

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO
ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA: ATENÇÃO À
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

Carla Christimann

**Papel da Suplementação com Selênio
no Tratamento da Esteatose Hepática
Causada por Frutose no Peixe-zebra
(*Danio rerio*).**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2022

Carla Christimann

**Papel da Suplementação com Selênio
no Tratamento da Esteatose Hepática
Causada por Frutose no Peixe-zebra
(*Danio rerio*).**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação Pediatria: Atenção à Saúde da Criança e do Adolescente da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dra. Themis Reverbél da Silveira
Coorientadora: Profa. Marilene Porawski

**Porto Alegre
2022**

Catálogo na Publicação

Christimann, Carla

Papel da suplementação com selênio no tratamento da esteatose hepática causada por frutose no peixe-zebra (Danio rerio) / Carla Christimann. -- 2023.

56 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Pediatria, 2023.

Orientador(a): Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira ; coorientador(a): Profa. Dra. Marilene Porawski.

1. Zebrafish. 2. Frutose. 3. Esteatose hepática. 4. Selênio. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Agradeço primeiramente e com eterna gratidão à professora Themis Reverbel da Silveira por ter me aceito como sua orientanda e ter me proporcionado uma experiência incrível, desde o primeiro dia em que conversamos presencialmente. Agradeço por todo carinho, dedicação e ensinamentos, e por todos os momentos em que tive o privilégio de me beneficiar com todo seu conhecimento e entusiasmo.

Agradeço à Laura Neumann, ex-colega de trabalho, e que em uma de nossas conversas sobre mestrado, me apresentou os professores do PPG de pediatria citando suas linhas de pesquisa. Foi neste momento que me interessei pelo peixe-zebra.

Agradeço à prof. Silvana de Almeida (PPG Biociências) e sua doutoranda Andressa de Freitas Alves por permitirem minha participação no projeto com selênio.

Agradeço muito ao Thiago Alves (graduando de nutrição) e a Daniela Capelli Diglio (doutoranda do PPG Biociências) por toda paciência, parceria e ensinamento desde o primeiro momento em que entrei no grupo do peixe-zebra. Foi de extrema importância cada ensinamento sobre as rotinas do biotério e o cuidado necessário com os peixes, para o desenvolvimento do trabalho. Agradeço muito também a disponibilidade em me auxiliar nos dias de coleta de tecidos dos animais, dias de muita animação, e ao término de muito cansaço, mas que foram determinantes para o sucesso deste trabalho.

Agradeço muito à Ana Cláudia Reis Schneider, Pós-doutoranda do PPG de Pediatria, por seu auxílio repassando todo o seu conhecimento nas atividades realizadas com os peixes-zebra, assim como análises e contatos importantes para concretização deste trabalho. Agradeço também, sua participação no grupo, sempre contribuindo de forma admirável.

A todos os membros do Grupo de Pesquisa em peixe-zebra, e a Prof. Marilene Porawski agradeço o apoio científico e o aprimoramento das discussões de trabalho.

Agradeço ao aluno de pós-doc Fabiano Barbosa Carvalho que auxiliou com a realização das lâminas para histologia, assim como a patologista Adriana Vial Roehle com a análise deste material para a obtenção dos resultados relacionados a histologia.

Agradeço à aluna de doutorado Karolina Flash (PPG Pediatria) e em especial ao aluno de iniciação científica Eronides Anathan de Heberle Salau (PPG Biociências) por todo o auxílio para realização das análises de expressão gênica.

A UFCSPA agradeço pela estrutura oferecida pelo biotério e pela cordialidade e competência de seus funcionários.

Por fim, agradeço à minha mãe Jocasta que sempre me incentivou a buscar pelos meus objetivos. Agradeço por toda sua força e ensinamentos, e por todos os momentos difíceis e de muito cansaço em que sempre me escutou, e me deu forças para continuar. Agradeço ao meu esposo Alessandro pelo seu companheirismo e paciência, principalmente nos momentos em que pouco podia me dedicar à família para poder me dedicar a pesquisa. E a meus filhos amados Claudio e Rafaela pela compreensão dos momentos em que estive pouco presente ou muito dedicada aos estudos.

Enfim, deixo meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste projeto.

RESUMO

Introdução: A frutose é um açúcar simples, de ocorrência natural, metabolizada principalmente pelo fígado e possui potencial lipogênico. Tem sido amplamente utilizada na indústria alimentícia ligado à glicose para formar sacarose, contida em alimentos altamente processados e bebidas hipercalóricas. O selênio é um micronutriente essencial com potencial antioxidante e anti-inflamatório importante na nutrição humana e essencial em muitas funções biológicas. De grande importância, determina a expressão de selenoproteínas e desempenha um papel fundamental na regulação do nível de espécies reativas de oxigênio (ERO) podendo reduzir o estresse oxidativo e prevenir a lesão hepática. **Objetivo:** Avaliar o potencial protetor e/ou redutor do selênio na esteatose hepática de peixes-zebra expostos à frutose. **Materiais e Métodos:** Estudo experimental conduzido em peixe-zebra (*Danio rerio*), de ambos os sexos, em quatro grupos: controle (C) – sem suplementação de selênio e sem indução de esteatose; frutose (F) – sem suplementação de selênio e com indução de esteatose; selênio (SE2) - com suplementação de selênio e sem indução de esteatose e frutose-selênio (F-SE2) - com suplementação de selênio e com indução de esteatose. A esteatose foi induzida por exposição à frutose 2% realizada por 45 dias consecutivos após 15 dias do início da dieta suplementada ou não com selênio 2µg/g, totalizando 60 dias de experimento. No dia 61, animais foram eutanasiados, pesados e medidos individualmente e após foi realizada a coleta dos tecidos. Análise histológica: 5 fígados para cada tipo de análise (Hematoxilina & Eosina e *Oil Red*), de cada grupo. Expressão gênica: 6 amostras (*pool* de 5 fígados por amostra). **Resultados:** Expressos em média e desvio padrão para variáveis quantitativas simétricas e mediana e intervalo interquartilico (IQR) das variáveis quantitativas assimétricas. Não houve diferença significativa no peso (C: 0,068±0,109; F: 0,078±0,097; SE: 0,132±0,116; F-SE: 0,087±0,116). Houve diferença significativa no IMC (C: 0,0428±0,01027; F: 0,0474±0,00843; SE:0,0548±0,00960; F-SE: 0,0469±0,00850 p<0,001). Foi observado acúmulo de lipídeos nos hepatócitos do grupo frutose (p=0,018) quando comparados ao controle, sem melhora significativa quando suplementado com selênio. Não foram observadas diferenças significativas para expressão gênica de SEPP1 e GPx1 (p=0,311 e p=0,064 respectivamente). **Conclusões:** A suplementação de selênio 2µg/g por período de 45 dias, não foi efetiva para proteção da esteatose causada por frutose em peixe-zebra.

ABSTRACT

Introduction: Fructose is a naturally occurring simple sugar, metabolized mainly by the liver and has lipogenic potential. It has been widely used in the food industry linked to glucose to form sucrose, contained in highly processed foods and high-calorie drinks. Selenium is an essential micronutrient with important antioxidant and anti-inflammatory potential in human nutrition and essential in many biological functions. Of great importance, it determines the expression of selenoproteins and plays a key role in regulating the level of reactive oxygen species (ROS), which can reduce oxidative stress and prevent liver damage. **Objective:** To evaluate the protective and/or reducing potential of selenium against hepatic steatosis in zebrafish exposed to fructose. **Material and Methods:** Experimental study conducted in zebrafish (*Danio rerio*), of both sexes, in four groups: control (C) – without selenium supplementation and without steatosis induction; fructose (F) – without selenium supplementation and with steatosis induction; selenium (SE2) - with selenium supplementation and without steatosis induction and fructose-selenium (F-SE2) - with selenium supplementation and with steatosis induction. Steatosis was induced by exposure to 2% fructose for 45 consecutive days, 15 days after starting the diet supplemented or not with selenium 2µg/g, totaling 60 days of experiment. On day 61, animals were euthanized, weighed and measured individually and after that tissue collection was performed. Histological analysis: 5 livers for each type of analysis (Hematoxylin & Eosin and *Oil Red*), from each group. Gene expression: 6 samples (pool of 5 livers per sample). **Results:** Expressed as mean and standard deviation for symmetric quantitative variables and median and interquartile range (IQR) for asymmetric quantitative variables. There was no significant difference in weight (C: 0.068±0.109; F: 0.078±0.097; SE: 0.132±0.116; F-SE: 0.087±0.116). There was a significant difference in BMI (C: 0.0428±0.01027; F: 0.0474±0.00843; SE:0.0548±0.00960; F-SE: 0.0469±0.00850 p<0.001). Accumulation of lipids was observed in hepatocytes in the fructose group (p=0.018), without significant improvement when supplemented with selenium. No significant differences were observed for SEPP1 and GPx1 gene expression (p=0.311 and p=0.064 respectively). **Conclusion:** Selenium supplementation 2µg/g for a period of 45 days was not effective in protecting steatosis caused by fructose in zebrafish.

