Janaiana.

Ao professor Dr. Francisco de Assis Francelino Alves (IFCE/UECE), professor, amigo e orientador, desde o início da graduação, em 2017, o qual me guiou para a pesquisa científica e o campo educacional. Ensinando-me sempre o valor do ofício docente, sendo minha referência no fazer pedagógico.

À Universidade Federal do Ceará pela infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho, em especial, o Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NDPM) e o Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da bolsa de mestrado durante todo o período de execução desta pesquisa.

Aos demais colegas que contribuíram de alguma forma na minha trajetória acadêmica.

“Se a educação sozinha não transforma a sociedade, sem ela tampouco a sociedade muda.” (Freire, 2000, p. 31).

RESUMO

A dislipidemia é caracterizada como um distúrbio cuja prevalência vem aumentando no Brasil e no mundo de forma progressiva, sendo fundamental do ponto de vista da saúde pública. A doença pode ser definida por alterações metabólicas lipídicas que afetam a corrente sanguínea, caracterizadas por aumento do colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL). Essas alterações estão associadas a riscos cardiovasculares e à aterosclerose, que podem resultar em eventos cardiovasculares graves. Diante disso, novos tratamentos farmacológicos têm se baseado na investigação de substâncias de origem natural, como os polifenóis encontrados na tiramina, uma monoamina, disponíveis em plantas, estudada por seus efeitos no metabolismo de lipídeos e carboidratos. Nesse contexto, as riparinas (RIP), metabólitos da tiramina, apresentam atividade bioativa, e têm sido estudadas por seus diversos efeitos biológicos, incluindo anti-inflamatórias, antioxidantes, ansiolíticos e antidepressivos. O objetivo do presente estudo foi averiguar o efeito hipolipemiante da Riparina I (RIP I) no modelo de dislipidemia induzida por poloxamer P407 em camundongos C57BL/6. Foi realizado o estudo de toxicidade aguda da RIP I, de acordo com parâmetros estabelecidos pela OECD 423, para determinação das doses utilizadas. A dislipidemia foi induzida mediante única injeção via intraperitoneal de P-407 na dose de 400mg/kg. Os grupos foram tratados quatro vezes, sendo: um pré-tratamento (2h antes da administração de P-407), doses de RIP I nas concentrações 100, 50 e 25mg/Kg, seguido de tratamentos 24h, 48h e 72h após a administração intraperitoneal de P-407. Duas horas após o último tratamento, os animais foram anestesiados e submetidos à coleta de sangue, para dosagens bioquímicas de colesterol, triglicerídeos e marcadores hepáticos. Ao fim dos protocolos, o fígado foi removido para dosagem dos parâmetros antioxidantes TBARS, GSH e catalase (U/mg de proteína). Foi identificada baixa toxicidade da RIP I nos tecidos cardíaco, hepático, renal e cerebral, sendo classificada na categoria 5 de acordo com o *Globally Harmonized Classification* OECD. A RIP I mostrou não ser capaz de reduzir as taxas de colesterol e triglicerídeos dos animais, entretanto, demonstrou um potencial antioxidante através da redução dos níveis de TBARS, bem como no aumento de GSH/GSSG. Adicionalmente, a RIP I possibilitou um aumento dos níveis de colesterol HDL comparado ao grupo P407. Também foi identificado um aumento significativo nos índices do Colesterol Não-HDL, na razão HDLc/CT e TG/HDLc. Nas análises histológicas do protocolo de dislipidemia, não houve alterações macroscópicas e histopatológicas no tecido hepático, sem alterações das aminotransferase (AST e ALT). Conclui-se que foi identificado potencial ação da RIP I no HDLc e efeito antioxidante significativo em tecido hepático neste modelo, contudo, a RIP I não conseguiu reduzir os níveis de triglicerídeos e colesterol total induzidos por P407. Em suma, é válido futuros experimentos que estudem a riparina I em modelo crônico de dislipidemia induzida por dieta hiperlipídica, a fim de verificar sua ação, sem a indução medicamentosa, por meio da obesidade em camundongos.

Palavras-chave: Dislipidemia; riparina; hipolipemiante; antioxidante; toxicidade.

LIPID-LOWERING EFFECT OF RIPARIN I IN A POLOXAMER 407-INDUCED DYSLIPIDEMIA MODEL IN C57BL/6 MICE

ABSTRACT

Dyslipidemia is characterized as a disorder whose prevalence has been progressively increasing in Brazil and worldwide, and is essential from a public health perspective. The disease can be defined by lipid metabolic alterations that affect the bloodstream, characterized by an increase in total cholesterol, triglycerides, low-density lipoprotein (LDL) and a decrease in high-density lipoprotein (HDL). These alterations are associated with cardiovascular risks and atherosclerosis, which can result in serious cardiovascular events. In view of this, new pharmacological treatments have been based on the investigation of substances of natural origin, such as polyphenols found in tyramine, a monoamine, available in plants, studied for their effects on lipid and carbohydrate metabolism. In this context, riparins (RIP), metabolites of tyramine, have bioactive activity and have been studied for their various biological effects, including anti-inflammatory, antioxidant, anxiolytic and antidepressant effects. The aim of this study was to investigate the lipid-lowering effect of Riparin I (RIP I) in the dyslipidemia model induced by poloxamer P407 in C57BL/6 mice. An acute toxicity study of RIP I was performed according to parameters established by OECD 423 to determine the doses used. Dyslipidemia was induced by a single intraperitoneal injection of P-407 at a dose of 400 mg/kg. The groups were treated four times, as follows: a pretreatment (2 h before administration of P-407), doses of RIP I at concentrations of 100, 50 and 25 mg/kg, followed by treatments 24 h, 48 h and 72 h after intraperitoneal administration of P-407. Two hours after the last treatment, the animals were anesthetized and submitted to blood collection for biochemical dosages of cholesterol, triglycerides and liver markers. At the end of the protocols, the liver was removed for measurement of the antioxidant parameters TBARS, GSH and catalase (U/mg of protein). Low toxicity of RIP I was identified in cardiac, hepatic, renal and brain tissues, being classified in category 5 according to the Globally Harmonized Classification OECD. RIP I was not able to reduce cholesterol and triglyceride levels in animals, however, it demonstrated antioxidant potential through the reduction of TBARS levels, as well as the increase in GSH/GSSG. Additionally, RIP I enabled an increase in HDL cholesterol levels compared to the P407 group. A significant increase in non-HDL cholesterol indices, in the HDLc/TC and TG/HDLc ratios was also identified. In the histological analyses of the dyslipidemia protocol, there were no macroscopic and histopathological changes in the liver tissue, with no changes in aminotransferases (AST and ALT). It is concluded that potential action of RIP I on HDLc and significant antioxidant effect in liver tissue were identified in this model; however, RIP I was unable to reduce triglyceride and total cholesterol levels induced by P407. In summary, future experiments studying riparin I in a chronic model of dyslipidemia induced by a high-fat diet are valid, in order to verify its action, without drug induction, through obesity in mice.

Keywords: Dyslipidemia; riparin; lipid-lowering; antioxidant; toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura geral das lipoproteínas	18
Figura 2	– Planta <i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez (Lauraceae).....	27
Figura 3	– Estrutura química das Riparinas	27
Figura 4	– Linha do tempo do modelo de indução de dislipidemia em camundongos C57BL/6.....	40
Figura 5	– Reação de detecção das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	42
Figura 6	– Interconversão da glutathiona nas suas formas reduzida e oxidada	43
Figura 7	– Análise histológica do tecido hepático submetido ao protocolo de toxicidade aguda OECD 423.	47
Figura 8	– Análise histológica do tecido cardíaco submetido ao protocolo de toxicidade aguda OECD 423.	47
Figura 9	– Marcadores bioquímicos plasmáticos de camundongos submetidos ao modelo de dislipidemia.....	49
Figura 10	– Marcadores bioquímicos (AST e ALT) de camundongos submetidos ao modelo de dislipidemia.....	50
Figura 11	– Marcadores do estresse oxidativo no tecido hepático de camundongos submetidos ao modelo de dislipidemia.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Classificação fenotípica das dislipidemias.....	20
Tabela 2	– Grupos experimentais.....	39
Tabela 3	– Valores médios dos marcadores de estresse oxidativo em fígado de camundongos C57BL/6 em modelo de indução de dislipidemia.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	alanina aminotransferase
Apo	apoliproteínas
AST	aspartato aminotransferase
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CAN	Ácidos Nucleicos Totais
CNV	Captação do Vermelho Neutro
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Ct	colesterol total
CT	controle
DTNB	ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
DCC	Doença Coronariana Cardíaca
DCA	Doença Cardiovascular Aterosclerótica
EHNA	esteatose hepática não alcoólica
EPM	erro padrão da média
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
GLP-1	glucagon-like peptide 1
GSSH	glutathiona oxidada
GSH	glutathiona reduzida
HDL	lipoproteínas de alta densidade
HDLc	colesterol de lipoproteínas de alta densidade
H.E.	hematoxilina e eosina
HMGC-CoA	3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase
IMC	índice de massa corporal
IL-1 β	interleucina 1 β
LDL	lipoproteínas de baixa densidade
LDLc	colesterol de lipoproteínas de baixa densidade
LDL-R	receptor de lipoproteínas de baixa densidade
MDA	malondialdeído
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

MP-1	proteína quimioatractiva de monócitos
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OMS	Organização Mundial de Saúde
PPAR _s	receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PPRA _γ	receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
RIP	riparina
RIP I	riparina I
SOD	superóxido dismutase
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
Tg	triglicerídeo
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
VLDL	lipoproteínas de densidade muito baixa
ΔG	energia de afinidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Dislipidemia.....	17
1.2	Farmacoterapia	23
1.3	Riparina I como alternativa farmacológica.....	26
2	JUSTIFICATIVA.....	30
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo geral.....	34
3.2	Objetivos específicos	34
4	MATERIAS E MÉTODOS.....	35
4.1	Análise experimental <i>in vivo</i>	36
4.1.1	<i>Animais e aspectos éticos</i>	36
4.1.2	<i>Obtenção de riparina I</i>.....	36
4.1.3	<i>Protocolo toxicológico em dose única</i>	37
4.1.4	<i>Avaliação do efeito hipolipemiante da RIP I em camundongos</i>	38
4.1.5	<i>Análise de marcadores bioquímicos</i>.....,,,	41
4.1.6	<i>Análise de marcadores do estresse oxidativo</i>	41
4.1.6.1	<i>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	41
4.1.6.2	<i>Glutathione reduzida (GSH)</i>	42
4.1.6.3	<i>Determinação da atividade enzimática de catalase</i>	43
4.1.7	<i>Análise histológica</i>	43
4.1.8	<i>Análise estatística</i>.....	44
5	RESULTADOS	45
5.1	Avaliação da toxicidade oral aguda da RIP I em camundongos.....	46
5.2	Avaliação bioquímica da atividade hipolipidêmica da RIP I em protocolo de dislipidemia induzida por poloxamer P-407 em camundongos.....	48
5.1.2	Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo	51
5.1.3	Análise histológica do tecido hepático	53
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO.....,,,	59
	REFERÊNCIAS.....	61
	ANEXO A.....	70
	ANEXO B.....	71

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1. Dislipidemia

Dislipidemias são um conjunto de distúrbios que interferem no metabolismo dos lipídios do sangue, como colesterol, triglicerídeos, fosfolipídios e ácidos graxos livres. Sendo classificada como um dos maiores fatores de risco que contribuem para a prevalência e gravidade de doenças cardiovasculares, os desequilíbrios de lipídeos na corrente sanguínea podem resultar em processos sistêmicos que culminam na formação de placas ateroscleróticas, associando-se ao infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, doença cardíaca isquêmica, insuficiência cardíaca, doença arterial coronariana, doença cerebrovascular, doença vascular periférica, dentre outros (Silva *et al.*, 2022; Moraes *et al.*, 2022).

Os triglicerídeos (Tg) são identificados como moléculas lipídicas compostas por uma molécula de glicerol associada a três moléculas de ácidos graxos. São sintetizados, principalmente, pela via do glicerol fosfato e o tráfego em tecidos específicos, como músculo, fígado e tecido adiposo. Eles representam a principal forma de armazenamento de lipídios e energia no organismo humano, processo biológico essencial para a vida (Nelson; Cox, 2006; Ohkawa *et al.*, 2020). Quanto ao colesterol (Ct), compreende-se como um composto orgânico do grupo dos álcoois secundário e monoinsaturado, da classe de esteroides, transportado na forma de lipoproteínas plasmáticas, as quais podem ser classificadas como: lipoproteína de alta densidade (HDL); lipoproteína de densidade baixa (LDL); lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL); lipoproteína de densidade intermediária (IDL); quilomícrons (Nelson; Cox, 2006).

A HDL é conhecida como a menor lipoproteína existente, atuando na remoção do excesso de colesterol dos tecidos, guiando-o para o fígado, iniciando o processo de catabolismo das moléculas. Entre suas propriedades, pesquisas trazem que a HDL apresenta ação antioxidante, anti-inflamatória e antiagregante plaquetário (Ibrahim, 2010; Précoma, *et al.*, 2019; Silva, 2024; Siasos *et al.*, 2011). Já a LDL, atua como transportador do colesterol do fígado e do intestino para locais de produção de esteroides e para as membranas celulares. Isto, traz uma maior probabilidade de diagnósticos de problemas cardiovasculares, devido a formação placas de gordura nos vasos sanguíneos. O excesso de LDL pode resultar no depósito destas nos vasos e sofrer oxidação, resultando numa modificação estrutural da LDL, fazendo com que as células endoteliais não a reconheçam, o que estimula a ação do sistema

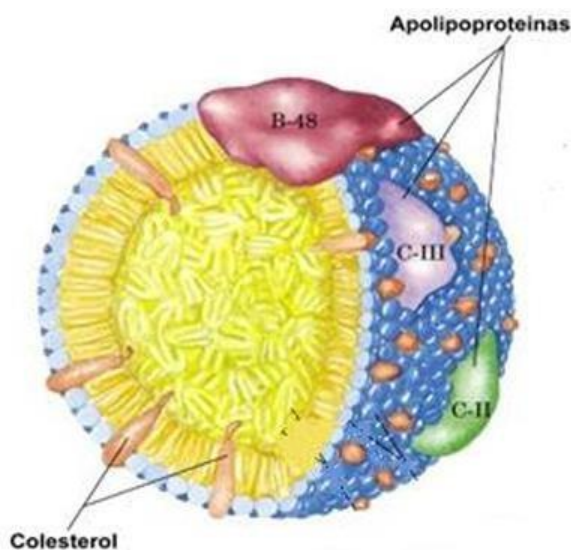
imunológico. A partir disso, ocorre a formação da placa aterosclerótica, que podem levar a obstrução de vasos, gerando inúmeros problemas cardiovasculares e vasculares cerebrais (Ohkawa *et al.*, 2020).

A presente anormalidade no metabolismo dos lipídios que resultam em quantidades alteradas no plasma, são associadas a baixos níveis de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDLc), a altos níveis de triglicerídeos (Tg), colesterol total (Ct), e colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDLc), o que pode contribuir para a aterosclerose, doença arterial coronariana e hipertensão arterial sistêmica (He, *et al.*, 2018; Précoma, *et al.*, 2019; Souza, *et al.*, 2019).