Keyword: Zebrafish; Fructose; Hepatic steatosis; Selenium.

Lista de Figuras

Figura 1: Hipótese de “Multiple hit” para o desenvolvimento da DHGNA.	13
Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de dano hepático induzido por dietas.	16
Figura 3: Anatomia comparativa de fígados humanos e de peixe-zebra.	20
Figura 4: Aquários de experimento.	24
Figura 5: Avaliação antropométrica dos animais.	27
Figura 6: Remoção da pele e dos músculos da parede corporal para expor os órgãos internos.	29
Figura 7: Média de Ganho de peso por peixe – comparação de ganho de peso por peixe entre os grupos controle, frutose, selênio 2µg e frutose + selênio 2µg.	33
Figura 8: IMC no dia da coleta - Média por peixe – comparação da média do IMC por peixe aos 61 dias entre os grupos controle, frutose, selênio 2µg e frutose + selênio 2µg.	34
Figura 9: Fotomicrografia de fígado de peixe-zebra com a coloração de HE.	35
Figura 10: Fotomicrografia de fígado de peixe-zebra com a coloração de Oil Red.	36
Figura 11: Expressão gênica da SEPP1 no fígado.	38
Figura 12: Expressão gênica da GPx1 no fígado.	38

Lista de Tabelas

Tabela 1: Número amostral de animais para as análises.	25
Tabela 2: Composição das rações padrão / suplementada com selênio 2µg/g.	26
Tabela 3: Grupos experimentais.	28
Tabela 4: Sequencias primárias específicas de genes para PCR em tempo real.	32
Tabela 5: Média de ganho de peso de peixe por grupo.	33
Tabela 6: Média de IMC dos grupos ao final do experimento.	34
Tabela 7: Resultado da análise com Oil Red: comparação entre os grupos.	36
Tabela 8: Análise da expressão gênica da SEPP1 e GPx1 no fígado.	37

Lista de Abreviaturas

AG: Ácidos graxos

cDNA: DNA complementar

DHA: Ácido docosa-hexaenoico

DHGNA: Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica

DM: Diabete mellitus

DPF: dias pós fertilização

EHNA: Esteato-hepatite não alcoólica

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

GPx: Glutathione Peroxidase

GPx1: Glutathione Peroxidase 1

GPx4: Glutathione Peroxidase 4

H₂O: Água

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

H&E: Hematoxilina e Eosina

IMC: Índice de Massa Corporal

IQR: Intervalo interquartil

O₂: Radical superóxido

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PUFAs: Polyunsaturated fatty acids - Ácido graxo poliinsaturado

RCF: força centrífuga relativa

RE: Retículo endoplasmático

RNA: Ácido Ribonucleico

Se: Selênio

SEMET: Selenometionina

SEP15: Selenoproteína de 15DaK

SEPP1/SelP: Selenoproteína P

SOD: Superóxido dismutase

VLDL: Very low density lipoproteins - Lipoproteína de muito baixa densidade

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1.	DOENÇA HEPÁTICA.....	11
2.2.	FATORES ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA DHGNA.....	15
2.3.	SELÊNIO E SELENOPROTÉINAS	17
2.4.	PEIXE-ZEBRA COMO MODELO DE DOENÇA HEPÁTICA	18
3.	JUSTIFICATIVA	21
4.	HIPÓTESE.....	22
5.	OBJETIVO.....	23
5.1.	OBJETIVO GERAL	23
5.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
6.	MATERIAIS E MÉTODOS	24
6.1.	DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	24
6.2.	LOCAL	24
6.3.	AMOSTRA	24
6.4.	DESENHO EXPERIMENTAL.....	25
6.4.1.	ALIMENTAÇÃO DOS PEIXES	25
6.4.2.	PESO E COMPRIMENTO.....	26
6.4.3.	INDUÇÃO À ESTEATOSE: PROTOCOLO DE FRUTOSE	27
6.4.4.	GRUPOS EXPERIMENTAIS	27
6.4.5.	EUTANASIA E COLETA DE MATERIAIS	28
6.4.6.	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	29
6.4.7.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	30
6.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
6.6.	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	32
7.	RESULTADOS	33
8.	DISCUSSÃO	39
9.	CONCLUSÕES.....	47
10.	REFERÊNCIAS.....	48
11.	ANEXOS	52
11.1.	APROVAÇÃO CEUA	52

1. INTRODUÇÃO

Atualmente observamos uma epidemia mundial de obesidade, diabetes tipo 2 e síndrome metabólica. A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma manifestação hepática da síndrome metabólica, sendo uma condição em que ocorre a deposição aumentada de gordura nos hepatócitos, e pode compreender desde esteatose simples até inflamação, fibrose, cirrose e hepatocarcinoma. Acomete cerca de 25% da população mundial, e recentemente está aumentando entre crianças tendo se tornado a doença hepática crônica mais comum na infância e adolescência, assim como entre adultos.

Na infância, o aumento da obesidade tem impulsionado o desenvolvimento de condições metabólicas que promovem a DHGNA. O balanço energético positivo, impulsionado pelo aumento da ingestão calórica e pela diminuição da atividade física, são pré-requisitos para o desenvolvimento da obesidade e da DHGNA, juntamente com fatores genéticos e componentes do microbioma intestinal.

Inicialmente acreditava-se que o responsável pela epidemia de obesidade fosse o aumento do consumo de dietas ricas em gorduras observado no último século. A pouco se observou o aumento da obesidade juntamente com a liberação do uso da frutose industrializada. Nas últimas décadas constatou-se um aumento marcante na ingestão de açúcar, impulsionado pela ingestão de bebidas industriais açucaradas e de alimentos altamente processados. A frutose, contida na sacarose, é metabolizada principalmente no fígado e possui elevado potencial lipogênico. A inadequação alimentar com a consequente geração de alterações bioquímicas tais como espécies reativas de oxigênio (ERO) é fator crucial de risco para esteatose hepática.

A partir disso, o presente estudo teve como objetivo principal investigar a influência do selênio que, por apresentar reconhecido poder antioxidante em seres humanos, poderia proteger e/ou reduzir a esteatose hepática em peixe-zebra.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. DOENÇA HEPÁTICA

O fígado é um órgão essencialmente metabólico com capacidade para orquestrar um complexo conjunto de processos bioquímicos. Como resultado da melhoria das condições sanitárias, socioeconômicas e de comportamento social houve, nos últimos anos, uma mudança significativa no padrão das doenças hepáticas nos países em desenvolvimento. Houve redução na frequência de doenças infecciosas e aumento significativo no diagnóstico de doenças genéticas e metabólicas. O crescimento dramático da obesidade associado à progressão das taxas de hospitalização e de mortalidade por hepatopatia no Brasil demonstram a relevância do problema a ser enfrentado (NADER; DE MATTOS; BASTOS, 2014).

A doença crônica do fígado mais comum no ocidente, atualmente, é a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) reconhecida como um problema importante de saúde. Estima-se que ocorre, em termos globais, em 25% da população. (YOUNOSSI et al., 2016). No Brasil foi observada em aproximadamente 30% dos indivíduos adultos em atendimento ambulatorial (COTRIM et al., 2016). A prevalência de DHGNA está aumentando entre crianças e se tornou a doença hepática crônica mais comum na infância e adolescência, assim como entre adultos. A DHGNA afeta 25% aproximadamente da população global, mas a prevalência varia consideravelmente por região. É maior no Oriente Médio (32%) e América do Sul (30%) e menor na África (13%). Na América do Norte e Europa, a prevalência é de 24% e é de 27% na Ásia. A pandemia de sobrepeso e obesidade impulsiona o desenvolvimento de condições metabólicas que promovem a DHGNA. Os encargos econômicos e de saúde aumentam continuamente, também alimentados pelo *boom* da obesidade infantil e pelo envelhecimento da população (RIVES et al., 2020).

O acúmulo de gordura nos hepatócitos é um achado histológico comum, determinado tanto por causas benignas quanto pelas mais complexas condições genético-metabólicas. O denominador comum é a deposição aumentada de lipídios no citoplasma dos hepatócitos, sobretudo de triglicerídeos. Uma das entidades mais comuns que se caracteriza pela presença de esteatose hepática é a DHGNA, que não afeta apenas o fígado, mas envolve, em graus variáveis, outros órgãos tais como rins e sistema cardiovascular (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016).

O diagnóstico de DHGNA, do ponto de vista histológico, baseia-se na presença de esteatose em mais de 5% nos hepatócitos. É considerada uma condição benigna e geralmente assintomática. No entanto pode evoluir para formas mais severas quando, além da esteatose, apresentar dano hepatocelular, infiltração inflamatória do parênquima (VANNI et al., 2010; CHALASANI et al., 2012; MCPHERSON et al., 2015) passando a ser definida, como esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). A progressão da DHGNA pode conduzir ao desenvolvimento de cirrose e até de carcinoma hepatocelular (RIVES et al., 2020).