A prevalência de dislipidemia varia demograficamente e é fortemente influenciada por fatores culturais e comportamentais, como dieta, atividade física e uso de álcool, além da genética. É estimado que hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, altos níveis de LDLc e baixos níveis de HDLc são relatados em cerca de 40% da população, sendo a doença cardíaca coronária a principal causa de morte nos países em desenvolvimento (Hedayatnia *et al.*, 2020).

Além dos malefícios popularmente conhecidos na sociedade, é preciso ressaltar que o colesterol e os triglicerídeos são essenciais nos processos da homeostase humana, pois atuam na fluidez à membrana celular, síntese de hormônios esteróides e sais biliares, e no estoque energético do corpo (Silva, Mura, 2007). As lipoproteínas transportam tais componentes por todo o plasma sanguíneo, sendo fundamentais nos processos citados acima. Sua estrutura é constituída por lipídeos e proteínas denominadas apolipoproteínas (apos), com função direta no metabolismo das lipoproteínas e na formação das partículas lipoproteicas, entre elas, a apos B48, na atuação em ligantes a receptores de membrana, apos B100, e cofatores enzimáticos, como as Apo CII e III (Figura 1) (Siasos *et al.*, 2011; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2013).

Figura 1 – Estrutura geral das lipoproteínas.



Fonte: Nelson; Cox, 2006.

Ao classificarmos as lipoproteínas, podemos compreender que estas estão divididas em dois grupos: o primeiro, rico em Tg, por serem maiores e menos densos, de origem intestinal, e pelas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), de origem hepática; já o segundo, rico em colesterol, entre eles, LDLc e HDLc. Ambas possuem suas especificidades, tamanhos, composições, funções, e seu desequilíbrio pode resultar no desenvolvimento de doenças vasculares (Gowdy, Fessler, 2013).

Em relação as classificações das dislipidemias, conforme dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2013) e Rodrigues (2015), podem ser subdivididas de acordo com a causa, em primárias e secundárias. As primárias, podem ser classificadas por genotipicamente ou fenotipicamente por meio de análises bioquímicas, na genotípica, podemos citar as monogênicas, causadas por mutações em um só gene, e as poligênicas, causadas por associações de múltiplas mutações conjuntas. Ambas podem resultar na má formação do gene de receptor de LDL (LDL-R) ou no gene da apo B-100 e acabam por causar acúmulo de lipoproteínas ricas em colesterol, como a LDL, no compartimento plasmático devido ao impacto na metabolização desses lipídeos. Na fenotípica, são considerados os valores de Ct, LDLc, Tg e HDLc e estas compreendem quatro tipos bem definidos de dislipidemias, listados na Tabela 1. O tratamento das dislipidemias secundárias, exige uma compreensão e investigação de doenças pré-existentes, desordens metabólicas, como obesidade, diabetes, hipotireoidismo, entre outras, até mesmo relacionadas ao uso de medicamentos, tais como diuréticos tiazídicos e bloqueadores beta-adrenérgicos (Rodrigues, 2015).

Tabela 1 – Classificação fenotípica das dislipidemias.

Classificação	Alteração laboratorial
Hipercolesterolemia isolada	Elevação isolada de LDL (>160 mg/dL)
Hipertrigliceridemia isolada	Elevação isolada de triacilgliceróis (>150 mg/dL)
Hiperlipidemia mista	Valores aumentados de LDL e TG (>160 mg/dL e > 150 mg/dL, respectivamente)
HDL baixo	Redução de HDL (<40 mg/dL em homens e <50 mg/dL em mulheres)

Fonte: adaptado de Rodrigues, 2015.

Ao analisar as desordens metabólicas presentes em quadros clínicos, estudos demonstraram um aumento do risco de desenvolvimento de dislipidemia secundária. Entre esses casos, são encontrados em patologias como diabetes *mellitus* tipo 2. A presença simultânea de hiperglicemia com baixos níveis de HDLc ou com elevadas concentrações de Tg aumenta o risco de eventos cardiovasculares até três vezes em pacientes diabéticos do tipo 2 (Lehto *et al.*, 1997); com aterosclerose e com Doença Coronariana Cardíaca (DCC). A DCC pode ser definida como um dano ao funcionamento regular do coração devido ao fluxo inadequado de sangue em relação às suas necessidades. Essas obstruções na circulação coronariana podem ocorrer por processo de formação das placas de ateroma (Ghosh *et al.*, 2008). O acúmulo de colesterol e lipídios associados dentro da parede vascular representa uma característica mais proeminente da aterogênese. Como dito anteriormente, as partículas de LDLc são particularmente aterogênicas devido à sua maior persistência na corrente sanguínea, facilidade de penetração através da barreira endotelial e maior suscetibilidade oxidativa em comparação com outras partículas de lipoproteína, como HDLc e VLDL (Moraes *et al.*, 2022).

A concentração reduzida de HDL também representa um fator de risco aterosclerótico. Esta molécula realiza o transporte reverso de colesterol circulante e proteger a molécula LDLc do processo oxidativo (Evangelista, Leite, Lima, 2013). Diante do estresse oxidativo aumentado, há uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), desempenhando um papel significativo em muitas doenças, principalmente pela modificação oxidativa do colesterol, a qual é considerada uma etapa inicial na conversão de

LDL em partículas mais aterogênicas (FERENCE *et al.*, 2017; Masuda, Yamashita, 2017).

A obesidade e a dislipidemia, assim como a síndrome metabólica, são condições frequentemente associadas ao estresse oxidativo. O desequilíbrio redox estimula a inflamação sistêmica, que se correlaciona com disfunções teciduais encontradas nos indivíduos (MORAIS *et al.*, 2022).

O estresse oxidativo também é um dos mecanismos mais correlacionados ao desenvolvimento da dislipidemia. Estudos demonstram que a ingestão de uma dieta altamente calórica resulta num estado pós-prandial de hipertrigliceridemia, hiperglicemia e níveis elevados de ácidos graxos livres na circulação, gerando um estado de estresse oxidativo (Francisqueti *et al.*, 2017). O estresse oxidativo é caracterizado pelo acúmulo intracelular de compostos reativos ao oxigênio e ao nitrogênio, principalmente de espécies reativas de oxigênio (ERO). O aumento na produção de ERO ocorre quando excede a capacidade de defesa antioxidante do organismo em remover essas espécies (Francisquet *et al.*, 2017).

No aspecto epidemiológico da dislipidemia, é notório ressaltar que o mundo sofreu uma transição nutricional para os produtos industrializados, com altas taxas de açúcares, gorduras saturadas e sódio; e pobre em frutas e legumes. A dieta é um dos muitos fatores de risco associados com aterogênese e doença cardiovascular, somada com a obesidade e o sedentarismo (Almeida Júnior *et al.*, 2023).

Segundo dados da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL, 2016; Brasil, 2017), verificou-se que das 26 capitais brasileiras e o Distrito Federal, há cerca de 24,8% de indivíduos que relataram ser diagnosticados com dislipidemias. Estudos com a população brasileira composta por público-alvo infanto-juvenil e adultos apontaram uma prevalência de 22,6% e de 49,7% de dislipidemias nos respectivos grupos (Camargo *et al.*, 2021; Teixeira, *et al.*, 2021). Isto demonstra um problema sério no quesito de saúde pública, onde distúrbios metabólicos estão cada vez mais em evidência no Sistema Único de Saúde (SUS). O Ministério da Saúde destina em média 1,3 bilhão de reais por ano na terapêutica dessas alterações lipídicas (Oliveira *et al.*, 2017).

Segundo o estudo de Fernandes *et al.*, (2011), no estado de São Paulo, envolvendo 2.720 adultos em 8 cidades mostrou que cerca de 12,2% de pacientes estavam com colesterol total e/ou LDLc altos, colesterol HDLc abaixo dos níveis de referência e/ou tratamento com algum medicamento para tratar níveis elevados de lipídeos no sangue. Essa informação é reafirmada pelo estudo de Alcântara Neto *et al.* (2012), no estado da Bahia, com

crianças e adolescente de escola pública, que considerou os jovens dislipidêmicos com níveis plasmáticos maiores que 170 mg/dl de colesterol total ou 130 mg/dl de triacilgliceróis, assim encontrando percentagem de 25,5% de indivíduos afetados, mostrando que grande número de casos é incidente na idade juvenil. Esse cenário desperta uma reflexão ainda maior dos motivos que levam a tais resultados, indicando que as taxas encontradas são elevadas e que ações de saúde públicas, visando o combate desse desfecho, fazem-se necessárias na população brasileira.

Entre as patologias que podem contribuir para o surgimento do quadro de dislipidemia, temos a obesidade, a qual é compreendida como acúmulo de tecido gorduroso localizado ou generalizado, provocado por desequilíbrio nutricional, associado ou não a distúrbios genéticos ou endócrino-metabólicos (Lima, Duarte, 2013). É uma doença crônica primariamente relacionada com o desbalanço entre a ingestão e o gasto energético (Silva, 2024).

Segundo a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO), os impactos da obesidade na saúde vão além das interferências no sistema fisiológico humano, é um impacto social, sistemático e massificado (ABESO, 2016). A obesidade é classificada como uma das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNTs), cujo o tratamento é ofertado pelo Sistema Único de Saúde (SUS); os custos com as DCNTs, em 2018, alcançaram 3,45 bilhões de reais, desses custos, 59% foram referentes ao tratamento da hipertensão, 30% ao do diabetes e 11% ao da Obesidade (Silva, 2022).

A obesidade vem sendo tratada como uma pandemia global atingindo todas as faixas etárias. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016) assumem que, até 2025, mais de 2,3 bilhões de pessoas devem ser categorizados como acima do peso ao passo que, destes, ao menos 700 milhões devem ser diagnosticados com Obesidade moderada ou grave, com Índice de Massa Corporal (IMC) acima de 30 (OMS, 2016). Nos últimos 50 anos, a prevalência de obesidade aumentou em todo o mundo, atingindo níveis de pandemia (Andrade *et al.*, 2023). Estima-se que, atualmente, quase um terço da população mundial possa ser classificada com sobrepeso ou obesidade. Se as tendências atuais permanecerem nesse valor, este percentual poderá chegar a 57,8% até 2030 (Kelly *et al.*, 2008).

No Brasil, dados da última Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, em 2021, demonstraram que a prevalência do excesso de peso no País alcançou cerca de 80% da população, com 57,2% das pessoas apresentando sobrepeso ($IMC \geq 25$); e 22,3%, obesidade ($IMC \geq 30$) (Andrade *et al.*, 2023). Ao compararmos sua evolução no país, percebemos que a obesidade aumentou 72%, saindo de

11,7% da população (em 2005) para 20,3% em 2019 (Brasil, 2021).

Diante da alta prevalência dessas morbidades, meios terapêuticos são necessários à sociedade, podendo esses serem por modificação de hábitos de vida, como a reeducação alimentar e prática de exercícios físicos, sem a necessidade de intervenção farmacológica; ou por via medicamentosa, através de fármacos que regulem os altos níveis de lipídios sanguíneos. Vale ressaltar que as opções não farmacológicas continuam a ser um componente importante na promoção à saúde, gerando inclusive impactos na saúde mental dos pacientes.

A combinação de terapêuticas pode possibilitar melhorias na qualidade de vida do indivíduo, tornando a medida pela farmacoterapia algo pontual, ou seja, podendo elucidar um problema momentâneo, mas não inibe o paciente de retornar ao mesmo cenário posteriormente. Ambas têm sua importância, trazem como resultados uma redução do risco de doença cardiovascular aterosclerótica, entre outras. Portanto, através de um tratamento preventivo, muitas das presentes patologias poderão ser evitadas, sendo o recurso farmacológico acessível, porém, acompanhando por profissionais, para garantir que o paciente consiga obter seu tratamento e que as chances de desenvolver novamente o quadro dislipidêmico reduza através de uma reeducação alimentar.

1.2. Farmacoterapia

A terapia farmacológica para dislipidemia é voltada à busca pelo efeito hipolipemiante, entre eles, a redução de triglicerídeos e colesterol, como o LDLc. Dentre as classes de fármacos hipolipidêmicos se destacam estatinas, resinas, ezetimiba, niacina e fibratos. Estes fármacos tem como alvos as partículas de Tg e LDLc, as quais compõem o produto final do metabolismo das lipoproteínas. Estas partículas devem ser eliminadas por via endossomal através dos receptores de lipoproteínas hepáticas, como o receptor de LDL e a proteínas relacionadas ao receptor de LDL. Os riscos cardiovasculares associados ao LDLc elevado e os benefícios da redução do LDLc abaixo dos 70 mg/dL são, muitas vezes, recomendados para pacientes de alto risco ou com histórico de Doença Cardiovascular aterosclerótica (DCA) (FERENCE *et al.*, 2017; Silverman *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, identificou-se um cúmulo de evidências que apoiam o benefício clínico da intervenção com medicamentos sobre os níveis de colesterol. Nos anos 80, a colestiramina, passando pelas estatinas, a combinação de estatinas e ezetimiba, e mais recentemente os inibidores da proteína PCSK9. Todos eles foram marcados pela potência

reduzidora de colesterol LDL (Isla, Valdivielso, 2021).

As metas de redução de lipídios, no entanto, foram reconsideradas pelas diretrizes da *European Society of Cardiology* (ESC) & *European Atherosclerosis Society* (EAS), que atualmente recomendam um LDLc < 55 mg/dL para indivíduos com risco muito alto na prevenção primária e secundária e uma meta de <40 mg/dL para pacientes com um segundo evento de doença aterosclerótica registrado dois anos após o incidente. Mesmo diante dessas recomendações, o início do tratamento, a obtenção dos níveis-alvo de LDLc e a manutenção das terapias hipolipemiantes ainda permanecem abaixo do ideal. Apesar dos avanços da indústria farmacêutica e das opções para redução de lipídios, a acessibilidade e a disponibilidade desses medicamentos diminuíram substancialmente nos últimos anos, dificultando a prevenção e o tratamento adequados (Mach *et al.*, 2020; Knuuti *et al.*, 2020; Berger *et al.*, 2023; Navar *et al.*, 2017).

Os hipolipemiantes atualmente disponíveis, apesar de bem tolerados, apresentam vários efeitos colaterais. Dentre estes, cefaleia, insônia, sintomas gastrintestinais, alterações cutâneas, litíase biliar, alteração da absorção e da metabolização de outros fármacos, aumento das taxas sanguíneas de enzimas musculares (creatinafosfoquinase - CK) e hepáticas (AST e ALT), da creatinina, da glicose, do ácido úrico, proteinúria, comprometimento muscular, hepático, renal e neurológico (Forti, Diamant, 2008; Lima *et al.*, 2024). Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2013), outros efeitos também são observados, impactando diretamente na qualidade de vida do paciente, tais como miopatia, hepatotoxicidade, prisão de ventre, diarreia, gases, dor de estômago, dor de cabeça, náuseas, câibras, cansaço, fraqueza.

A prioridade da terapia medicamentosa é reduzir os níveis de Tg e LDLc, atingindo, com isso, os limiares ou as metas de tratamento recomendados pelas diretrizes. O nível de risco do paciente mostra o melhor momento de iniciar e qual a intensidade do tratamento. Geralmente, os medicamentos podem ser introduzidos juntamente com a intervenção no estilo de vida em pacientes de alto risco. A resposta à terapia medicamentosa e possíveis efeitos adversos devem ser avaliados com a repetição do perfil lipídico cerca de 06 a 08 semanas após início do tratamento, com ajustes das doses, caso necessário (Mach *et al.*, 2020). Quando a terapia medicamentosa é indicada para reduzir o risco de DCV, um redutor de LDL é quase sempre a primeira recomendação (Almeida Júnior *et al.*, 2023).

As estatinas, comumente utilizadas, são agentes orais que inibem a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, depletando assim o colesterol intracelular e regulando positivamente o receptor de LDL. Este, por sua vez, aumenta o catabolismo

das partículas de LDL e reduz os níveis plasmáticos de LDLc. Exercem um efeito menor na redução da secreção de lipoproteínas contendo apolipoproteína B. Essa diminuição resultante nas partículas de LDL circulantes reduz em 30% a 50% a proporção de colesterol plasmático do tipo LDL, dependendo do agente, dose, fatores farmacogenéticos e adesão, que por sua vez, reduz a exposição da parede arterial aos efeitos deletérios do LDL (Hirota *et al*, 2020; Mach *et al.*, 2018; Almeida Júnior *et al.*, 2023).

Além das estatinas, outro grupo de medicamentos são amplamente usadas no tratamento da dislipidemia. A classe dos fibratos (ciprofibrato; fenofibrato; clofibrato) atuam como moduladores lipídicos de largo espectro, sendo um complemento eficaz da dieta no controle de concentrações elevadas do colesterol LDL e VLDL, e dos triglicerídeos. Sua ação também está relacionada ao aumento dos níveis de HDLc, pois participa da hidrólise dos triglicerídeos pelo aumento nas taxas de atividade da lipoproteína lipase, que aumenta a oxidação dos ácidos graxos livres nas fibras musculares e remove o excesso de lipídeos dos vasos (Almeida Júnior *et al.*, 2023).

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) pertencem ao grupo dos receptores hormonais nucleares, formam um subgrupo de três fatores de transcrição ativados por ligantes. Os PPARs desempenham uma função relevante na homeostase lipídica, regulando o metabolismo lipídico. São proteínas ativadas pelo ligante nuclear que, após a ativação, modulam a transcrição dos genes-alvo que controlam e regulam a homeostase, o metabolismo da glicose, triglicerídeos e lipoproteínas, a proliferação celular, a função do tecido vascular e a inflamação (Han *et al*, 2017).

Os PPARs, descritos como, NR1C1, NR1C2 e NR1C3, são três isotipos de PPARs mais estudados. Já entre os agonistas do PPAR destacam-se os fibratos, capazes de reduzir, principalmente, os níveis plasmáticos de triglicerídeos, modular o HDLc e o LDLc e fornecer um efeito cardioprotetor de longo prazo (Almeida Júnior *et al.*, 2023).

Entre os mais recentes e promissores fármacos hipolipemiantes, temos os inibidores de PCSK9s, onde a PCSK9 é uma serina protease encontrada em muitos tecidos, expressa principalmente no fígado e tendo como alvo o receptor de LDLr. Leva os receptores à degradação mediada por lisossomos, diminuindo sua reciclagem e a taxa de remoção do LDLc circulante e causando um aumento na concentração de LDLc no sangue. Devido a isso, dois anticorpos monoclonais inibidores de PCSK9i (alirocumabe e evolocumabe) foram desenvolvidos e aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2015, tornando-se uma opção terapêutica para pacientes com hipercolesterolemia familiar e em casos de intolerância à estatina, podendo ser usado isoladamente ou em combinação com outras

formas terapêuticas (Almeida Júnior *et al.*, 2023; Grundy *et al.*, 2019; Mach *et al.*, 2020).

À medida que os tratamentos para a redução das taxas da dislipidemia continuam a evoluir com opções cada vez maiores para alvos terapêuticos, uma compreensão das terapias de redução de lipídios continua sendo um tópico essencial nas pesquisas médicas, buscando alcançar os melhores efeitos com o mínimo possível de efeitos colaterais. É importante salientar que o tratamento medicamentoso deve auxiliar o paciente a mudar seu hábito alimentar e não simplesmente reduzir a sensação de fome e a ingestão de alimentos, o que tem sido um desafio constante na pesquisa. O que se sabe é que a terapia antiobesidade tradicional resulta somente em 10% da perda de peso, reduzindo a adesão por parte dos pacientes e levando a consequências como o aumento de prescrições de medicamentos anti-hipertensivos, hipoglicemiantes e hipolipemiantes, condições normalmente associadas ao problema da obesidade (Radaelli *et al.*, 2016; Pilitsi *et al.*, 2018).

1.3. Riparina I como alternativa farmacológica

A espécie *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), popularmente conhecida como “louro”, “louro-faia” ou “pau-rosa”, apresenta folhas cartáceas, foscas em ambas as faces, reticulação aureolada, ramos de 3mm de espessura, pecíolo canaliculado, engrossado na base e gema terminal de 4 mm (Oliveira, 2012). O gênero *Aniba* corresponde a cerca de 40 espécies encontradas na Amazônia e nas Guianas (Castelo-Branco *et al.*, 2000).

Nas análises da espécie, foram identificado diversos constituintes fitoquímicos, entre eles, flavanóides, benzilbenzoatos e benzaldeídos (Fernandes *et al.*, 1978). Além disso, Barbosa-Filho *et al.* (1987) constataram que no fruto verde da planta havia a presença de substâncias, como as neoglicanas, benzilbenzoatos, feniletilaminas (O-metil-tiramina) e alguns alcalóides, especificamente as alcalamidas, feniletilaminas de ácido benzoico.

Do fruto verde da planta *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) (Figura 02) foram isolados alguns alcalóides do tipo alcalamidas, entre eles, as Riparinas, e posteriormente obtidas por síntese por Barbosa-Filho *et al.* (1987).

A Riparina I ([O-Metil-N-benzoil-tiramina]), (RIP I), uma classe especial de alcaloides, apresenta uma função amida restrita a poucos representantes na natureza. São consideradas compostos bioativos, sendo formadas da união da tiramina (uma feniletilamina) com o ácido benzoico. A RIP I se diferencia das demais riparinas por apresentar uma hidroxila como substituinte no ácido benzoico (Figura 3) (Barbosa-Filho *et al.*, 1987; 1990; 1997). Destaca-se que a tiramina é uma amina simpaticomimética de ação indireta que causa liberação de catecolaminas armazenadas (Moraes *et al.*, 2022).

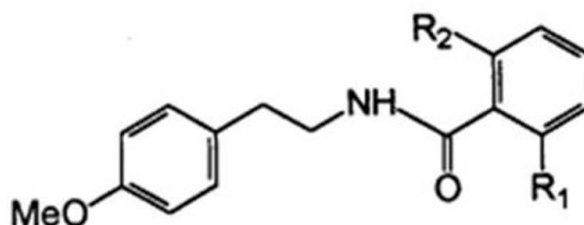
Figura 2 – Planta *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae)



Fonte: Mallmann, 2021.

Em estudos prévios, a RIP I administrada agudamente apresentou efeitos sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), incluindo atividade ansiolítica, antidepressiva e antioxidante, além de anti-inflamatória e antinociceptiva. A princípio, os efeitos antidepressivo e ansiolítico demonstraram ser o grande destaque dos resultados, devido a serem mediado por uma interação com os sistemas dopaminérgico (receptores D1 e D2), noradrenérgico (receptor $\alpha 1$) e serotoninérgico (receptor 5-HT1A). Já o efeito antioxidante foi relacionado à melhora dos sistemas antioxidantes enzimáticos endógenos e à redução da peroxidação lipídica (Sousa *et al.*, 2005, 2007; Carvalho *et al.* 2014; Teixeira *et al.*, 2013).

Figura 3 – Estrutura química das Riparinas.



RIPARINA I ($R_1=R_2=H$)

Fonte: Castelo-Branco *et al.*, 2000.

As riparinas apresentaram atividade antidepressiva em animais submetidos ao modelo de depressão induzida por administração crônica de corticosterona, mostrando também melhora no comportamento ansioso e déficit cognitivo em testes comportamentais, além de aumentar os níveis de BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), sugerindo que sua atividade antidepressiva esteja relacionada à estimulação da produção de fatores neurotróficos (Lopes *et al.*, 2018; Maia Oliveira *et al.*, 2021).

Alguns estudos avaliaram a toxicidade pré-clínica das riparinas foi determinada por intermédio de citotoxicidade utilizando MTT (Sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium), CAN (Ácidos Nucleicos Totais) e CVN (Captação do Vermelho Neutro). Não foram observadas alterações no citoplasma ou no núcleo das células tratadas com as riparinas que sugerissem morte celular por apoptose ou necrose. As riparinas não causaram a perda da integridade da membrana celular, não induziram fragmentação do DNA nem promoveram parada no ciclo celular, sendo consideradas substâncias de baixa toxicidade (Silveira, 2007).

Sales *et al.* (2024) demonstrou um potencial relevante das RIP I e II em diminuir os níveis elevados de citocinas TNF- α e IL-1 β e a hiperativação da micróglia em áreas cerebrais, em modelo animal de estresse crônico imprevisível. O presente quadro traz um pontencial anti-inflamatório evidente das riparinas, possibilitando sua inserção em protocolos e modelo inflamatórios associados ao sistema nervoso central e a outros sistemas que possam ser estudados.

Estudos farmacológicos identificaram que as riparinas I, II, III e IV, metabólitos da tiramina, apresentam várias atividades biológicas, entre as quais, ansiolítica, antidepressiva, antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva são predominantes (Sales *et al.*, 2024; Mallmann *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2005, 2007; Carvalho *et al.* 2014; Teixeira *et al.*, 2013; Silveira, 2007).

Em humanos, a tiramina é considerada uma amina traço devido aos seus baixos níveis plasmáticos (Pessione, Cirrincione, 2016; Gainetdinov *et al.*, 2018). Estudos demonstram que a tiramina possui ação direta no metabolismo de lipídios e carboidratos. Uma pesquisa realizada em ratos diabéticos induzidos experimentalmente por aloxana, mostraram que a tiramina foi capaz de reduzir a glicose plasmática, bem como os níveis de colesterol e triglicerídeos nesses animais (Lino *et al.*, 2007).

Recentemente, o estudo de Morais *et al.* (2022) identificou que a tiramina exerce efeitos hipolipidêmicos e antiobesidade *in vivo* consideráveis, através da redução dos níveis de triglicerídeos e colesterol plasmáticos, efeito antioxidante e baixa toxicidade em roedores.

Em suma, as riparinas são metabólitos derivados da tiramina, substância esta relatada por seus efeitos semelhantes à insulina em células adiposas de roedores, como a capacidade de ativação do transporte de glicose, lipogênese e adipogênese (Carpene, *et al.*, 2018). Diante do exposto, evidencia-se o potencial hipolipemiante das tiraminas, e surge o questionamento quanto a esta característica poder ser elucidada também nas riparinas.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A dislipidemia é uma doença comum em todo mundo, contribuindo para o aumento do risco cardiovascular e diversas complicações. Apesar de ser uma enfermidade metabólica conhecida há muito tempo pela comunidade científica, as opções farmacológicas para o tratamento da obesidade são limitadas e apresentam efeitos adversos importantes (Kopin, Lowestein, 2017). Dessa forma, há a necessidade do desenvolvimento de novas opções terapêuticas, devido ao número crescente de pessoas com obesidade e sobrepeso, há também um consecutivo aumento de pacientes com hipertensão arterial, dislipidemias, diabetes tipo 2 e resistência à insulina (DSBD, 2017).

O estresse oxidativo é demonstrado como um dos mecanismos mais correlacionados ao desenvolvimento da obesidade e dislipidemia. Estudo discutem que a ingestão de uma dieta altamente calórica resulta num estado pós-prandial de hipertrigliceridemia, hiperglicemia e níveis elevados de ácidos graxos livres na circulação, gerando um estado de estresse oxidativo (Francisqueti *et al.*, 2017). Este estudo é caracterizado por um acúmulo intracelular de compostos reativos ao oxigênio e ao nitrogênio, principalmente as espécies reativas de oxigênio (ERO). O aumento na produção de ERO ocorre, quando excede a capacidade de defesa antioxidante do organismo em remover essas espécies (Francisquet *et al.*, 2017).

A busca e desenvolvimento farmacológico é crescente com o uso de derivados de fontes naturais (Lima *et al.*, 2024). Entre os grupos de substâncias mais estudados, destacam-se os polifenóis, os quais estão presentes em plantas como a oliveira (Sánchez Macarro *et al.*, 2020), chá verde (Liao *et al.*, 2019) e uva (Bedê *et al.*, 2020). A tiramina é uma monoamina amplamente encontrada na natureza em vegetais e presente no metabolismo animal. Em humanos, é considerada uma amina traço devido aos seus baixos níveis plasmáticos (Pessione, Cirrincione, 2016; Gainetdinov *et al.*, 2018). A tiramina demonstra afetar diretamente o metabolismo de lipídios e carboidratos. Em um estudo realizado em ratos diabéticos induzidos experimentalmente por aloxana, a tiramina foi capaz de reduzir a glicose plasmática, bem como os níveis de colesterol e triglicerídeos nesses animais (Lino *et al.*, 2007).

Recentemente, o estudo de Moraes *et al.* (2022) identificou que a tiramina possui baixa toxicidade e exerce efeitos hipolipidêmicos e antiobesidade *in vivo* através da redução dos níveis de triglicerídeos e colesterol plasmáticos, efeito antioxidante em roedores.

Concomitantemente a isso, estudos farmacológicos demonstraram que as riparinas

I, II, III e IV apresentam várias atividades biológicas, entre as quais, ansiolítica, antidepressiva e antioxidante, além de anti-inflamatória e antinociceptiva, que são os de maior destaque (Sales *et al.*, 2024; Mallmann *et al.*, 2021; De Sousa *et al.*, 2005, 2007; Carvalho *et al.* 2014; Teixeira *et al.*, 2013; Silveira, 2007).

À vista disso, as riparinas são metabólitos derivados da tiramina, substância esta relatada por seus efeitos semelhantes à insulina em células adiposas de roedores, como a capacidade de ativação do transporte de glicose, lipogênese e adipogênese (Carpene, *et al.*, 2018). Dessa forma, reitera-se aqui a importância do estudo das Riparinas em modelos de doenças metabólicas, considerando a relevância dessas doenças e o impacto potencial sobre o desenvolvimento farmacêutico.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito hipolipemiante da Riparina I em modelo de dislipidemia induzida por poloxamer 407 em camundongos C57BL/6.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a toxicidade aguda da Riparina I pelos parâmetros da OECD 423;
- Avaliar o efeito da Riparina I nas alterações bioquímicas laboratoriais e no perfil lipídico e hepático de animais submetidos à indução de dislipidemia por poloxamer 407;
- Analisar a capacidade antioxidante da Riparina I através da determinação dos níveis de TBARS, GSH e catalase do fígado de camundongos com dislipidemia induzida por poloxamer P-407.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Análise experimental *in vivo*

4.1.1. Animais e aspectos éticos

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos pesando entre 18 e 22g, provenientes do Biotério Prof. Eduardo Torres da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno e mantidos sob temperatura média de 22 ± 2 °C, com umidade relativa de $50 \pm 10\%$, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas com iluminação artificial, recebendo ração padrão e água à vontade, exceto nos períodos de indução da dislipidemia, conforme protocolo experimental descrito adiante.

Todos os protocolos experimentais realizados atenderam os preceitos éticos nacionais definidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e internacionais referentes à pesquisa em experimentação com animais. O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC), com protocolo nº 8443170523 (Anexo A).