Em torno de 20% dos pacientes com DHGNA apresentam progressão para EHNA e desses, aproximadamente 40% evoluem com fibrose. 4% dos pacientes com fígado gorduroso não alcoólico e 20% dos pacientes com EHNA desenvolvem cirrose. Com o tempo, até 5% dos pacientes com EHNA experimentarão regressão espontânea. A EHNA está fortemente associada ao grau de fibrose hepática, que é preditiva da mortalidade geral em pacientes com DHGNA (RIVES et al., 2020). Atualmente EHNA é considerada uma das principais causas de cirrose e de transplante hepático no Ocidente.

Muito recentemente essa entidade patológica recebeu uma nova denominação: MAFLD – Metabolic associated fatty liver disease, mas que ainda não está plenamente aceita (MOHAMMED ESLAM et al., 2020). Na definição clássica de DHGNA está implícita a inexistência de consumo abusivo de álcool, mas na recente proposta de MAFLD o álcool pode coexistir. O diagnóstico MAFLD não é mais “de exclusão” e sim da presença de alteração metabólica associada à esteatose.

A DHGNA pode ser considerada como a manifestação hepática da Síndrome Metabólica e os principais fatores de risco incluem obesidade, dislipidemia e diabetes mellitus (DM) (RIVES et al., 2020). Nos pacientes com DM cerca de 70% apresentam DHGNA (ARAB et al., 2017). Embora a resistência à insulina, dislipidemia e a obesidade sejam os mais conhecidos fatores de risco para DHGNA, a condição também ocorre em pacientes sem aumento de peso. Pacientes com baixo índice de massa corporal ($<25 \text{ kg} / \text{m}^2$), também podem desenvolver esta patologia, uma condição conhecida como DHGNA magra (RIVES et al., 2020). Em estudo recente foi comparada a variabilidade transcontinental das características de pacientes obesos e magros com DHGNA. Os autores demonstraram que o fenótipo dos indivíduos magros com DHGNA é variável nos países analisados; no Brasil, mas não na França, os acidentes são geralmente insulino-resistentes (OLIVEIRA et al., 2020).

Uma análise de pacientes obesos com DHGNA constatou que, enquanto 60% dos triglicerídeos hepáticos são derivados de ácido graxo livre do plasma, 26% da gordura hepática nesses indivíduos é proveniente da lipogênese de novo e outros 15% de gordura na dieta (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016).

A infiltração gordurosa do fígado ocorreria em consequência da resistência periférica à insulina e do hiperinsulinismo resultante. Haveria maior liberação de ácidos graxos do tecido adiposo para o fígado, diminuição da beta-oxidação dos ácidos graxos além de defeito na secreção hepática da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). O surgimento da lipoperoxidação e ativação de enzimas microsossomais (citocromo P450), resultaria em estresse oxidativo e liberação de citocinas com a consequente alteração da membrana celular, inflamação e potencial ativação de fibrogênese. Dentre os produtos que propiciam glicogênese e/ou lipogênese um dos mais significativos, pela frequência do seu uso, é a frutose (FEDERICO et al., 2021).

A frutose é um açúcar simples, de ocorrência natural, amplamente utilizado na indústria alimentícia ligado à glicose formando sacarose, contida em alimentos e bebidas hipercalóricas (FEDERICO et al., 2021). É metabolizada principalmente pelo fígado em humanos e aumenta as taxas de lipogênese hepática de novo por meio de vários mecanismos: alterando a regulação transcricional e alostérica, interferindo na detecção de energia celular e interrompendo o equilíbrio entre a síntese lipídica e a oxidação lipídica (HENGIST; KOUMANOV; GONZALEZ, 2019).

Nas últimas décadas, houve um aumento marcante na ingestão desse açúcar, sendo impulsionado pela ingestão de bebidas industriais açucaradas (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016; TER HORST; SERLIE, 2017). Antes de 1900, os americanos consumiam aproximadamente 15g de frutose por dia (4% do total de calorias) principalmente através do consumo de frutas e legumes. Na década de 1940, a ingestão de frutose aumentou para 24g por dia (5% das calorias totais); em 1977, o consumo passou para 37g por dia (7% das calorias totais); e até 1994, 55g por dia (10% do total de calorias). Atualmente os adolescentes consomem 15% do total de calorias e 10% da população consome 25% ou mais de suas calorias totais de açúcar refinado (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016). Estudos clínicos recentes e bem embasados mostram que a redução da ingestão de frutose tem efeito positivo na prevenção de DHGNA e de outras condições relacionadas à obesidade (TER HORST; SERLIE, 2017).

Apesar da grande frequência de DHGNA e do progressivo conhecimento das situações que estão associadas à EHNA o tratamento dessa condição não é plenamente satisfatório. Mudanças no estilo de vida, incluindo alterações na dieta e na valorização dos exercícios físicos, acompanhados do controle de comorbidades não são suficientemente eficazes (NASSIR et al., 2015; ARAB et al., 2017).

2.2. FATORES ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA DHGNA

Diversos fatores estão envolvidos na patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), incluindo fatores metabólicos, microbiota do aparelho digestório e fatores ambientais (RIVES et al., 2020).

Sabe-se que nas sociedades ocidentais, atualmente, dietas não saudáveis, falta de exercícios, tabagismo e consumo de álcool são fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento de doenças crônicas. Em particular, o consumo excessivo de frutose e ácidos graxos saturados, combinado com estilos de vida sedentários, contribuíram para o aumento global da obesidade, da DHGNA e EHNA (RIVES et al., 2020). A sobrecarga lipídica induz à lipotoxicidade que afeta diferentes geradores de espécies reativas de oxigênio (ERO), como peroxissomos (RIVES et al., 2020), mitocôndrias e retículo endoplasmático (RE) dos hepatócitos (CICHOZ-LACH; MICHALAK, 2014). A geração de ERO desencadeia por meio de danos oxidativos as proteínas a geração de proteínas carboxiladas, mudanças na sensibilidade à insulina, na atividade de enzimas-chave do metabolismo lipídico, na sinalização do sistema imunológico inato, nas respostas inflamatórias e na apoptose hepática. Altos níveis de ERO aumentam o estresse oxidativo, contribuindo para o desenvolvimento e progressão da DHGNA (RIVES et al., 2020).

Sob condições fisiológicas saudáveis, as células são equipadas com estratégias moleculares especiais que controlam o nível de estresse oxidativo e mantêm um equilíbrio entre partículas oxidantes e antioxidantes (CICHOZ-LACH; MICHALAK, 2014), necessárias para vários processos, como metabolismo celular, diferenciação e sobrevivência celular, defesa imunológica e modulação da atividade do fator de transcrição e estado epigenético (RIVES et al., 2020). Uma quantidade elevada de ERO é altamente tóxica para as células (CICHOZ-LACH; MICHALAK, 2014).

O estresse oxidativo é considerado um dos fatores causadores de dano hepático (REZZANI; FRANCO, 2021). Um excesso de agentes oxidativos está

envolvido na peroxidação lipídica, o que aumenta a permeabilidade mitocondrial e altera sua função (CICHOZ-LACH; MICHALAK, 2014).

Membranas celulares e de organelas, devido ao alto teor de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), são especialmente suscetíveis a danos por ERO. A peroxidação lipídica é um processo no qual espécies reativas de oxigênio, principalmente radicais livres, removem elétrons dos lipídios e subsequentemente produzem intermediários reativos que podem sofrer reações adicionais. A peroxidação lipídica danifica diretamente os fosfolipídios e indiretamente proteínas e ácidos nucleicos. Os fosfolipídios oxidados também podem desempenhar um papel importante em muitas doenças inflamatórias e frequentemente mediar alterações pró-inflamatórias (SU et al., 2019).

Sob estresse oxidativo, a enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que é então processado em oxigênio (O_2) e água (H_2O) por meio glutathione peroxidase (GPx) ou da enzima catalase. No interior das células, as ERO são produzidas nas mitocôndrias, nos peroxissomos e no RE e citoplasma (figura 2). Altos níveis de ERO alteram as organelas, aumentando o estresse oxidativo e criando um círculo vicioso (RIVES et al., 2020).