4.1.2. Obtenção de Riparina I

A Riparina I [(O-Metil)-N-benzoil-tiramina] (RIP I), inicialmente isolada do fruto verde de *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae) e, posteriormente obtidas por síntese por Barbosa et al. (1987), são alcaloides naturais, uma classe especial de alcaloides, contendo uma função amida restrita a poucos representantes na natureza. São consideradas compostos bioativos, sendo formadas da união da tiramina (uma feniletilamina) com o ácido benzoico.

A riparina I foi cedida pelo prof. Dr. José Maria Barbosa Filho, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil, responsável pela síntese do composto.

Após a síntese, para a administração, a RIP I foi dissolvida em água destilada, contendo 2% de Tween® 80, e administrada nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, via oral por gavagem (Sales *et al.*, 2024; de Carvalho *et al.*, 2014).

4.1.3. Protocolo toxicológico em dose única

Para o estudo de toxicidade em dose única foram utilizados a linhagem de camundongos C57BL/6, uma vez que as doses estabelecidas por esses estudos serão utilizadas nos modelos de indução de obesidade e dislipidemia. A linhagem foi selecionada por ser usualmente utilizada em estudos de indução de obesidade, sendo observado aumento expressivo de peso corporal, resistência à insulina e dislipidemia correlacionáveis com a doença no ser humano (Morais *et al.*, 2022; Sachetti *et al.*, 2009; Millar *et al.*, 2005).

Para avaliação do efeito tóxico em dose única *in vivo* em roedores, foi realizado o protocolo OECD 423 (2002) para teste de toxicidade oral aguda, que visa obter DL50 estimadas com base na classificação GHS (*Globally Harmonized Classification System*). Para isso, foram usados camundongos C57BL/6 fêmeas, pesando 20 a 30g. O protocolo OECD recomenda que sejam usadas fêmeas para testes de toxicidade aguda, uma vez que podem ser mais susceptíveis do que os machos (Sachetti *et al.*, 2009).

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas adequadas, com livre acesso a água e alimentos e foram mantidas em estante ventilada (em temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade controlada, com ciclo claro/escuro de 12 horas) no Laboratório de Toxicologia Experimental e Analítica (LabTOX) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas/FFOE/UFC. Para esse teste com a RIP I foram utilizados 6 animais, considerando todas as etapas definidas no protocolo. Ressalta-se que, a depender da magnitude dos efeitos tóxicos observados, o quantitativo poderia ser ampliado.

Os animais foram alojados inicialmente por 10 dias para aclimação ao local. Após a ambientação, de acordo com protocolo OECD 423 (Anexo B), a primeira etapa de teste consta com aplicação em 3 animais com a dose inicial (5 mg/kg) por gavagem (máximo 1mL/100g de peso corporal), observados por 24 horas para observação de manifestação de efeitos tóxicos ou morte. O número de animais manifestando toxicidade, moribundos ou mortos definiria a próxima etapa do protocolo. Avançando para as demais doses até observar alterações em 2 ou 3 animais, o ensaio é finalizado e foi considerada DL50 estimada menor que aplicada (OECD, 2002; Oliveira, 2017).

O protocolo traz uma progressão de doses testadas de 5 mg/kg > 50 mg/kg > 300 mg/kg > 2000 mg/kg, a fim de alcançar a dose tóxica padrão. Contudo, haja vista que estudo anteriores demonstram que as riparinas possuem baixas propriedades tóxicas em doses usuais (Silvera, 2007; Oliveira, 2012), foi selecionada para iniciar o presente protocolo a dose

máxima 2000 mg/kg, a fim de verificarmos possíveis alterações fisiológicas, mortalidade, sinais indicativos de toxicidade, incluindo alterações no pelo e pele, olhos e membranas mucosas, além de alterações perceptíveis nas funções respiratória, circulatória, motora e comportamental (incluindo convulsões, tremores, salivação, diarreia, letargia e coma) (OECD, 2002).

Os animais foram observados diariamente por 14 dias para observação de mortalidade e sinais de toxicidade (OECD, 2002). Ao final do experimento, foi realizada coleta de sangue pelo plexo retro-orbital para realização de hemograma e para determinação de glicemia, colesterol total e frações, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ureia, creatinina, sódio, potássio e cloreto. Além disso, também foi realizada a coleta de cérebro, fígado, coração e rins para análise macroscópica e histopatológica.

4.1.4. Avaliação do efeito hipolipemiante da RIP I em camundongos

Os camundongos C57BL/6 machos foram aclimatados durante uma semana recebendo água e ração padrão *ad libitum*. Ao atingir a massa corpórea entre 20 e 25g, foram divididos aleatoriamente em 7 grupos experimentais (n=7): controle salina (SAL) (v.o.)+SAL(i.p.); RIP I 100mg/kg(v.o.)+SAL(i.p.); P-407(i.p.)+SAL(v.o.); ciprofibrato (CIP) 100mg/kg(v.o.)+P-407(i.p.); RIP I 100mg/kg(v.o.)+P-407(i.p.); RIP I 50mg/kg(v.o.)+P-407(i.p.); RIP I 25mg/kg(v.o.)+P-407(i.p.) (Tabela 2).

Neste protocolo, a hiperlipidemia foi induzida mediante única injeção intraperitoneal (i.p.) de P-407 na dose de 400mg/kg (Kim *et al.*, 2008; Morais *et al.*, 2022). Os grupos foram tratados quatro vezes, sendo: um pré-tratamento (2h antes da administração de P-407), seguido de tratamentos 24h, 48h e 72h, após a administração intraperitoneal de P-407. Duas horas após o último tratamento, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e submetidos à coleta de sangue pelo plexo orbital. O sangue foi coletado em tubos de coleta heparinizados e centrifugado (4500 rpm por 10 minutos); em seguida, o plasma foi separado e congelado a -20°C para posteriores dosagens bioquímicas de triglicerídeos, colesterol total, AST e ALT, utilizando kits colorimétricos específicos (Labtest®). Ao final, os animais foram eutanasiados por exsanguinação, e submetidos à dessecação do tecido hepático. O tecido foi submetido à análise macroscópica e histopatológica. Além disso, as amostras foram homogeneizadas para determinação dos parâmetros oxidativos (Figura 4).

Tabela 2 – Grupos experimentais.

Grupo experimental	Sigla	Procedimento
Controle	CT	Controle salina (SAL) (v.o.)+SAL(i.p.)
Riparina I	RIP 100	RIP 100mg/kg(v.o.)+SAL(i.p.)
Hiperlipemiante (-)	P407	SAL(v.o.)+P-407(i.p.)
Ciprofibrato (+)	CIP + P407	CIP 100mg/kg(v.o.)+P-407(i.p.)
Riparina I 100	RIP 100 + P407	RIP 100mg/kg(v.o.)+P-407(i.p.)
Riparina I 50	RIP 50 + P407	RIP 50mg/kg(v.o.)+P-407(i.p.)
Riparina I 25	RIP 25 + P407	RIP 25mg/kg(v.o.)+P-407(i.p.)

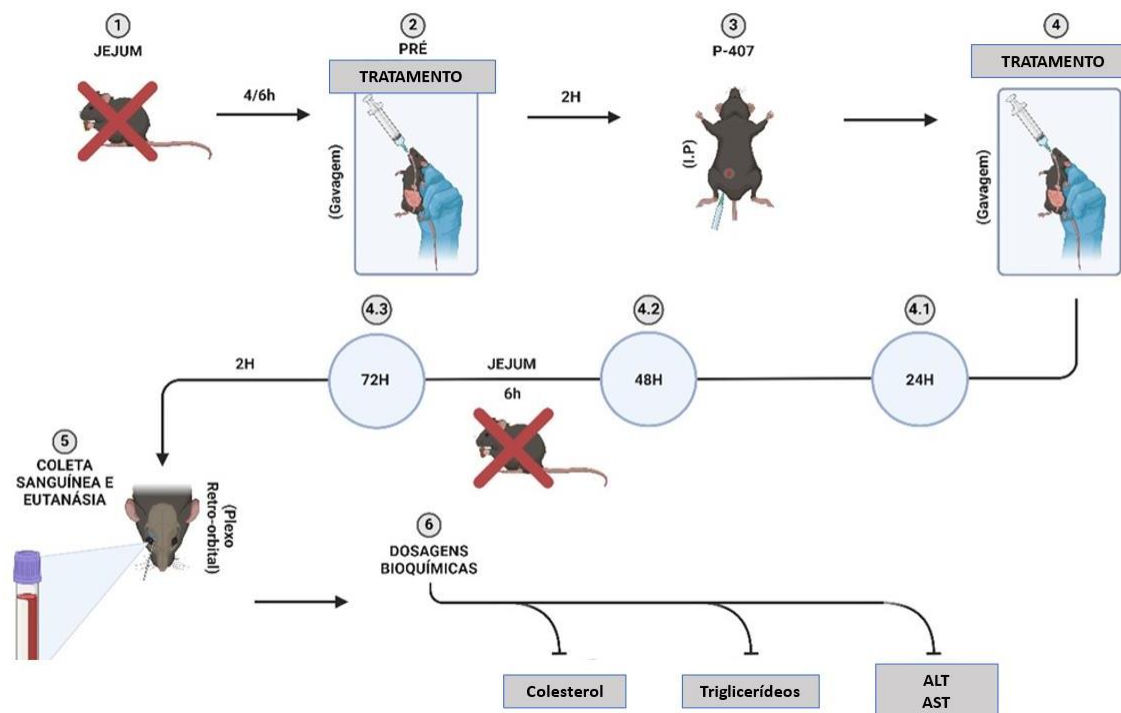
Legenda: SAL: controle salina; (v.o.): via oral; (i.p.): via intraperitoneal; Rip: Riparina 100, 50, 25 (Oliveira, 2012; Sales *et al.*, 2024).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para os ensaios de atividade hipolipemiante, foram utilizados camundongos machos, uma vez que manifestam alterações no perfil lipídico e nos parâmetros metabólicos (como peso, consumo de água e ração) de forma mais sensível que as fêmeas (Nishikawa *et al.*, 2007). O número de animais por grupo foi selecionado com base em estudos prévios publicados (Li *et al.*, 2020; Zarzecki *et al.*, 2014). As doses de RIP I foram selecionadas de acordo com os resultados dos ensaios de toxicidade e estudos com doses previamente testadas (Sales *et al.*, 2024; Mallmann *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2005, 2007; Carvalho *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2013; Silveira, 2007). As doses foram organizadas como: dose alta, maior dose onde não forem observados efeitos tóxicos (100mg/Kg); dose média sendo 50% da alta (50mg/Kg); dose baixa sendo 10% da dose alta selecionada (25mg/Kg).

Vale ressaltar que para realização do modelo experimental, os animais receberam injeção intraperitoneal única de P-407 (400 mg/Kg). A dose de P-407 foi selecionada tomando como base estudos prévios que utilizaram o modelo experimental (Kim *et al.*, 2008; Moraes *et al.*, 2022).

Figura 4 – Linha do tempo do modelo de indução de dislipidemia em camundongos C57BL/6.



Legenda: 1: Os animais foram submetidos a jejum por 4-6h; 2: Pré-tratamento - SAL, CIP, RIP 100, 50, 25; 3: Após 2h do pré-tratamento, foi aplicada única injeção P-407 para indução da dislipidemia; 4: Tratamentos; 4.3: Último dia do protocolo, os animais foram submetidos a jejum 6h; 5: Coleta sanguínea, eutanásia e dessecação do tecido hepático; 6: Dosagens bioquímicas de Ct, Tg, ALT e AST. Abreviaturas: SAL – salina; CIP – ciprofibrato; RIP – riparina. P-407-poloxamer-407; Ct – colesterol, Tg - triglicerídeos; ALT - alanina aminotransferase; AST - aspartato aminotransferase. Fonte: Adaptado de Lima, 2024. (biorender).

4.1.5. Análise de marcadores bioquímicos

Para determinação de colesterol total (Ct), triglicerídeos (Tg), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), as amostras de sangue foram colhidas em *eppendorf* contendo heparina sódica (5000 UI/mL) e centrifugadas (4500 rpm por 10 minutos), a temperatura ambiente 25°C. Então, o soro foi separado e congelado a -20°C para posteriores dosagens, respeitando-se a estabilidade das variáveis analisadas (Silva, 2024).

As quantificações dos analitos foram realizadas utilizando-se kit's enzimáticos colorimétricos (Labtest® e Bioclin®), seguindo as recomendações dos fabricantes, utilizando espectrofotômetro semi-automático Labquest®.

Todas as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC), do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

4.1.6. Análise de marcadores estresse oxidativo

As amostras de tecido hepático congeladas -20°C, foram pesadas e homogeneizadas em solução fosfato tamponada (PBS, constituído de NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM e Na₂HPO₄ 8,1 mM; pH 7,4). Todo o conteúdo foi transferido para *eppendorf*, centrifugado (1000 g/10 minutos/4°C) e o sobrenadante utilizado para os ensaios (Mancini, 2013).

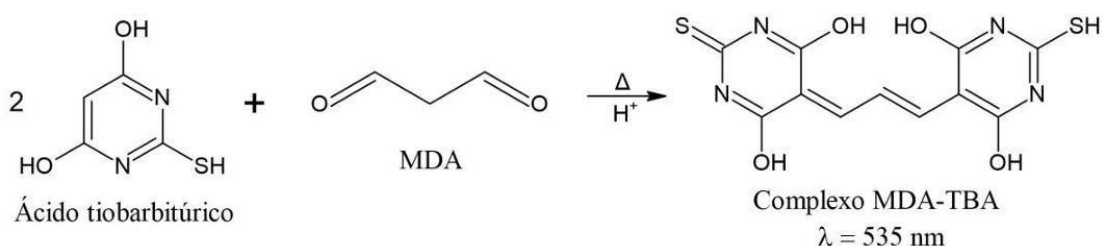
4.1.6.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Malonildialdeído (MDA) é o principal produto de peroxidação lipídica e representante das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) – TBARS. A reação leva a formação de MDA-TBA, produto com coloração rosa cuja intensidade pode ser mensurada por espectrofotometria, de acordo com a figura 5 (Leon, Borges, 2020; Silva, 2024).

Para essa análise, transferiu-se para *eppendorf* 125 µL dos homogenatos (1:10) e adicionou-se 750 µL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 1% e 250 µL de solução de ácido

tiobarbitúrico a 0,6%. Após homogeneização, a mistura foi incubada a 100 °C por 60 minutos. Então, as amostras foram centrifugadas (2000 rpm/10 minutos) e o sobrenadante foi separado para a realização da leitura em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos em microgramas de TBARS por miligrama de proteína ($\mu\text{g}/\text{mg}$) (Ohkawa *et al.*, 1979).

Figura 5 – Reação de detecção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.



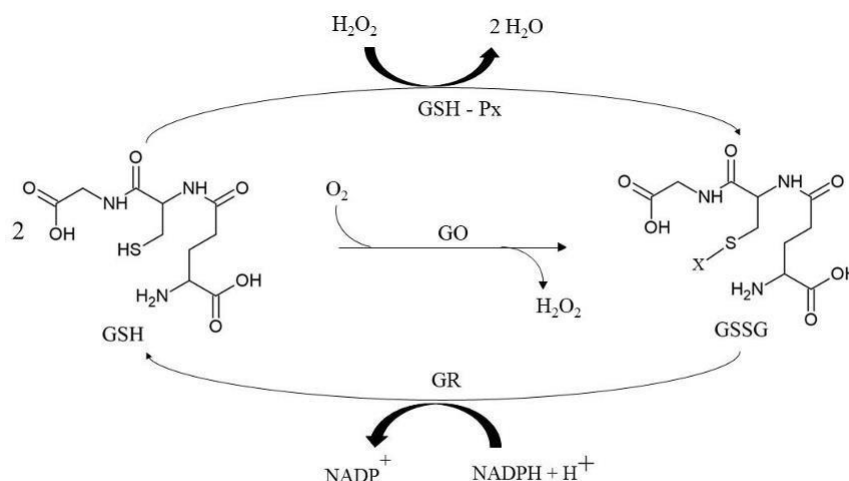
Fonte: Adaptado de Silva, 2024.

4.1.6.2 Glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona na sua forma reduzida (GSH), em condições de estresse oxidativo, é convertida a glutathiona oxidada (GSSG). Esse processo pode ser revertido pela ação da enzima glutathiona redutase (GR) (figura 6). As medidas dos níveis de GSH e GSSG (razão GSH/GSSG) são úteis para a avaliação de estresse oxidativo tecidual, uma vez que, nessas situações, ocorre depleção dos estoques de GSH (Giustarini *et al.*, 2011).

Buscando-se medir os níveis teciduais de GSH, 100 μL de homogenato foram adicionados a 80 μL de água destilada e 20 μL de ácido tricloroacético a 50%. Após agitação, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, retirou-se 100 μL do sobrenadante e adicionou-se a 200 μL de tampão tri-hidroximetil-aminometano (Tris) 0,4 M (pH 8,9). Então, adicionou-se 10 μL do reagente cromogênico ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) 0,01 M. As amostras foram homogeneizadas e, após 3 minutos, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 412 nm. Os resultados foram expressos em microgramas de GSH por miligrama de proteína ($\mu\text{g}/\text{mg}$) (Sampaio, 2016; Silva, 2024).

Figura 6 – Interconversão da glutathiona nas suas formas reduzida e oxidada.



Legenda: Glutathiona reduzida (GSH); Glutathiona oxidada (GSSG) – duas moléculas de glutathiona associadas por ligação de sulfeto (SX); Glutathiona redutase (GR); Glutathiona oxidase (GO); Glutathiona peroxidase (GSH-Px).

Fonte: Adaptado de Silva, 2024.

4.1.6.3 Determinação da atividade enzimática de catalase

A dosagem da CAT (U/mg de proteína), segundo Aebi (1969), foi mensurada em resposta à quantidade de H_2O_2 e lida em um comprimento de onda de 240 nm, após 1 e 6 minutos da adição da amostra ao meio. Alíquotas homogeneizadas foram tratadas com ácido sulfossalicílico na proporção de 1:1, a fim de retirar os debris celulares. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína (Aebi, 1969)

4.1.7. Análise histológica

Os tecidos hepáticos foram fixados em formol tamponado 10% durante 24 e 48 h, respectivamente, e em seguida, conservados em solução formol tamponado a 10%. O processamento histológico, corte em micrótomo, coloração e avaliação histológica foram feitos no Núcleo de Microscopia e Processamento de Imagens (NEMPI) do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Nesse processo, os tecidos passam por etapas de desidratação, diafanização, impregnação e inclusão. Para a etapa de desidratação foi realizada a imersão dos tecidos em soluções alcoólicas em concentrações graduais (70%, 80%, 90% e 100%), sendo repetida a imersão em álcool absoluto. Esse processo tem por finalidade a retirada de água para não interferir na impregnação pela parafina. Em seguida, foi realizada a diafanização ou clarificação dos tecidos. Ocorreu a remoção do álcool residual e sua completa substituição pelo xilol, substância miscível com etanol (agente desidratante) e com a parafina (agente impregnador). Para isso, os tecidos foram imersos em xilol (xilol I e xilol II). Após diafanizadas, as amostras foram impregnadas com parafina líquida para que se tornassem rígidas e fáceis de cortar. A impregnação com parafina elimina o xilol das amostras teciduais e permite sua penetração nos espaços antes ocupados por água ou gordura. Dessa forma, as amostras foram imersas em parafina (parafina I e parafina II) em estufa a 60°C (Silva, 2024).

Posteriormente, foi realizado o procedimento de inclusão que consiste em transferir os tecidos para moldes onde foram envolvidos por parafina líquida. Após resfriamento, os blocos de parafina com os tecidos incluídos foram obtidos. Então, foi realizada a microtomia, para obtenção de cortes finos dos tecidos. Esses cortes foram colocados em banho (50°C) para distensão da parafina, evitando dobras nos tecidos. Os cortes foram postos em lâminas e colocadas em estufa (60°C por 2 horas) (Silva, 2024).

Para realizar a coloração dos tecidos com o corante hematoxilina e eosina (H.E.), as amostras foram desparafinizadas (imersão em xilol I e xilol II por 10 minutos cada), e em seguida hidratados (imersão em soluções decrescentes de álcool etílico (álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool 90%, 80%, 70% e água destilada por 1 minuto cada)). Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada e tratadas com hematoxilina por 3 minutos. Novamente, as lâminas foram lavadas com água destilada e corada com eosina (imersas durante 7 minutos). As lâminas foram desidratadas, clarificadas e, posteriormente, levadas para análise ao microscópio (Silva, 2024).

4.1.8. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram submetidos a análise de variância One-way (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni, adotando-se como critério de significância $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software GraphPad Prism* 8.0 (versão 8.0, San Diego, EUA).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da toxicidade oral aguda da RIP I em camundongos.

A dose oral de RIP I usada foi de 2000 mg/kg (n=3); as doses foram administradas de acordo com o procedimento de toxicidade oral aguda, segundo a OCDE 423 (Anexo B). Nenhuma morte foi registrada. Não houve mudança significativa no comportamento ou quaisquer sinais de toxicidade durante o período experimental. O peso corporal dos camundongos não foi afetado pela administração da RIP I. Portanto, a toxicidade oral desta substância foi classificada como categoria 5, que contém substâncias com toxicidade relativamente baixa (toxicidade aguda letal maior que 2000 mg/kg), de acordo com o *Globally Harmonized Classification*, OCDE (2002).

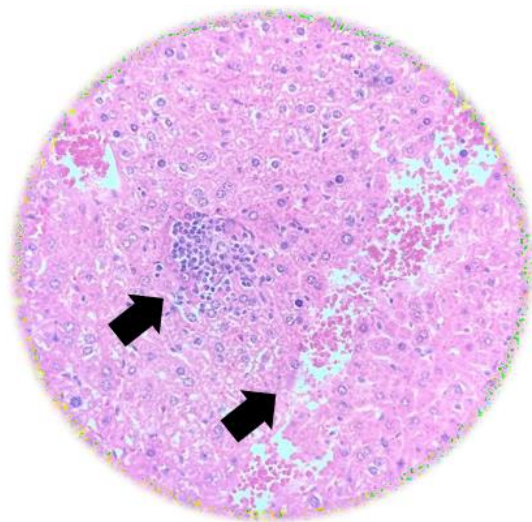
Ao final dos 14 dias de protocolo, foram realizadas as dissecações de cérebro, fígado, coração e rins para análise macroscópica e histopatológica.

As lâminas histológicas dos fígados dos camundongos submetidos a dose 2000 mg/kg de RIP I evidenciaram áreas de células degeneradas, células necróticas com núcleos picnóticos e área focal de infiltrado inflamatório (Figura 7).

As lâminas histológicas dos corações dos camundongos submetidos a dose 2000 mg/kg de RIP I evidenciaram áreas discretas de hipertrofia e ocasionais áreas de necrose, sem a presença de infiltrado inflamatório (Figura 8).

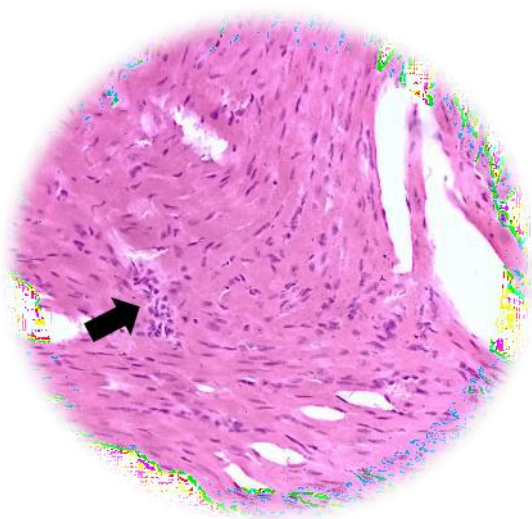
As lâminas histológicas dos cérebros e rins dos camundongos submetidos a dose 2000 mg/kg de RIP I não tiveram alterações significativas.

Figura 7 - Análise histológica do tecido hepático submetido ao protocolo de toxicidade aguda OECD 423.



Legenda – Área focal de infiltrado inflamatório. Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 8 - Análise histológica do tecido cardíaco submetido ao protocolo de toxicidade aguda OECD 423.



Legenda – Área de necrose entre as fibras musculares cardíacas (seta preta). Fonte: elaborado pelo autor.

5.2 Avaliação bioquímica da atividade hipolipidêmica da RIP I em protocolo de dislipidemia induzida por poloxamer P-407 em camundongos.

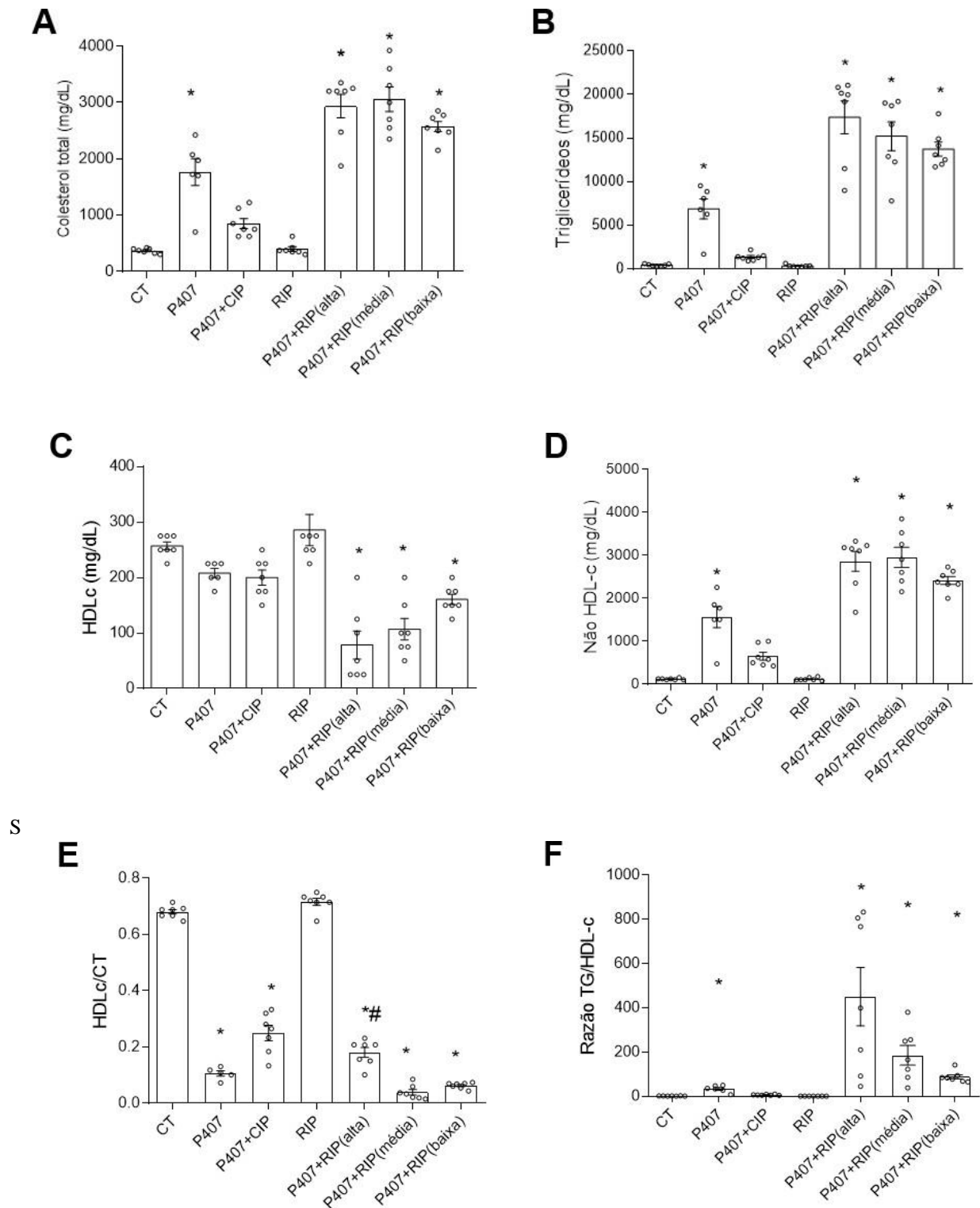
A partir das amostras de soro, foram mensurados os níveis de colesterol total (Ct), triglicerídeos (Tg), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), para avaliação do metabolismo lipídico e da função hepática (Figura 9 e 10).

Todas as doses de riparinas não foram capazes de reduzir os níveis de CT em comparação ao grupo P407 ($296,0 \pm 130,0$) (Figura 9A). Quanto aos níveis de TG, nos grupos tratados com as doses de riparinas, também não foram identificadas uma redução em relação ao grupo P407 ($296,0 \pm 130,0$) (Figura 9B). Não foi apresentada diferenças do grupo CT ($367,0 \pm 17,1$) comparado com RIP ($400,0 \pm 40,0$) para colesterol e triglicerídeos. O ciprofibrato foi capaz de reduzir as taxas de CT e TG, quando comparado ao P407, mas os grupos tratados com RIP não demonstraram redução desse parâmetro (Figura 9).

As doses de riparinas, P407+RIP alta ($43,7 \pm 17,0$), P407+RIP média ($34,1 \pm 13,9$) e P407+RIP baixa ($24,3 \pm 9,2$), demonstraram um aumento significativo do HDLc, no comparativo com o grupo P407 ($208,0 \pm 8,3$) (Figura 7C). Também foram identificadas aumento significativo nos índices do Colesterol Não-HDL, na razão HDLc/CT e TG/HDLc, principalmente no grupo P407+RIP alta ($43,7 \pm 17,0$) (Figura 9E-F).