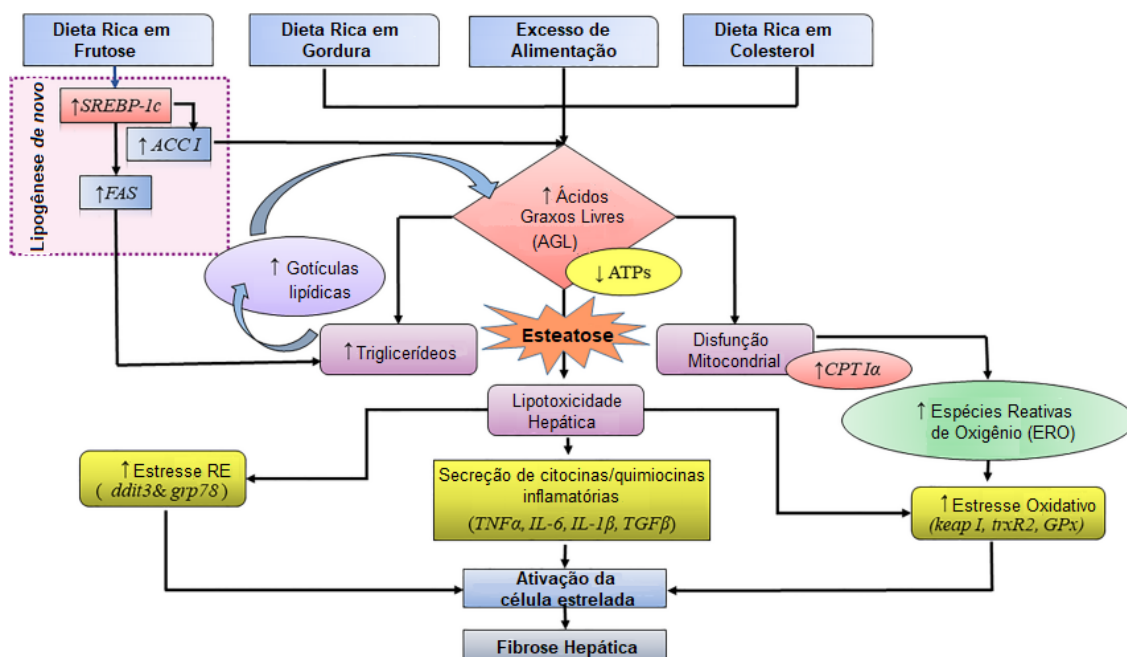


Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de dano hepático induzido por dietas.

Fonte : Adaptado de KATOCH; PATIAL, 2021.

SREBP-1c, inibidor da proteína 1C ligadora do elemento regulatório de esteroide; ACC, acetil-CoA carboxilase; ATP, trifosfato de adenosina; CPT1 α , carnitina palmitoiltransferase 1A; ddit3, transcrito 3 induzível por danos no DNA; FAS, ácido graxo sintase; GPx1, glutathione peroxidase 1; grp78, proteína regulada por glicose 78; IL-1 β , interleucina 1 β ; IL-6, interleucina 6; keap1, proteína Kelch associada a ECH 1; trxR2, tioredoxina redutase 2; TNF-alfa, fator de necrose tumoral-alfa; TGF- β , fator de transformação do crescimento beta

2.3. SELÊNIO E SELENOPROTEÍNAS

Selênio é um micronutriente essencial com potencial antioxidante e anti-inflamatório (MAIYO; SINGH, 2017) importante na nutrição humana e essencial em muitas funções biológicas (REJA et al., 2020), metabólicas e fisiológicas em todas as espécies de vertebrados (POLYZOS et al., 2020), incluindo os peixes (PETTEM; WEBER; JANZ, 2017).

É encontrado em duas formas diferentes, ou seja, orgânico e inorgânico. As formas orgânicas de selênio estão presentes como selenocisteína e selenometionina no corpo humano. Formas inorgânicas como selenito e selenato se acumulam nas plantas através do solo (HARIHARAN; DHARMARAJ, 2020).

O selênio inorgânico é principalmente acumulado nas plantas pela via de assimilação do enxofre, enquanto os animais e os humanos consomem essas fontes mais tarde como vegetais, carnes e suplementos dietéticos (HARIHARAN; DHARMARAJ, 2020). Os frutos do mar e as carnes são os primeiros a serem incluídos nos alimentos ricos em selênio. Os outros, incluem grãos, nozes (REJA et al., 2020), laticínios, cereais, ovos (ROMAN; JITARU; BARBANTE, 2014), cogumelos, castanha-do-pará e brócolis (HARIHARAN; DHARMARAJ, 2020).

De grande importância, o selênio determina a expressão de selenoproteínas e desempenha um papel fundamental na regulação do nível de ERO (SHANG et al., 2018), sendo considerado uma boa estratégia terapêutica para o tratamento de distúrbios hepáticos (CICHOZ-LACH; MICHALAK, 2014). Shang et al. (2018), referem que as selenoproteínas podem reduzir o estresse oxidativo e prevenir lesão hepática.

Em 1973 o mecanismo biológico para as capacidades antioxidantes do Selênio (Se) foi elucidado por Rotruck e colegas que demonstraram a incorporação de Se na enzima glutathione peroxidase (agora referida como glutathione peroxidase 1, GPx1). Nos anos seguintes, mais proteínas contendo Se foram identificadas: a selenoproteína P (SELENOP, anteriormente conhecida como SEPP1), seguida pela

identificação de fosfolípido hidroperóxido glutathiona peroxidase (agora referida como GPx4) (SHORT; PILAT; WILLIAMS, 2018).

Segundo Misra et al. (2012), o selênio apresenta efeito antioxidante no fígado, aumentando a atividade do GPx, enzima que em situação de esgotamento contribui para a patogênese da inflamação hepática e fibrose (POLYZOS et al., 2020). Conforme já referido, tem diversos papéis promissores no corpo humano, como antioxidante, anti-inflamatório, anti-mutagênico, anti-carcinogênico, antiviral, antibacteriano e efeitos antifúngicos (MAIYO; SINGH, 2017).

A principal fonte dietética de selênio é a selenometionina (SeMet) (POLYZOS et al., 2020). Nos hepatócitos é metabolizada em seleneto através de transulfuração para a síntese de selenoproteína (selenoproteína P - SEPP1/SeIP), e enzimas, incluindo glutathiona peroxidase (GPx) (HARIHARAN; DHARMARAJ, 2020). Pettem et al. (2017), reforçam a importância inclusive para os peixes (PETTEM; WEBER; JANZ, 2017).

Para os peixes, em condições fisiológicas normais, são requeridos concentrações dietéticas de 0,1 a 0,5 $\mu\text{g Se / g}$ de massa seca (dm) para manter a função normal da selenoproteína. Concentrações superiores a 3 $\mu\text{g / g dm}$ podem se bioacumular rapidamente causando toxicidade para os peixes (MISRA et al., 2012; PETTEM; WEBER; JANZ, 2017).

2.4. PEIXE-ZEBRA COMO MODELO DE DOENÇA HEPÁTICA

O peixe-zebra, conhecido também como paulistinha ou peixe zebra, é um pequeno teleosteo da espécie *Danio rerio*. É tropical de água doce e se desenvolve passando pelos estágios larval, juvenil e adultos. Em biotério, os peixes adultos (com mais de 90 dias) inicialmente tem um tamanho médio de 2 a 3 cm quando criados em condições ideais, mas continuam a crescer ao longo da sua vida, de 2 a 3 anos, podendo alcançar tamanhos de até 4 a 5 cm (NATH et al., 2012).

Descoberto no rio Ganges no final do século 19, peixes-zebra foram inicialmente usados por embriologistas devido à sua capacidade de produzir grandes quantidades de embriões transparentes. Após o primeiro relatório sobre o desenvolvimento do peixe-zebra publicado na década de 1930, pesquisadores usaram o peixe-zebra para estudar os efeitos das toxinas e álcool na embriogênese e hepatocarcinogênese. A exposição dos animais a toxinas e produtos químicos, simplesmente adicionando compostos à cultura na água facilita a sua utilização

(NATH et al., 2012). Estudos com o peixe-zebra ganharam importância em 1981, quando o professor da universidade de Oregon, George Streisinger, biólogo, percebeu vantagens na utilização do peixe em estudos genéticos, e publicou artigo na revista *Nature* (HÖRSTGEN-SCHWARK, 1981). A partir de então, estudos envolvendo o peixe-zebra cresceram de maneira extraordinária (NATH et al., 2012).

O peixe-zebra tem atraído a atenção da comunidade científica por ser de pequeno porte, fácil manutenção, econômico para criação, com alta taxa de reprodutibilidade e importante homologia com mamíferos (HAMMES et al., 2012). Algumas das características importantes do peixe zebra são: embriões transparentes, prole numerosa (200 – 300 ovos cada 2 a 3 dias) e desenvolvimento rápido (GOESSLING; SADLER, 2015) pois em 48 a 72 horas evolui do estado de ovo para larva e tornando-se adulto aos 3 meses de vida (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012; HANYANG et al., 2017). Os órgãos do aparelho digestivo estão desenvolvidos nas larvas aos 5 dias pós fertilização.

Comparados com humanos, os peixe-zebra tem alta semelhança com o sistema digestório em relação às funções absorptivas e secretórias. Não possui estômago, indicando que a acidificação não seja necessária para digestão e acredita-se que a funcionalidade do bulbo intestinal substitua esse órgão (DAMMSKI et al., 2011). Apresenta 70% de homologia com genes humanos (GOESSLING; SADLER, 2015; HANYANG et al., 2017).