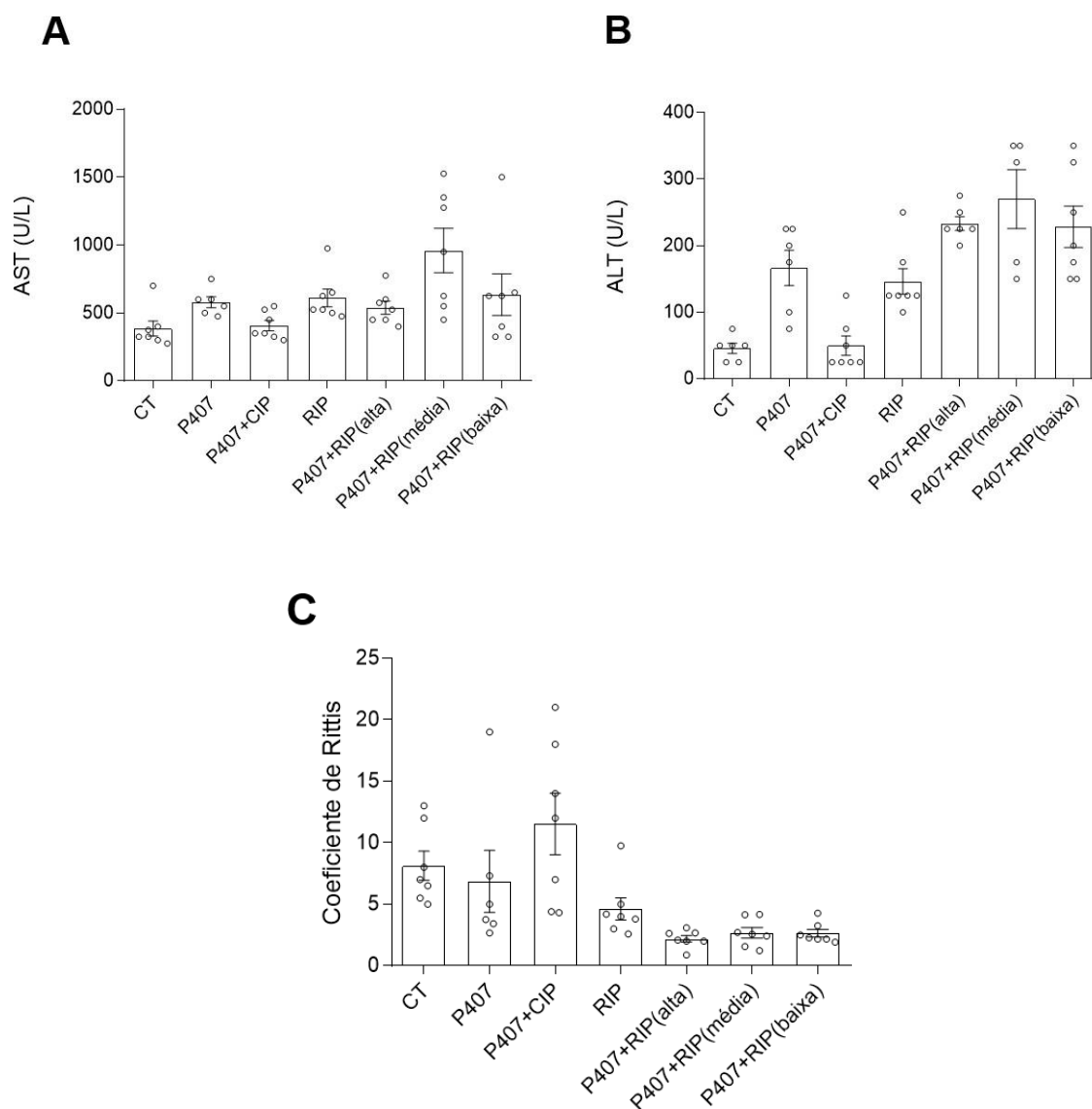
Em relação aos níveis de marcadores hepáticos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), não foram identificados aumentos significativos entre todos os grupos. As doses de riparinas testadas também não influenciaram no aumento ou déficit significativo desses marcadores, concluindo que a RIP I não gera prejuízos ao tecido quanto ao equilíbrio de suas funções, na perspectiva do modelo de dislipidemia induzida por poloxamer P407, podendo ser confirmado no grupo RIP de AST ($550,0 \pm 28,8$) e ALT ($129,1 \pm 10,0$) comparado ao CT de AST ($385,7 \pm 19,0$) e ALT ($53,5 \pm 10,1$) (Figura 10).

Figura 9 - Marcadores bioquímicos plasmáticos de camundongos submetidos ao modelo de dislipidemia.



Legenda - Indução de dislipidemia por poloxamer P-407 (exceto CT e RIP) e tratamento dos grupos controle negativo (P407), controle positivo/ciprofibrato 100 mg/Kg (P407+CIP), riparina I 100mg/Kg (RIP), riparina I 100mg/Kg (P407+RIP alta), riparina I 50mg/Kg (P407+RIP média), riparina I 25mg/Kg (P407+RIP baixa). Os resultados dos grupos experimentais (n=7) foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). (*p<0,05 vs. CT e #p<0,08 vs. P407). Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 10 - Marcadores bioquímicos (AST e ALT) de camundongos submetidos ao modelo de dislipidemia.



Legenda - Indução de dislipidemia por poloxamer P-407 (exceto CT e RIP) e tratamento dos grupos controle negativo (P407), controle positivo/ciprofibrato 100 mg/Kg (P407+CIP), riparina I 100mg/Kg (RIP), riparina I 100mg/Kg (P407+RIP alta), riparina I 50mg/Kg (P407+RIP média), riparina I 25mg/Kg (P407+RIP baixa). Coeficiente de Rittis (Razão de ALT/AST). Os resultados dos grupos experimentais (n=7) foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), onde critério de significância $p < 0,05$. (* $p < 0,05$ vs. CT). Fonte: elaborado pelo autor.

5.3 Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo

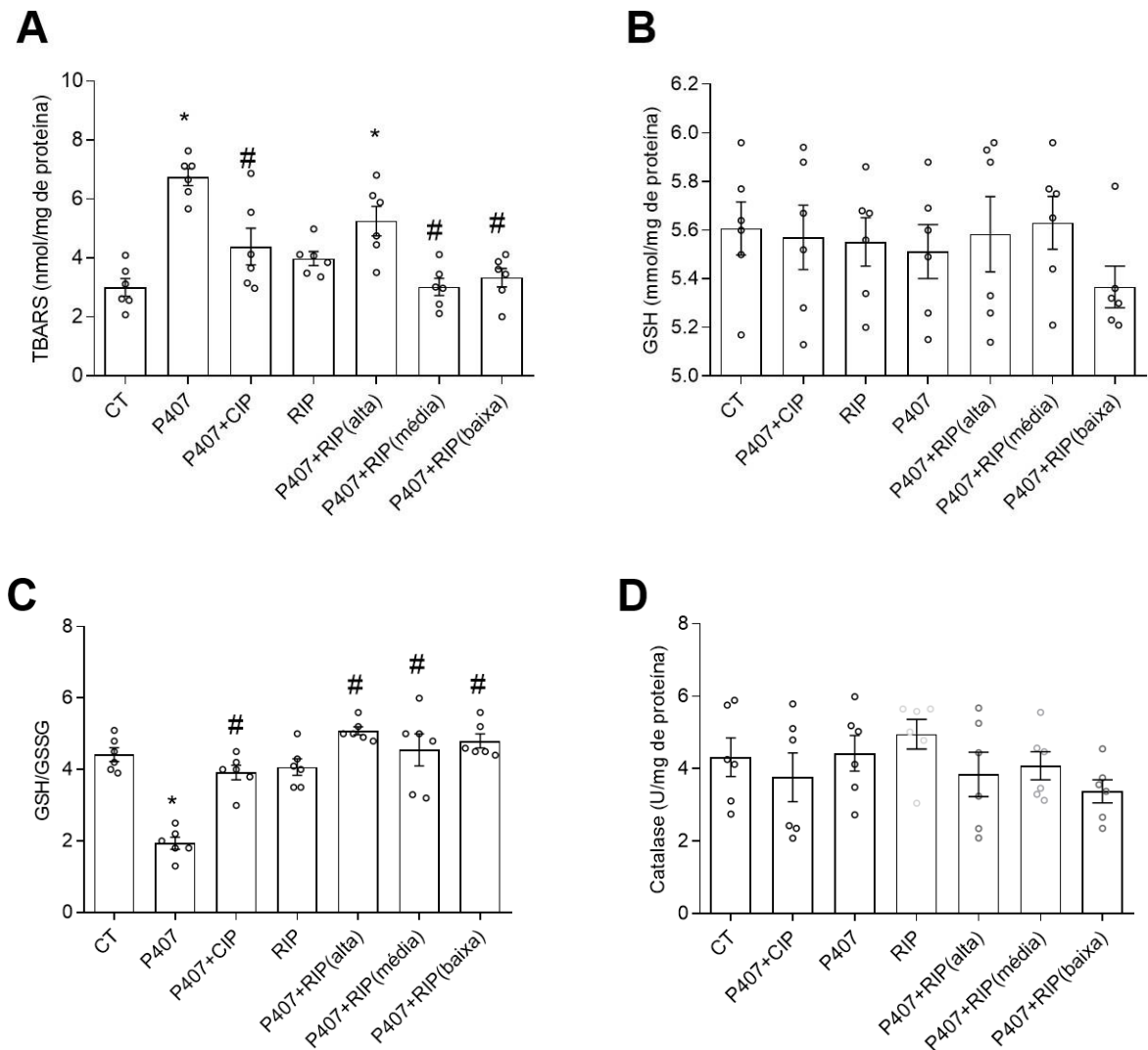
Após a realização do modelo experimental, o tecido hepático dos animais foi colhido para investigação do efeito da RIP I sobre mediadores envolvidos no estresse oxidativo, uma vez que a dislipidemia pode gerar um desbalanço redox no fígado. Devido a isso, foram determinadas as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Figura 11A), glutathiona reduzida (GSH) (Figura 11B-C) e atividade enzimática de catalase (Figura 11D).

Em primeira análise, a produção de TBARS foi avaliada a fim de medir a capacidade da RIP I em prevenir a lipoperoxidação no tecido hepático. Os resultados mostraram que as 3 doses de riparinas, (P407+RIP alta), (P407+RIP média) e (P407+RIP baixa), reduziram a concentração de TBARS em relação ao grupo P407 (dislipidêmico). O grupo controle positivo ciprofibrato (P407+CIP) também reduziu a concentração de TBARS nas amostras.

Em segunda análise, a glutathiona reduzida representa uma das principais defesas antioxidantes nos tecidos, por meio da neutralização de espécies oxidantes teciduais; isso o resulta a importância da redução do conteúdo de GSH nas análises, identificando um fator crítico de estresse oxidativo. No tecido hepático, foi observado resultado semelhante, de forma que, para todas as doses de RIP I, foram capazes de manter os níveis de GSH equiparados ao grupo controle. Ao analisar a razão GSH e GSSH (glutathiona oxidada), foi verificado que o tratamento com as 3 doses de RIP I reverteram o consumo de GSH comparados ao grupo dislipidêmico P407.

A indução da dislipidemia nos camundongos não afetou a atividade enzimática de catalase (U/mg de proteína) em tecido hepático, sendo observado resultado semelhante entre todos os grupos, incluindo as doses de RIP I, as quais não tiveram diferenças significativas com o grupo controle, mantendo-os equiparados.

Figura 11 - Marcadores do estresse oxidativo no tecido hepático de camundongos submetidos ao modelo de dislipidemia.



Legenda - TBARS = Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína); GSH = glutathiona reduzida ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína); Catalase (U/mg de proteína); CT = controle; P407 = dislipidêmico; CIP = ciprofibrato; Riparina I 100mg/Kg (RIP), RIP = riparina (alta 100mg/Kg, média 50mg/Kg e 25mg/Kg baixa). A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. (* $p < 0,05$ vs. CT e # $p < 0,08$ vs. P407). Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 3 – Valores médios dos marcadores de estresse oxidativo em fígado de camundongos C57BL/6 em modelo de indução de dislipidemia.

Grupo	TBARS	GSH	Catalase
CT	2,78 ± 0,2	5,69 ± 0,07	4,62 ± 2,8
RIP 100	6,95 ± 0,2	5,58 ± 1,0	4,76 ± 0,3
P407	3,89 ± 0,4	5,65 ± 0,1	3,35 ± 0,5
CIP + P407	3,78 ± 0,1	5,62 ± 0,07	5,33 ± 0,1
RIP 100 + P407	4,94 ± 0,4	5,67 ± 0,1	4,19 ± 0,5
RIP 50 + P407	2,80 ± 0,2	5,71 ± 0,07	3,78 ± 0,2
RIP 25 + P407	3,59 ± 0,1	5,39 ± 0,08	3,14 ± 0,2

Legenda - TBARS = Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (µg/mg de proteína); GSH = glutatona reduzida (µg/mg de proteína); Catalase (U/mg de proteína); CT = controle; P407 = dislipidêmico; CIP = ciprofibrato; RIP = riparina (alta 100mg/Kg, média 50mg/Kg e 25mg/Kg baixa). A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.3 Análise histológica do tecido hepático

A partir das análises histológicas, foi constatado que os tecidos hepáticos dos animais não apresentaram alterações significativas quanto ao protocolo de dislipidemia induzida por poloxamer P407. Não foram identificadas alterações significativas macroscópicas e histopatológicas, áreas de células degeneradas, células necróticas com núcleos picnóticos e área com infiltrado inflamatório. Não foram encontrados lipídeos perinucleares, distorção da razão núcleo/citoplasma dos hepatócitos e degeneração nuclear, relacionados com esteatose hepática.

Vale ressaltar que nos tecidos hepáticos, as 3 doses de riparinas, RIP, P407+RIP alta, P407+RIP média, P407+RIP baixa, não foram capazes de alterar quaisquer marcadores citados anteriormente. Portanto, pode-se concluir que a RIP I não gera prejuízos ao tecido e a homeostase de suas funções, na perspectiva do modelo de dislipidemia induzida por poloxamer P407.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O protocolo de toxicidade aguda utilizado é tratado como método para classificar e rotular substâncias de acordo com o seu potencial de toxicidade ou letalidade (Valadares, 2006). Para isso, é fundamental que haja um controle científico devidamente estruturado e validado, preferencialmente, protocolos internacionalmente aceitos, como o da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Co-operation and Development*-OECD). Tais protocolos são de grande aceitação pelos órgãos reguladores na avaliação da toxicidade aguda para qualquer tipo de substância, priorizando os princípios do bem estar animal. A toxicidade aguda é tratada pela organização no protocolo 423, do Guia OECD (OECD, 2002), este aborda pilares como da economia no uso de animais, reprodutibilidade de experimentos e classificação de substâncias (*Globally Harmonised System* – GHS). Vale ressaltar que o Guia 423, substitui o Guia 401, juntamente com os guias 420 e 425, desde 2001, devido ao fato do 401 abordar o uso progressivo da DL50 (dose que mata 50% da população em estudo), indo ao contrário a política dos 3Rs (*reduction, replacement e refinement*), institucionalizada na academia por Russell-Burch (1959), tratando as ideias de “redução, substituição e refinamento” no uso racional de animais de laboratório (Sachetti *et al.*, 2009).

A importância de trabalhar com o protocolo de toxicidade em questão é evidenciada nos protocolos seguintes, pois são imprescindíveis nos cálculos de doses para possíveis tratamentos em pesquisas científicas. Neste sentido, estudos anteriores demonstram que as riparinas possuem baixas propriedades tóxicas em doses usuais (100mg/Kg, 50mg/Kg, 25 mg/Kg) (Silvera, 2007; Oliveira, 2012), contudo, não foram realizados de acordo com os parâmetros da OECD 423, validando este protocolo utilizado na presente dissertação.

No protocolo de dislipidemia, foi utilizado o método de indução por poloxamer P-407, substância essa surfactante não-iônico hidrofílico, capaz de causar o aumento nas lipoproteínas do soro e inibir a lipase endotelial, hepática e lipase lipoprotéica (LPL), principal enzima responsável pela hidrólise de lipoproteínas plasmáticas contendo Tg, ocasionando o aumento de triglicerídeos. Estimula indiretamente a enzima 3-hidroxi-3metilglutaril coenzima A redutase (HMGCoA redutase), resultando em aumento dos níveis circulantes de colesterol total. Isso traz um entendimento de sua participação direta no metabolismo lipídico, e por isso é extensamente utilizado em protocolos experimentais de dislipidemia (Rodrigues, 2015; Silva, 2024; Morais, 2022; Chaudhary, Brocks, 2013; Wasan *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2012). Além disso, outro potencial é discutido por pesquisadores,

demonstrando que o P407 tem ação inibitória da enzima 7- α hidroxilase, em doses repetidas, o que prejudica a eliminação do colesterol na bile, podendo resultar no diagnóstico de hipercolesterolêmico (Johnston, Zhou, 2007).

A escolha por esse modelo de indução traz benefícios práticos quando comparado com outros protocolos para o mesmo fim. Entre as comparações, segundo Rodrigues (2015) e Johnston et al. (2002), este não requer a adição de ácido cólico na dieta. Não necessita de animais *knock out* para genes, por exemplo, apolipoproteína E (apoE) e proteína quimioatrativa de monócitos (MP-1, monocyte chemoattractant protein-1), o qual é tratado como uma drástica mudança na fisiologia normal de vertebrados. Além disso, mostra-se como um método preciso de hiperlipidemia dose dependente e permite a avaliação da potência de drogas hipolipemiantes de várias classes, como as estatinas, fibratos e inibidores de PCSK9.

Diversos estudos evidenciam a ação hiperlipidêmica do poloxamer P-407, já referenciada em inúmeras pesquisas validadas (Korolenko *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2012; Vaidya *et al.*, 2009; Zanzwar *et al.*, 2014).

Não há relatos na literatura do uso de riparina I como agente hipolipemiante em modelo de dislipidemia induzida por poloxamer P-407 em camundongos. A fim de contribuir com a comunidade científica, foi verificada a ação da RIP I na dislipidemia e o tratamento em 3 doses via gavagem, as doses de 100mg/Kg (alta dose), 50mg/Kg (média dose) e 25mg/Kg (baixa dose).

As doses de RIP utilizadas foram previamente estipuladas de acordo com um arcabouço de trabalhos publicados constando as inúmeras atividades biológicas das riparinas, entre elas, ansiolítica, antidepressiva, antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva; sendo a dose média, 50mg/Kg, a dose terapêutica usual em animais (Oliveira, 2012; Sales *et al.*, 2024; Mallmann *et al.*, 2021; De Sousa *et al.*, 2005, 2007; Carvalho *et al.* 2014; Teixeira *et al.*, 2013; Silveira, 2007).

No presente trabalho, os níveis de colesterol e triglicerídeos aumentaram significativamente nos animais que receberam poloxamer e nenhum tratamento, conforme esperado pelos achados na literatura científica. Os animais tratados com ciprofibrato, padrão-ouro, tiveram os níveis de Ct e Tg reduzidos após administração. Os grupos tratados com RIP, nas doses alta, média e baixa, não obtiveram redução nos níveis plasmáticos de Ct e Tg. Concomitantemente a isso, os níveis de AST e ALT não constaram aumento significativo neste experimento.

As aminotranferases são enzimas indicadoras de função hepática; a ALT, localizada no citosol dos hepatócitos, é marcador mais sensível de dano hepatocelular, já a

AST, por ser encontrada majoritariamente no interior da mitocôndria (80%), sugere dano crônico e mais grave (Rodrigues, 2015; Li *et al.*, 2011; Mabeku *et al.*, 2007). Quanto a não alteração da atividade das transaminases hepáticas no protocolo de dislipidemia, estudos afirmam que os níveis de AST e ALT, em modelo de indução de dislipidemia por poloxamer P407, tendem a aumentar nas primeiras 24h, porém, após isso, tendem a normalizar nas 24h posteriores (Wang *et al.*, 2015). Este curto aumento pode ser justificado pela inibição de enzimas fundamentais no metabolismo lipídico nas primeiras 24h, como a lipoproteína lipase, em conjunto com substâncias absorvidas pelo fígado, sobrecarregando-o, causando aumento das transaminases hepáticas. Após 24h devido a curta meia vida do poloxamer e reversão da atividade do LPL ou outras relacionadas ao metabolismo lipídico, as transaminases tendem a normalizar (Johnston, 2010).

Haja vista que, para o desenvolvimento pertinente das alterações das transaminases hepáticas, estudos trazem a indicação de modelos de dieta hiperlipídica. O consumo de dietas hipercalóricas favorece o processo de deposição de triglicerídeos no tecido adiposo, que recebe estímulo para formação de novos adipócitos (adipogênese), além de ocorrer aumento do tamanho celular (hipertrofia) para comportar maior quantidade de TG. Tais modelos, com durabilidade 03 – 04 semanas, onde o animal será induzido à obesidade e efeitos crônicos da doença, sem intervenção medicamentosa e/ou pontual; possibilitando, inclusive, o aparecimento de esteatose hepática não alcoólica (EHNA) Estudos comprovaram que o alto teor de gordura nas rações utilizadas em modelos experimentais de indução de obesidade são ferramentas úteis para a indução de adipogênese e o desenvolvimento de síndrome metabólica, o que possibilita a avaliação do efeito hipolipemiante e antiobesidade de substâncias promissoras (Brahmanaidu *et al.*, 2014; Seo *et al.*, 2018; Silva, 2024).

Pode-se inferir que a duração do tratamento nesse trabalho não foi suficientemente longo para causar tal eficiência quando ao resultado da indução em tecido hepático, sendo recomendável experimentos com dieta hiperlipídica para validarem as questões acima.

Como no presente trabalho não houve redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos no protocolo de dislipidemia por poloxamer P-407, pode-se conjecturar que a RIP, nas doses estudadas, não foi capaz de reduzir a atividade da HMG-CoA redutase e reverter a inibição da LPL, respectivamente. Contudo, houve um aumento significativo dos níveis de HDL tratados com as doses de RIP; isto, pode ser conjecturar de forma positiva nos resultados antioxidantes, pois pesquisas trazem que o HDLc apresentar diversas ações biológicas, entre elas, a contribuição no efeito antioxidante nos vasos e tecidos (Ibrahim, 2010; Précoma, *et al.*, 2019; Silva, 2024; Siasos *et al.*, 2011).

Sabendo-se do efeito antioxidante da RIP em tecido cerebral (Sales *et al.*, 2024; Mallmann *et al.*, 2021), foram mensurados marcadores de estresse oxidativo em homogenatos de tecidos hepático dos animais. O tratamento com RIP preveniu o aumento de TBARS e o consumo de GSH/GSSH, quando comparados ao grupo dislipidêmico. Não houve alterações significativas na atividade da catalase hepática. Em relação ao perfil oxidativo dos camundongos dislipidêmicos, foi visto uma piora, expressa por aumento dos níveis de TBARS e redução de GSH/GSSH.

Diante do exposto, é necessário compreender os motivos pelos quais a RIP I não tenha obtido resultado semelhantes ao estudo de Moraes (2022), que trabalhou com a tiramina e demonstrou sua eficácia quanto molécula com potencial efeito antiobesidade, hipolipemiante e antioxidante. As riparinas I, II e III são metabólitos derivados da tiraminas, a RIP I ([[(O-Metil)-N-benzoil-tiramina]), portanto, poderiam ter efeitos similares por essa associação.

O estudo recente desenvolvido por Lima *et al.* (2024) demonstrou que a riparina II ([[(O-Metil)-N-2- hidroxi-benzoil-tiramina) – RIP II, foi capaz de reverter o aumento nos níveis de colesterol e triglicerídeos, causados por P-407, sem toxicidade aparente, da mesma forma em que a tiramina no trabalho de Moraes et al. (2022). Isso traz um questão a ser observada, quais diferenças entre a RIP I e II que resultaram nestas respostas? À vista disso, é preciso compreender que a RIP I não possui grupo hidroxila (-OH) associada ao sua molécula, diferente da RIP II, a qual possui grupo hidroxila (-OH) ligado ao segundo carbono da cadeia (Nascimento *et al.*, 2016).

A estrutura diferente sem hidroxila pode ser observada como uma das justificativas da ausência do efeito hipolipemiante comparado. A ausência da hidroxila no grupo RIP I, pode ser vinculada ao conceito de grupo farmacofórico, o qual é classificado como o conjunto de características estruturais em uma molécula que é reconhecida em um sítio receptor e é responsável pela sua atividade biológica (Ehrlich, 1909). Ou seja, a posição e estrutura da molécula é fundamental para garantir as interações moleculares ideais com um alvo biológico específico, para desencadear ou bloquear sua resposta biológica (Güner, 2002). Resultando na presente hidroxila da RIP II, ausente em RIP I, ser classificada como elemento farmacofórico, devido a sua exata posição na molécula que traz uma conformidade nas reações envolvidas no metabolismo lipídico.

Especula-se que esse seja um dos possíveis mecanismos pelo qual a RIP I não tenha obtido os resultados do efeito hipolipemiante.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, a riparina I mostrou não ser capaz de reduzir as taxas de colesterol e triglicerídeos de camundongos em modelo de indução de dislipidemia por poloxamer P407. Entretanto, demonstrou ser promissora quanto ao seu potencial antioxidante e no aumento dos níveis de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDLc). Pode-se destacar que diante das doses de tratamento com riparina I, não foram identificadas alterações significativas macroscópicas e histopatológicas no tecido hepático do protocolo de dislipidemia, e foi reconhecido sua baixa toxicidade vista nos tecidos cardíaco, hepático, renal e cerebral. À vista disso, é válido futuros experimentos que estudem a riparina I em modelo crônico de dislipidemia induzida por dieta hiperlipídica, a fim de verificar sua ação, sem a indução medicamentosa, por meio da obesidade em camundongos.

REFERÊNCIAS

- ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Diretrizes brasileiras de Obesidade 2016**. Portal de Boas Práticas em Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente. São Paulo, 4 ed. 2016. Disponível em: <https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/biblioteca/diretrizes-brasileiras-de-obesidade-2016abeso/>. Acesso em: 22 nov. 2024.
- AEBI, H. Erythrocyte catalase. **Expos Annu Biochim Med**, v. 29, p. 139 – 66. 1969.
- ALCÂNTARA NETO, O. D. et al. Fatores associados à dislipidemia em crianças e adolescentes de escolas públicas de Salvador, Bahia. **Rev. bras. Epidemiol**, v. 15, n. 2. 2012. DOI: 10.1590/S1415-790X2012000200011
- ALMEIDA JÚNIOR, A. B. *et al.* **Fisiopatologia e tratamentos atualmente disponíveis para dislipidemia**. Cardiologia em Foco: prevenção, diagnóstico e tratamentos atuais Editora Epitaya. 2023. ISBN: 978-65-87809-80-9.
- ANDRADE, R. S.; CESSÉ, E. A. P.; FIGUEIRÓ, A. C. Bariatric surgery: complexities and pathways to care for obesity in the SUS, **Saúde Debate**, v. 47, n. 15, p. 138, 2023. DOI: 10.1590/0103-1104202313820.
- BARBOSA FILHO, J. M. Benzoly Esterys and Amines, Stryrylpyrones and Neoligmans from the frutis of anibia riparia. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2615-7. 1987.
- BARBOSA FILHO, J. M.; SILVA, E. C. DA; BHATTACHARYYA, J. Synthesis of several new phenylethylamides of substituted benzoic acids. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 332–334, 1990.
- BEDÊ, T. P. *et al.* Effect of grape juice, red wine and resveratrol solution on antioxidant, anti-inflammatory, hepatic function and lipid profile in rats feds with high-fat diet. **Natural Product Research**, v. 35, n. 23, p. 5255–5260, 2020.
- BERGER, J. S.; LADAPO, J. A. Underuse of prevention and lifestyle counseling in patients with peripheral artery disease. **J Am Coll Cardiol**, v. 69, p. 2293–2300. Cardiologia em Foco: prevenção, diagnóstico e tratamentos atuais Editora Epitaya, Rio de Janeiro, 2023.
- BRAHMANAIDU, P. *et al.* Mitigating efficacy of piperine in the physiological derangements of high fat diet induced obesity in Sprague Dawley rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 221, p. 42–51. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças crônicas: Saúde apresenta atual cenário das doenças não transmissíveis no Brasil**. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/ptbr/assuntos/noticias/2021-1/setembro/saude-apresenta-atual-cenario-das-doencas-naotransmissiveis-no-brasil>. Acesso em: 20 nov. 2024.

BRASIL. Vigitel Brasil 2016. **Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília, Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2016_fatores_risco.pdf. Acesso em: 22 nov. 2024.

CAMARGO, J. S. *et al.* Prevalência de obesidade, pressão arterial elevada e dislipidemia e seus fatores associados em crianças e adolescentes de um município amazônico. **Rev Bra Cresc e Desv Hum**, v. 1, n. 31, p. 37-46. 2021. DOI:10.36311/jhgd.v31.11209.

CARPÉNÉ, C.; GALITIZKI, J.; BELLES, C.; ZAKAROFF-GIRARD, A. Mechanisms of the antilipolytic response of human adipocytes to tyramine, a trace amine present in food. **J Physiol Biochem**, v. 4, n. 74, p. 623-633. 2018.

CARVALHO, A. M. *et al.* Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chem Biol Interact**, v. 3, n. 205. 2014. DOI: 10.1016/j.cbi.2013.07.007. Epub 2013 Jul 17. PMID: 23872256.

CASTELO-BRANCO, U. V. *et al.* Preliminary Pharmacological Studies on three Benzoyl Amides, constituents of Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v. 19, n. 3, p. 197-202, 2000.

CHAUDHARY, H. R.; BROCKS, D. R. The single dose poloxamer 407 model of hyperlipidemia; systemic effects on lipids assessed using pharmacokinetic methods, and its effects on adipokines. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences*, **Société canadienne des sciences pharmaceutiques**, v. 16, n. 1, p. 65–73, jan. 2013.

EHRlich, P. Dtsch. **Chem. Ges**, v. 42, p.17. 1909.

EVANGELISTA, K. C., LEITE, L. D., LIMA, S. C. **Doenças Cardiovasculares**. Em S. M. Cozzolino, & C. Cominetti, *Bases Bioquímicas e Fisiológicas da Nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença*, p. 811-853. 2013.

ERENCE, B. A. *et al.* Low-density Lipoproteins Cause Atherosclerotic Cardiovascular Disease. 1. Evidence From Genetic, Epidemiologic, and Clinical Studies. A Consensus Statement From the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. **Eur Hear J**, v. 32, n. 38, p. 2459-72. 2017.

FORTI, N.; DIAMENT, J. Efeitos indesejáveis dos hipolipemiantes: condutas na prática clínica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 4, 2008.

FRANCISQUETI, F. V. *et al.* The role of oxidative stress on the pathophysiology of metabolic syndrome. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n. 1, p. 85–91. 2017.

FREIRE, P. **Pedagogia da indignação: cartas pedagógicas e outros escritos**. São Paulo: Unesp, 2000.

GAINETDINOV, R. R.; HOENER, M. C.; BERRY, M. D. Trace amines and their receptors. **Pharmacol Rev**, v. 3, n. 70, p. 549 – 620. 2018.

GIUSTARINI, D. *et al.* Low molecular mass thiols, disulfides and protein mixed disulfides in rat tissues: Influence of sample manipulation, oxidative stress and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, n. 4, p. 141–148. 2011.

GOWDY, K. M.; FESSLER, M. B. Emerging roles for cholesterol and lipoproteins in lung disease. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 4, n. 26, p. 430-7. 2013. DOI: 10.1016/j.pupt.2012.06.002.

GÜNER, O. F. History and Evolution of the Pharmacophore Concept in Computer-Aided Drug Design. **Curr. Topics Med. Chem**, v.2, p.1321-1332. 2002.

HAN, L. *et al.* PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR - and PPAR. **Future Cardiol**, v. 13, p. 279–296. 2017.