À medida que a incidência de doenças hepatobiliares aumenta, precisamos melhorar nossa compreensão dos fatores moleculares, celulares e fisiológicos que contribuem para a patogênese da doença hepática, e o desenvolvimento rápido e externo de embriões de peixe-zebra fornece uma vantagem para estudos de crescimento e diferenciação de órgãos. O fígado e outros órgãos internos podem ser visualizados em larvas de peixe-zebra usando um microscópio simples (GOESSLING; SADLER, 2015).

O fígado de peixe-zebra (figura 3) é organizado em 3 lobos contíguos (2 laterais e 1 ventral) e esses lobos não possuem o pedículo, como no fígado dos mamíferos. Os hepatócitos do fígado do peixe-zebra estão dispostos em túbulos, com os ductos biliares percorrendo entre 2 fileiras hepatócitos (GOESSLING; SADLER, 2015).

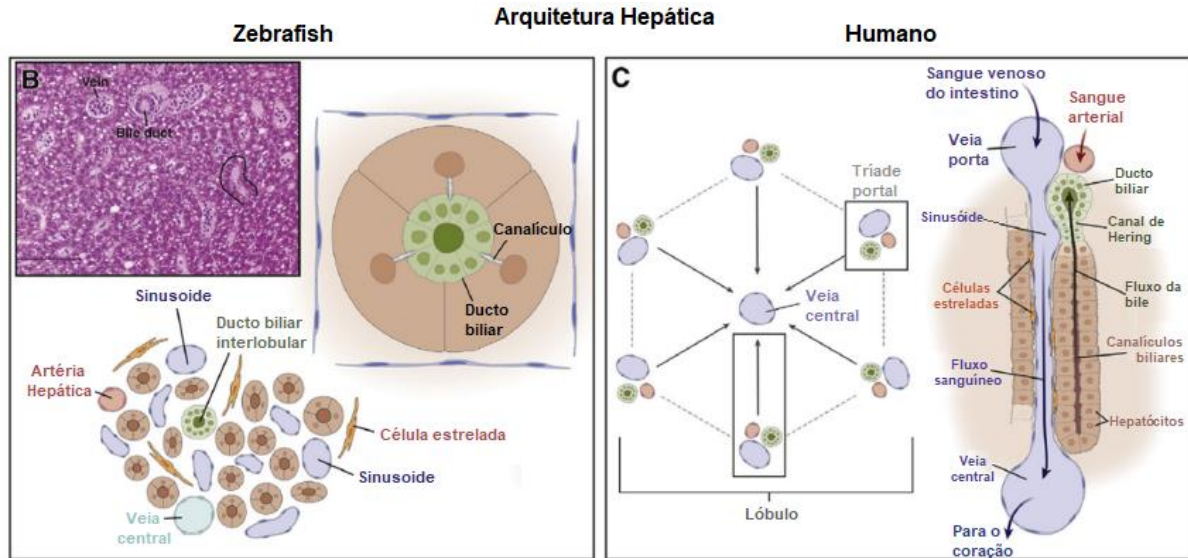


Figura 3: Anatomia comparativa de fígados humanos e de peixe-zebra.

Fonte: Adaptado de GOESSLING; SADLER, 2015

Com exceção das células de Kupffer, os outros tipos de células do fígado de mamífero estão presentes no peixe-zebra (WANG et al., 2017). As células hepáticas parecem desenvolver funções semelhantes a dos hepatócitos dos humanos, incluindo secreção biliar, glicogênio e armazenamento lipídico, resistência à insulina, metabolismo de xenobióticos e amônia e secreção de proteínas séricas, como fatores de coagulação e complemento, transferrina e proteína semelhante à albumina. Como 69% de todos os genes do peixe-zebra têm um ortólogo humano, mutações relacionados ao fígado em peixe-zebra podem ser investigadas por sua relevância a desordens humanas (GOESSLING; SADLER, 2015).

3. JUSTIFICATIVA

O aumento do consumo de açúcar observado no último século tem despertado grandes preocupações com relação ao efeito que pode desencadear no organismo, dentre os quais podemos citar a DHGNA.

Este aumento se deve principalmente pelo crescente consumo dos alimentos processados e altamente processados.

A frutose, monossacarídeo presente na sacarose, é principalmente metabolizada pelo fígado e possui potencial lipogênico e conseqüentemente risco para desenvolvimento da esteatose hepática.

Atualmente, não dispomos de tratamentos satisfatórios para a DHGNA, por isso a busca por alternativas terapêuticas é necessária.

O selênio é um micronutriente essencial para o organismo, que apresenta poder antioxidante, podendo apresentar benefícios na redução da geração de ERO.

Até o presente momento, não foram identificados estudos avaliando de forma isolada o poder da suplementação do selênio na proteção e/ou redução da esteatose hepática em peixe-zebra. Desta forma, poderia apresentar valor a utilização da suplementação de selênio como uma opção terapêutica para a DHGNA.

4. HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que devido aos efeitos antioxidantes, o selênio pode vir a contribuir para a proteção e/ou redução da esteatose hepática induzida pela frutose, através da manutenção da homeostase redox.

5. OBJETIVO

5.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação com selênio no tratamento da esteatose hepática em peixe-zebra expostos à frutose.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reproduzir o modelo animal de esteatose hepática não alcoólica em peixes-zebra expostos à frutose.
- Avaliar ganho de peso durante experimento e IMC ao término do estudo.
- Avaliar do ponto de vista histológico a esteatose hepática em peixe-zebra no término do experimento.
- Analisar o efeito da suplementação com selênio no tratamento da esteatose por meio de análise histológica hepática.
- Determinar expressão gênica de SEPP1, GPx1, GPx4 e Seleno 15 nos quatro grupos experimentais.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. DELINEAMENTO DA PESQUISA

Estudo aninhado no Projeto: “Estudo do papel do selênio e das selenoproteínas em peixe-zebra (*Danio rerio*)”, aprovado pelo CEUA Parecer 661/19.

Estudo experimental prospectivo em peixes-zebra submetidos a intervenção com frutose por 45 dias após 15 dias recebendo somente ração específica por grupo, para análise do efeito da suplementação de selênio no tratamento da esteatose hepática.

6.2. LOCAL

Os animais foram alocados no Biotério da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) - 4º andar do prédio 3 - Sala do peixe-zebra.

As amostras do presente estudo foram analisadas nos seguintes laboratórios:

Laboratório de Fisiologia Comportamental e Metabólica da UFCSPA - 5º andar do prédio 3 - Sala 502

Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA - 3º andar, prédio 3 – Sala 304

Laboratório de Patologia da UFCSPA - 5º andar prédio 3 - Sala 514

6.3. AMOSTRA

Foram utilizados peixes-zebra (*Danio rerio*), ambos os sexos, adquiridos em loja de aquarismo. Os peixes foram mantidos em aquários (no máximo 5 peixes para cada litro de água), a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo de 10 horas de escuro e 14 horas de luz e aeração constante (Figura 4). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração conforme grupo de experimento.



Figura 4: Aquários do experimento

Fonte: Biotério UFCSPA

O número de animais utilizados para cada tipo de análise, teve como base estudos prévios do grupo e da literatura. Para análises histológicas, o número amostral calculado foi de 5 peixes para cada tipo de análise (Hematoxilina & Eosina e Oil Red), para cada grupo, sendo o total de 40 peixes. Para análises de PCR, cada amostra representou um *pool* de 5 peixes, sendo necessário 6 amostras por grupo, sendo que o total de peixes utilizados foi de 120.

Uma margem de 20% foi calculada para a compra dos animais, visto que a mortalidade dos peixes durante a aclimação e o experimento é bastante variável.

Segue na tabela 1 o número total de animais necessários para a realização das análises.

Tabela 1: Número amostral de animais para as análises.

	H&E	Oil Red	PCR	Total
CT	5	5	30	40
F	5	5	30	40
SE-2	5	5	30	40
F-SE-2	5	5	30	40
				160

O percentual de mortalidade foi de 11%.

6.4. DESENHO EXPERIMENTAL

6.4.1. ALIMENTAÇÃO DOS PEIXES

A ração oferecida foi calculada semanalmente conforme o peso dos peixes. O cálculo utilizado foi de 5% do peso corporal por dia (LAWRENCE et al., 2012). Esta alimentação foi oferecida aos animais porcionada em duas vezes ao dia com ração conforme período e grupo de estudo. A ração foi oferecida 1x pelo pesquisador e 1x pelos técnicos do biotério. O tempo total do experimento foi de 60 dias para cada grupo.

Os animais foram alimentados com ração específica para peixes, encomendada em empresa especializada na confecção de rações animais para experimentos (DOMENEGHETTI& CORREA LTDA – ME).

As rações apresentam a mesma composição, exceto com relação ao selênio, ao qual a ração suplementada recebeu o acréscimo de selênio 2µg/g de ração (tabela 2).

Tabela 2: Composição das rações padrão / suplementada com selênio 2µg/g.

<i>Ingredients</i>	<i>Content (%)</i>
Fish meal	5.0
Soybean meal	59.4
Corn	31.1
Soy oil	0.4
Dicalcium phosphate	2.6
Limestone	0.3
<u>Mineral and vitamin mix^a</u>	0.5
Salt	0.5
BHT (antioxidant)	0.02

^aVit. A, 1,200,000 IU; Vit. D3, 200,000 UI; Vit. E, 12,000 mg; Vit. K3, 2400 mg; Vit. B1, 4800 mg; Vit. B2, 4800 mg; Vit. B6, 4000 mg; Vit. B12, 4800 mg; Folic acid, 1200 mg; Calcium pantothenate, 12,000 mg; Vit. C, 48,000 mg; Biotin, 48 mg; Choline, 65,000 mg; Niacin, 24,000 mg; Iron, 10,000 mg; Copper, 6000 mg; Manganese, 4000 mg; Zinc, 6000 mg; Iodine, 20 mg; Cobalt, 2 mg; Selenium, 20 mg.

Ração 1 (BASE): conforme tabela acima para ser usada nos peixes controles.

Ração 2 = ração 1 + suplementação de selênio em **2µg de selênio/g de ração ou 2mg/kg.**

6.4.2. PESO E COMPRIMENTO

Todos os animais foram pesados no início do experimento, a cada semana e ao término dos 60 dias do experimento.

A pesagem dos peixes foi realizada em uma balança de precisão (Marte, Modelo AD3300), em um recipiente com apenas água do aquário. Todos os peixes de cada grupo foram retirados do aquário com uma rede apropriada, colocados nesse recipiente para pesagem e rapidamente colocado de volta em um novo aquário, a fim de que o estresse fosse mínimo. Após foi realizada a média de peso dos peixes de cada grupo. No final do experimento, após eutanásia, os peixes foram levemente secos em papel absorvente e pesados individualmente colocados diretamente na balança.

A aferição de comprimento dos animais foi realizada ao término do período de experimentação (dia 61), através de uma régua. Após eutanásia, os peixes foram colocados lateralmente sobre uma régua para a medida do comprimento normalizado:

medida do comprimento entre o ponto da extremidade do focinho e a extremidade posterior da última vértebra ou a extremidade posterior da parte lateral média da placa hipural. Ou seja, esta medida exclui o comprimento da barbatana caudal (figura 5) (COMISSÃO EUROPEIA, 2016).

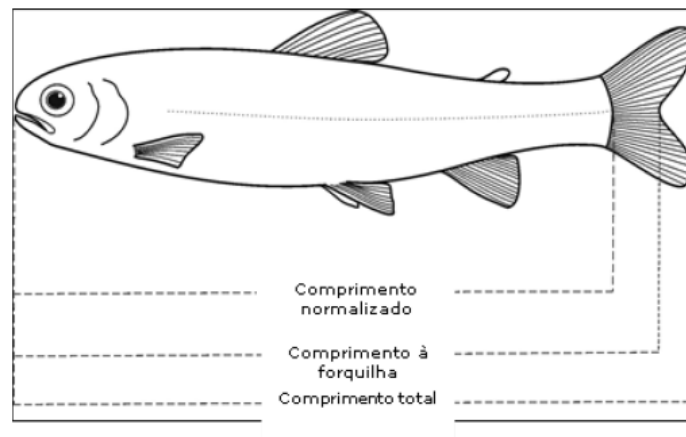


Figura 5: Avaliação ictiométrica dos animais.

Fonte: COMISSÃO EUROPEIA, 2016

O índice de massa corporal dos peixes foi calculado, segundo Oka e colaboradores, dividindo o peso do animal em gramas pelo seu comprimento (comprimento normalizado) em centímetros ao quadrado (OKA et al., 2010; GHADDAR et al., 2020).

6.4.3. INDUÇÃO À ESTEATOSE: PROTOCOLO DE FRUTOSE

Para a indução de esteatose foi utilizado frutose na concentração de 2%. Diariamente foi preparado aquário com frutose 2%, onde os animais permaneciam por 10 minutos. Após este período os peixes passavam por aquário de limpeza por 5 minutos e retornavam para o aquário de domicílio devidamente limpo.

A água dos aquários domicílio foi trocada diariamente a fim de eliminar excesso de componentes do experimento.

6.4.4. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em quatro grupos (tabela 3) e mantidos 15 dias somente recebendo as rações. A partir do 16º dia, iniciou-se a exposição a frutose por 45 dias, totalizando 60 dias de experimento para cada grupo.

Após cada experimento, os animais foram eutanasiados e os tecidos retirados para posteriores análises histológicas e de expressão gênica.

Tabela 3: Grupos experimentais.

Grupo	Descrição
Controle (CT)	Animal controle sem suplementação de selênio e sem indução de esteatose hepática.
Frutose (F)	Animal controle sem suplementação de selênio e COM indução de esteatose hepática.
Selênio 2µg (SE)	Animal controle com suplementação de selênio na dose de 2µg de selênio/g de dieta e sem indução de esteatose hepática.
Frutose + Selênio 2µg (F-SE)	Animal com suplementação de selênio na dose de 2µg de selênio/g de dieta e COM indução de esteatose hepática.

6.4.5. EUTANASIA E COLETA DE MATERIAIS

Para eutanásia, os animais foram colocados em um recipiente com água e solução de eugenol (óleo de cravo) adquirido comercialmente (CONCEA, 2015). Como o óleo de cravo é insolúvel em água, foi preparada uma solução estoque com álcool etílico. Esta solução consiste de 1-3ml de óleo de cravo diluídos em 10ml de álcool etílico. Para eutanásia, foram colocados 10ml dessa solução estoque em 1 litro de água gelada. Cada animal foi imerso nessa solução até a perda de equilíbrio e a parada da abertura das guelras (FAVORETTO; SEABRA; OLIVATO, 2019).

Os peixes foram mantidos em jejum por 24 h antes da eutanásia. Após, os animais foram pesados e medidos. Logo em seguida colocados em decúbito lateral à direita e fixados com agulha em chapa de isopor coberta por papel manteiga. A fixação foi feita pela sua nadadeira caudal e a outra no olho.

A retirada do fígado ocorreu em 3 etapas:

- Etapa 1: incisão com micro tesoura a partir do ventre do peixe, imediatamente anterior ao ânus. O corte seguia ao longo do abdome em direção ao opérculo - o revestimento rígido sobre as guelras próximo a nadadeira peitoral (Figura 6 - etapa 1).

- Etapa 2: do opérculo o corte subia até a parte posterior da cabeça, seguia subjacente a coluna (em direção a nadadeira dorsal) e então descia até a nadadeira anal.

- Etapa 3: O fragmento foi retirado com auxílio de pinça de microcirurgia no sentido cabeça-cauda (Figura 6 - etapas 2 e 3).

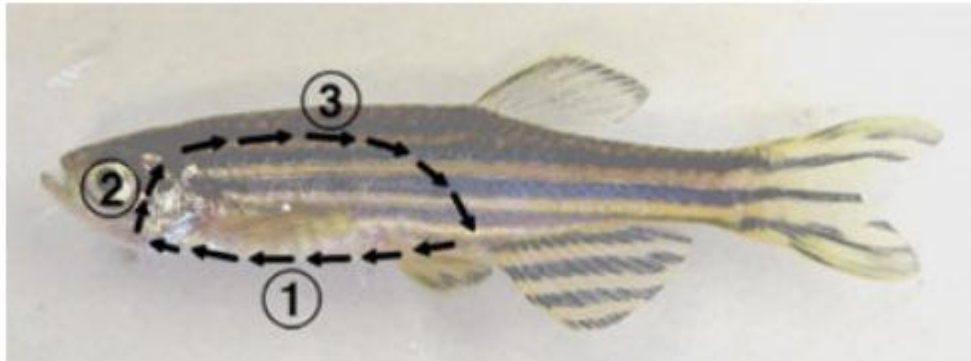


Figura 6: Remoção da pele e dos músculos da parede corporal para expor os órgãos internos.

Fonte: Adaptado de GUPTA; MULLINS, 2010

A pele e os músculos subjacentes da parede lateral do peixe foram removidos, deixando os órgãos internos visíveis.

6.4.6. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para análise histológica os fígados foram removidos com auxílio de pinça e alfinete e armazenados em paraformaldeído 4% tamponado - pH 7,2. Permaneceram nesta solução em refrigeração de 2 a 8° C por 48h. Transferidos para solução de sacarose 30% com solução de azida de sódio, mantidos também em refrigeração de 2 a 8° C por 2 a 5 dias até a peça submergir.