HE, C.; FU, P.; ZHANG, K.; XIA, Q.; YANG, Y.; XIE, L. Chinese herbal medicine for dyslipidemia: protocol for a systematic review and meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**, v. 44, n. 97, p. e13048. 2018.

HEDAYATNIA, M. *et al.* Dyslipidemia and cardiovascular disease risk among the MASHAD study population. **Lipids in Health and Disease**, v. 19, n. 1, 2020.

HIROTA, T.; FUJITA, Y.; IEIRI, I. An updated review of pharmacokinetic drug interactions and pharmacogenetics of statins. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 9, n. 16, p. 809 – 822. 2020.

IBRAHIM, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity Reviews**, v. 11, n. 1, p. 11–18. 2010.

ISLA, L. P.; VALDIVIELSO, P. **Nuevos tratamientos en la dislipemia, Clínica e Investigación en Arteriosclerosis**, v. 33, n. 1, p. 1-2, 2021. DOI: 10.1016/j.arteri.2021.02.003.

JIN, X. *et al.* Pathophysiology of obesity and its associated diseases. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 13, n. 6, p. 2403–2424. 2023.

JOHNSTON, T. P. Poloxamer 407 as a general lipase inhibitor: its implications in lipid metabolism and atheroma formation in C57BL/6 mice. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 62, n. 12, p. 1807–12. 2010.

JOHNSTON, T. P.; ZHOU, X. Oxidation of Low-Density Lipoprotein Cholesterol Following Administration of Poloxamer 407 to Mice Results From an Indirect Effect. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 49, n. 4, p. 246–252. 2007.

KELLY, T. *et al.* Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. **Int J Obes**, v. 32,

n. 9, p. 1431. 2008.

KIM, H.Y. *et al.* Hypolipidemic effects of *Sophora flavescens* and its constituents in poloxamer 407-induced hyperlipidemic and cholesterol-fed rats. **Biol Pharm Bull**, v. 1, n. 31, p. 76-8. 2008.

KNUUTI, J. *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes: the Task Force for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC). **Eur Heart J**, v. 41, p. 407–477. 2020.

KOPIN, L.; LOWENSTEIN, C. Dyslipidemia. **Ann Intern Med**, v. 167, n. 11. 2017. DOI: 10.7326/AITC201712050.

KOROLENKO, T. A. *et al.* Effect of poloxamer 407 administration on the serum lipids profile, anxiety level and protease activity in the heart and liver of mice. **Interdisciplinary toxicology**, v. 6, n. 1, p. 18–25. 2013.

LEE, Y. S. *et al.* Effects of poloxamer 407-induced hyperlipidemia on the pharmacokinetics of carbamazepine and its 10,11-epoxide metabolite in rats: Impact of decreased expression of both CYP3A1/2 and microsomal epoxide hydrolase. **European Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 6, p. 431–440. 2012.

LEHTO, S. *et al.* Dyslipidemia and hyperglycemia predict coronary heart disease events in middle-aged patients with NIDDM. **Diabetes**, v. 46, n. 8, p. 1354–1359. 1997.

LEON, J.; BORGES, C. R. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. **Journal of Visualized Experiments**, n. 159, 2020.

LI, X. *et al.* Acute and subacute toxicological evaluation of scutellarin in rodents. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 60, n. 1, p. 106–11. 2020.

LIAO. Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides against high-fat diet-induced renal injury and lipid deposition in rat kidneys. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, v. 33, n. 1, 2019.

LIMA, P. J. S. *et al.* **Lipid-lowering effect of riparin ii in a poloxamer 407induced dyslipidemia model in mice.** Editora Amplla. 2024. DOI: 10.51859/amplla.ecp4383-5.

LIMA, P.; DUARTE, S. Prevalência de obesidade em idosos e sua relação com hipertensão e diabetes. **InterScientia**, v. 1, n. 3, p. 80–92, 2013.

LINO, C. S. *et al.* Anti-diabetic activity of a fraction from *Cissus verticillata* and tyramine, its main bioactive constituent, in alloxan-induced diabetic rats. **Am J Pharmacol Toxicol**, v. 4, n. 2, p.78-88. 2007.

LOPES, I. S. *et al.* Riparin II ameliorates corticosterone-induced depressive-like behavior in mice: Role of antioxidant and neurotrophic mechanisms. **Neurochemistry International**, v. 120, p. 33–42, nov. 2018.

MABEKU, L. B. K. *et al.* Toxicological evaluation of ethyl acetate extract of *Cylicodiscus gabunensis* stem bark (Mimosaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 598606. 2007.

MACH, F. *et al.* European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Adverse effects of statin therapy: perception vs. the evidence — focus on glucose homeostasis, cognitive, renal and hepatic function, haemorrhagic stroke and cataract. **Eur Heart J**, v. 27, n. 39, p. 2526 – 2539. 2018.

MACH, F. *et al.* ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). **Eur Heart J**, v. 41, p. 111-188. 2020.

MAIA OLIVEIRA, I. C. *et al.* Neuroprotective and Antioxidant Effects of Riparin I in a Model of Depression Induced by Corticosterone in Female Mice. **Neuropsychobiology**, p. 111. 2021.

MALLMANN, A. S. V. *et al.* Is Riparin III a promising drug in the treatment for depression? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 162, p. 105824. 2021.

MANCINI, G. **A hipercolesterolemia e o envelhecimento como moduladores do estresse oxidativo em modelo de hipercolesterolemia familiar**. Dissertação—Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, fev. 2013.

MASUDA, D.; YAMASHITA, S. Postprandial hyperlipidemia and remnant lipoproteins. **J Atheroscler Thromb**, v. 2, n. 24, p. 95-109. 2017.

MORAIS, T. M. F. *et al.* Tyramine exerts hypolipidemic and anti-obesity effects in vivo. **Braz. J. Pharm. Sci.** v. 58. 2022. DOI: 10.1590/s2175-97902022e201191.

NAVAR, A. M. *et al.* Association of prior authorization and out - of - pocket costs with patient access to pcsk9 inhibitor therapy. **JAMA Cardiology**, v. 1, n. 2, 217–1225. 2017.

NELSO, D.; COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. São Paulo; Sarvier; 4. ed; 2006. 1202 p. Monography em Pt | LILACS | ID: lil-760648.

NISHIKAWA, K. *et al.* Neuromechanics: an integrative approach for understanding motor control. **Integr Comp Biol**, v. 47, n. 1, p. 16-54. 2007. DOI: 10.1093/icb/icm024

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development (2002), Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071001-en>.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

OHKAWA, R. *et al.* Cholesterol transport between red blood cells and lipoproteins contributes to cholesterol metabolism in blood. **J Lipid Res**, v. 61, n. 12. 2020. DOI: 10.1194/jlr.RA120000635.

OLIVEIRA, I. C. M. **Riparina-I na reversão dos efeitos centrais induzidos por corticosterona em camundongos: possível envolvimento do estresse oxidativo e da via nitrérgica**. 2012. 102 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

OLIVEIRA, L. B. *et al.* Prevalência de dislipidemias e fatores de risco associados. **J. Health Biol. Sci.**, v. 4, n. 5, p. 320-325. 2017.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Alerta que mundo atingiu níveis alarmantes de Obesidade infantil. 2016. Disponível em: <http://www.unmultimedia.org/radio/portuguese/2016/01/oms-45-alerta-que-mundo-atingiu-niveis-alarman-tes-de-Obesidade-infantil/#.WVVHvjUoGB1>. Acesso em: 08 nov. 2024.

PESSIONE, E.; CIRINCIONE, S. Bioactive molecules released in food by lactic acid bacteria: Encrypted peptides and biogenic amines. **Front Microbiol**, v. 7, p. 876. 2016.

PILITSI, E. *et al.* Pharmacotherapy of obesity: Available medications and drugs under investigation. **Metabolism**, v. 92, p. 170-92. 2019. DOI: 10.1016/j.metabol.2018.10.010.

PRÉCOMA, D. B. *et al.* Atualização da diretriz de prevenção cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**, v. 4, n. 114, p. 787-891. 2019. DOI:10.5935/abc.20190204.

RADAELLI, R. *et al.* Dose-response of 1, 3, and 5 sets of resistance exercise on strength, local muscular endurance, and hypertrophy. **J Strength Cond Res**, v. 29, n. 5, p. 1349-58. 2015. DOI: 10.1519/JSC.0000000000000758.

RODRIGUES, H. G. **Avaliação dos efeitos do óleo de coco (*Cocos nucifera* L.) extra virgem em protocolos de indução de obesidade por dieta hipercalórica e indução de dislipidemia por poloxamer P-407 em camundongos**. 2015. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

SACHETTI, C. G. *et al.* Acesso aberto Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, *Fabaceae*). **Rev. bras. Farmacogn**, v. 4, n. 19, 2009. DOI: 10.1590/S0102-695X2009000600025.

SALES, I.S.L. *et al.* Antidepressant-like effect of riparin I and riparin II against CUMS-

induced neuroinflammation via astrocytes and microglia modulation in mice.

BEHAVIOURAL PHARMACOLOGY, v. 1, p. 314, 2024.

SAMPAIO, T. L. **Efeito nefroprotetor do (-)- α -bisabolol na lesão renal aguda em modelos de isquemia-reperfusão**. Dissertação—Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2016.

SÁNCHEZ MACARRO, M. *et al.* Effect of a Combination of Citrus Flavones and Flavanones and Olive Polyphenols for the Reduction of Cardiovascular Disease Risk: An Exploratory Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study in Healthy Subjects. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1475, 2020.

SEO, Y.-J. *et al.* Spirulina maxima Extract Reduces Obesity through Suppression of Adipogenesis and Activation of Browning in 3T3-L1 Cells and High-Fat Diet-Induced Obese Mice. **Nutrients**, v. 10, n. 6, p. 712. 2018.

SIASOS, G. *et al.* The association between glaucoma, vascular function and inflammatory process. **Int J Cardiol**, v. 164, n. 1, p. 113-5. 2011. DOI:10.1016/j.ijcard.2010.09.083.

SILVA, F. R. C. **Efeito antioxidante e antiobesidade da silimarina (Silybum marianum L.) em modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica em camundongos C57BL/6**. 2024. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/77326>. Acesso em: 19 jul. 2024.

SILVA, K. C. M. **Estratégia de prevenção e controle da obesidade em crianças em fase escolar no âmbito da atenção primária: uma revisão integrativa**. Dissertação (Profissional em Saúde da Família) Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, 2022. Acesso em: 19 nov. 2024.

SILVA, R. M. J. *et al.* Herbal medicine use on dyslipidemia treatment: A review study. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. e22311326395, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i3.26395. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/26395>. Acesso em: 02 jan. 2025.

SILVA, S. M. C. S.; MURA, J. D. P. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2007.

SILVEIRA, A. L. **Toxicidade pré-clínica dos análogos das riparinas I, II e III utilizando modelos in vitro**. 2007. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

SILVERMAN, M. G. *et al.* Association between lowering LDL-C and cardiovascular risk reduction among different therapeutic interventions: a systematic review and metanalysis. **JAMA**, v. 316, p. 1289–1297. 2016.

SIQUEIRA, F. C. V. *et al.* Barreiras arquitetônicas a idosos e portadores de deficiência física:

um estudo epidemiológico da estrutura física das unidades básicas de saúde em sete estados do Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, p. 39-44, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. V Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 101, n. 4, 2013.

SOUSA, F. C. F. *et al.* Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, n. 1, p. 27–33, 2005.

SOUSA, F. C. F. *et al.* Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Phytother Res**, v. 12, n. 19, p. 1005 – 8. 2007. DOI: 10.1002/ptr.1771.

SOUZA, N. A. *et al.* Dislipidemia familiar e fatores associados a alterações no perfil lipídico em crianças. **Cien Saude Colet**, v. 1, n. 24, p. 323-332. 2019.

TEIXEIRA, C. P. L. *et al.* Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system: Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 129–137, abr. 2013.

TEXEIRA, M. E. *et al.* Fatores de Risco Cardiovascular em Cardiologistas Especialistas pela Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol**, 116, 774-81. 2021.

VAIDYA, H. *et al.* Antihyperlipidaemic activity of swertiamarin, a secoiridoid glycoside in poloxamer-407-induced hyperlipidaemic rats. **Journal of natural medicines**, v. 63, n. 4, p. 437–42. 2009.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “Era do teste DL 50. **Rev Eletron Farm**, v. 3, p. 93-98. 2006.

WANG, J. *et al.* Effects of Dietary Coconut Oil as a Medium-chain Fatty Acid Source on Performance, Carcass Composition and Serum Lipids in Male Broilers. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 28, n. 2, p. 223–30. 2015.

WASAN, K. M. *et al.* Poloxamer 407-mediated alterations in the activities of enzymes regulating lipid metabolism in rats. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences*, **Société canadienne des sciences pharmaceutiques**, v. 6, n. 2, p. 189–97. 2003.

WEST-EBERHARD, M. J. Nutrition, the visceral immune system, and the evolutionary origins of pathogenic obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 3, p. 723–731. 2019.

ZANWAR, A. A. *et al.* Isolation, characterization and antihyperlipidemic activity of secoisolariciresinol diglucoside in poloxamer-407-induced experimental hyperlipidemia. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 9, p. 1094–1103. 2014.

ZARZECKI, M. S. Hypolipidemic action of chrysin on Triton WR-1339-induced hyperlipidemia in female C57BL/6 mice. **Toxicol. Rep.**, v. 1, p. 200-208. 2014.

ANEXO A



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito antiobesidade e hipolipemiante de riparinas I, II, III e IV em camundongos C57BL/6", protocolada sob o CEUA nº 8443170523 (ID 002433), sob a responsabilidade de **Francisca Cléa Florenço de Sousa e equipe; Gabrielle Miranda Magalhães Pinto; Iardja Stéfane Lopes Sales; Felipe Ramon Cunha da Silva; Pedro Janelson dos Santos Lima; Ketsya Oliveira dos Santos Albuquerque; Amanda Barroso Rocha de Oliveira; Mateus Edson da Silva; Kalley Fernando de Alencar Carvalho; Letícia Rizza de Freitas Magalhães** - 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 do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 25/05/2023.

We certify that the proposal "Evaluation of the antiobesity and hypolipemic effect of riparins I, II, III and IV on C57BL/6 mice.", utilizing 812 Isogenics mice (586 males and 226 females), protocol number CEUA 8443170523 (ID 002433), under the responsibility of **Francisca Cléa Florenço de Sousa and team; Gabrielle Miranda Magalhães Pinto; Iardja Stéfane Lopes Sales; Felipe Ramon Cunha da Silva; Pedro Janelson dos Santos Lima; Ketsya Oliveira dos Santos Albuquerque; Amanda Barroso Rocha de Oliveira; Mateus Edson da Silva; Kalley Fernando de Alencar Carvalho; Letícia Rizza de Freitas Magalhães** - 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 Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 05/25/2023.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 06/2023 a 11/2025 Área: Departamento de Fisiologia E Farmacologia

Origem:	Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED)		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Machos	idade: 5 a 7 semanas
Linhagem:	C57BL/6		Quantidade: 586
			Peso: 18 a 22 g
Origem:	Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED)		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Fêmeas	idade: 5 a 7 semanas
Linhagem:	C57BL/6		Quantidade: 226
			Peso: 18 a 22 g

Fortaleza, 25 de maio de 2023

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará



ANNEX 2d: TEST PROCEDURE WITH A STARTING DOSE OF 2000 MG/KG BODY WEIGHT