As peças foram retiradas da sacarose e secadas em papel absorvente. Foi acrescentada solução de Tissue Tek nas amostras e após realizado o congelamento em câmara fria à -26°C por 15 a 30 minutos. Em seguida foi realizado o corte no criostato com espessura de 5 micrometros para H&E e 10 micrometros para Oil Red. As lâminas permaneceram por 24h em temperatura ambiente e após armazenadas em freezer a -20°C até realização das colorações.

Oil Red: As lâminas contendo o material congelado foram lavadas em água destilada e colocadas em propileno glicol absoluto por 2 minutos. Após foram colocadas em solução de *Oil Red* por 16h e em solução de propilenoglicol a 85% por

1 minuto. Após foram enxaguadas em água destilada (2 trocas), coradas em solução de hematoxilina de Mayer por 15 a 60 segundos e enxaguadas com água destilada (várias trocas). O fechamento das lâminas foi realizado com meio de montagem (resina) e lamínula.

Hematoxilina e Eosina: As lâminas foram desidratadas em álcool etílico 100% por 5 minutos e lavadas em água destilada por 2 minutos. Após lavagem, foram coradas em Hematoxilina por 90 segundos, e lavadas em água sem agitar, até completa remoção da hematoxilina. Em seguida foram coradas em eosina por 60 segundos, e desidratadas em álcool etílico 5x por 2 minutos cada (50%, 70%, 80%, 100%I, 100%II respectivamente). Após desidratação, foi realizada a fixação do corante e conservação do material em xilol 2x por 5 minutos cada. As lâminas foram mantidas no xilol até fechamento.

A avaliação histológica foi feita por patologista cegada quanto aos grupos para análise das eventuais alterações hepáticas. As imagens foram capturadas em microscópio (Leica DM6-B - lâmpada dfc7000-T – sistema operacional Leica Las X) com aumento de 20X em lente 10x sendo amplificação 200x.

6.4.7. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Extração de RNA

Foi adicionando 750µL de trizol para cada tecido e homogeneizado até completa dissolução com pistilos para microtubos. Após 2 a 3 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado 150µL de clorofórmio e agitado vigorosamente por 15 segundos. Após 2 a 3 minutos em temperatura ambiente, foi colocado em centrífuga refrigerada a 4°C, a 12000xg (rcf) por 15 minutos.

Após foi retirada a fase aquosa (sobrenadante) com auxílio de pipeta para um tubo limpo. Adicionado 375µL de isopropanol e agitado no vórtex por 15 segundos. Após 10 minutos em temperatura ambiente, foi levado para centrífuga a 4°C, a 12000xg (rcf) por 10 minutos para formação do pellet (RNA). Após este processo foi retirado o sobrenadante por inversão do tubo.

Adicionado etanol 75% e agitado com cuidado para soltar o pellet. Colocado na centrífuga refrigerada a 4°C, 7500xg (rcf) por 5 minutos. Desprezado o sobrenadante por inversão e retirado o restante com pipeta. Colocado para secar em banho seco por aproximadamente 5 minutos a 50°C. Acrescentado 20µL de água Milli-Q®

e aquecido em estufa por 5 minutos a 50°C para completa dissolução. A quantificação de RNA presente na amostra foi feita utilizando um nano espectrofotômetro (BioSpec-nano Shimadzu Biotech).

Síntese de cDNA

Foi utilizado o kit comercial GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega USA). O procedimento foi usado para converter o RNA usando Primer Oligo (dT)15 em cDNA de primeira cadeia. O RNA e misturas de primers [Oligo(dT)15 (0,5µg/reação) e água livre de nuclease] foram incubados a 70°C por 5 minutos e armazenado em gelo por 5 min e após, a mistura de transcrição reversa foi adicionada. O volume de água e RNA foi calculado proporcionalmente para uma conversão de até 5µg de RNA total.

A mistura da reação de transcrição reversa foi preparada gerando um volume de 12µl para cada reação de cDNA (GoScript™ 5X Tampão de reação (4µl) , MgCl₂ (1,2µl), mistura de nucleotídeos de PCR (1µl), Transcriptase reversa GoScript™ (1µl). O volume final da síntese de CDNA foi de 20,2µl. O procedimento foi realizado de acordo com Kits do sistema de transcrição reversa GoScript™.

RT-qPCR

Foi realizado utilizando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega USA). O sistema contém um corante fluorescente de ligação ao DNA, o BRYT Green® Dye. Preparada mistura de reação combinando Go Taq qPCR Master Mix, água livre de nuclease e primers (tabela 4) na seguinte ordem:

GoTaq qPCR Master Mix – 7,5µl X n amostra + 2 para possíveis perdas de pipetagem

ROX – 0,1µl X n de amostras

Forward Primer – 0,5µl X n de amostras

Reverse Primer – 0,5µl X n de amostras

Nuclease free water – 5,4µl X n de amostras

14µl do Master Mix foi adicionado em cada poço e após adicionado 1µl da amostra de cDNA na mistura. Selada a placa e centrifugada em baixa velocidade por 1 minuto. Programado o termociclador com as condições de ciclagem térmicas desejada de acordo com as instruções do fabricante. A reação foi realizada em termociclador (StepOnePlus™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems™ USA).

Tabela 4: Sequências primárias específicas de genes para PCR em tempo real

Gene	Gene ID	Sequência	
β -Actin	AF057040	F: AAGATCAAGATCATTGCTCC	R: CCAGACTCATCGTACTCCT
GPx1	AW232474	F: AGATGTCATTCTGCACACG	R: AAGGAGAAGCTTCCTCAGCC
GPx4b	BC095133.1	F: TGAGAAGGGTTTACGCATCCTG	R: TGTTGTTCCCCAGTGTTCTT
SEPP1a	NM178297.3	F: AGGAGCCCCGCTGTAACTTC	R: GGAGGTAAGCCACCACTGTC
Sep15	NM_178294.5	F: GCGTCATATGGAGCAGAGCT	R: AGCCCCTCAGCAACAATCAA

β -actin foi medida e usada para normalizar os níveis de expressão dos genes pesquisados usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

F, primer direto; R, primer reverso

6.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das variáveis categóricas foram apresentados em frequência absoluta e relativa e das quantitativas simétricas em média e desvio padrão e mediana e intervalo interquartil (IQR), quando assimétricas. A normalidade foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk. Os grupos foram comparados pela análise de variância (ANOVA), com teste de Tukey para as comparações múltiplas e para a intensidade da reação foi usado o teste de Kruskal-Wallis com teste de Dunn para as comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$. As análises foram realizadas no software estatístico SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

6.6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com a **legislação vigente no Brasil (Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008)** que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e segue regulamentos da utilização humanitária dos animais das resoluções normativas nº12 (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos - DBCA)(CONCEA-MCT, 2016) e nº13 (Diretrizes da Prática de Eutanásia) **do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA**. O projeto “Estudo do papel do selênio e das selenoproteínas em peixe-zebra (*Danio rerio*)”, foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFCSPA com Parecer nº 661/19;

7. RESULTADOS

O presente estudo utilizou 160 peixes, sendo 120 para as análises bioquímicas e 40 para as histológicas. A coleta do material foi realizada no 61º dia de experimento em que os peixes foram divididos em quatro grupos: controle (CT), frutose (F), selênio 2 µg (SE-2), frutose+selênio (F-SE2).

Peso e IMC dos Animais

O peso dos animais foi aferido antes e depois do período experimental. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado dividindo-se o peso corporal (g) pelo quadrado do comprimento (cm²) (OKA et al., 2010; GHADDAR et al., 2020).

Não houve diferença significativa no ganho de peso entre os grupos ($p=0,108$). O teste estatístico utilizado foi ANOVA (tabela 5 / figura 7).

Tabela 5: Média de ganho de peso de peixe por grupo.

Grupo	n	Média	DP	IC95%	p-valor
Controle	30	0,068	0,109	0,028	0,107
Frutose	30	0,078	0,097	0,043	0,114
Selênio 2µg	30	0,132	0,116	0,089	0,175
Frutose + Selênio 2µg	30	0,087	0,116	0,044	0,130

Teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística dos dados ($p=0,108$).

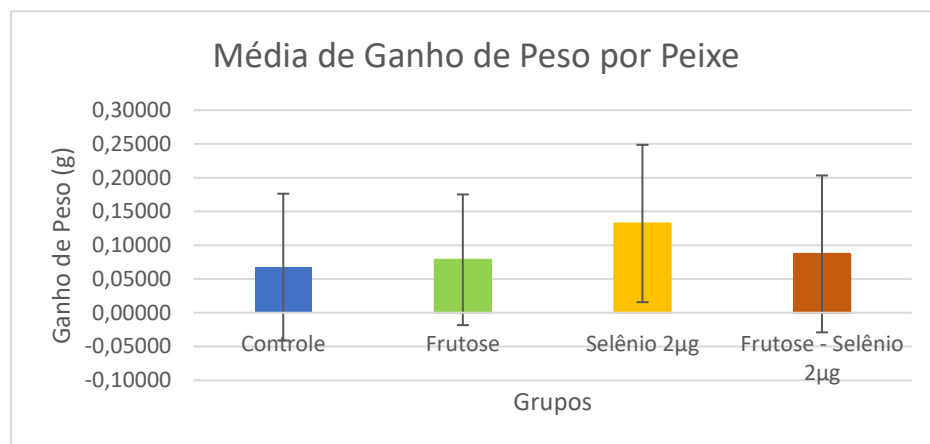


Figura 7: Média de Ganho de peso por peixe – comparação de ganho de peso por peixe entre os grupos controle, frutose, selênio 2µg e frutose + selênio 2µg. Teste utilizado para análise estatística dos dados teste ANOVA ($p=0,108$)

Ao analisar a comparação do IMC dos grupos foi observada diferença significativa nesta medida. Foi observado maior IMC para o grupo SE-2 ($0,0548 \pm 0,00960$ g/cm², $p < 0,001$), quando comparado aos demais grupos. O teste estatístico utilizado foi o teste de Tukey (tabela 6 / figura 8).

Tabela 6: Média de IMC dos grupos ao final do experimento.

Grupos	N	Média	DP	IC95%	p-valor
Controle	31	0,0428	0,01027	0,0390	0,0466
Frutose	31	0,0474	0,00843	0,0443	0,0505
Selênio 2µg	31	0,0548	0,00960	0,0513	0,0583
Frutose + Selênio 2µg	31	0,0469	0,00850	0,0438	0,0500
Total	124	0,0480	0,01010	0,0462	0,0498

Teste utilizado para análise estatística dos dados teste Tukey ($p < 0,001$).

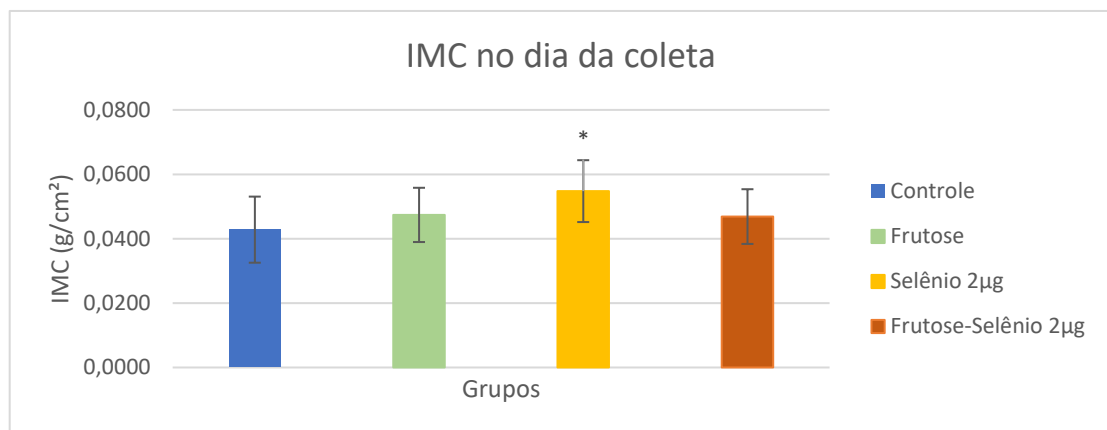


Figura 8: IMC no dia da coleta - Média por peixe – comparação da média do IMC por peixe aos 61 dias entre os grupos controle, frutose, selênio 2µg e frutose + selênio 2µg.

Teste utilizado para análise estatística dos dados teste Tukey (* $p < 0,001$).

Análise histológica

Na avaliação histológica dos fígados foram utilizadas as técnicas de coloração Hematoxilina & Eosina e Oil Red. Houve acúmulo de lipídio no fígado dos peixes expostos à frutose (F). Foi constatada presença de gotículas de gorduras indicando esteatose de ambos os tipos, macro e microvesicular. A presença de gordura foi comprovada pela coloração específica de *Oil Red*. As alterações hepáticas dos grupos

selênio 2 μ g (SE) e frutose+selênio 2 μ g (F-SE), exibiram menor intensidade quando comparados com aquelas do grupo F e maior quando comparados com o grupo controle (C) (figura 9 e 10).

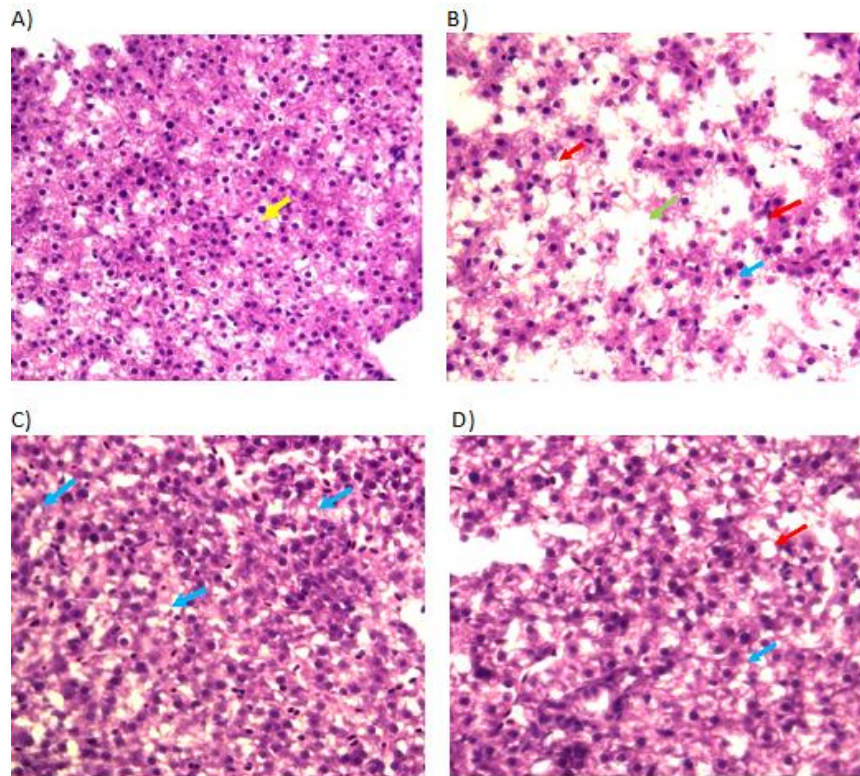


Figura 9: Fotomicrografia de fígado de peixe-zebra com a coloração de HE.

A- Controle; B- Frutose; C- Controle mais selênio; D- Frutose mais selênio. Núcleo centralizado (seta amarela). Esteatose microvesicular (seta azul). Esteatose macrovesicular (seta vermelha). Gotículas de gordura agrupadas (seta verde). Amplificação 200x.

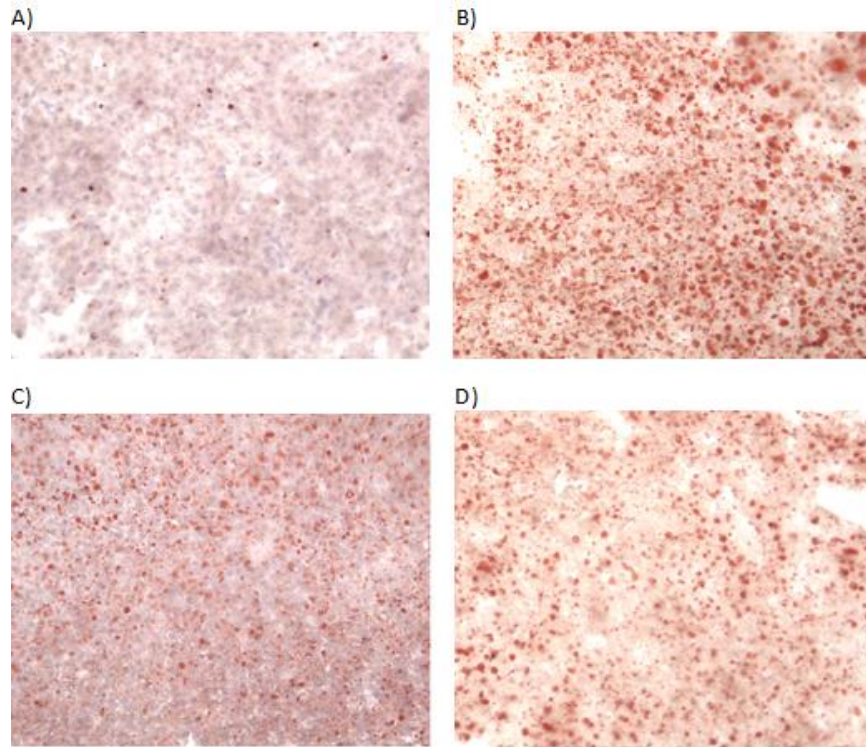


Figura 10: Fotomicrografia de fígado de peixe-zebra com a coloração de *Oil Red*.

A- Controle; B- Frutose; C- Controle mais selênio; D- Frutose mais selênio. A coloração avermelhada no citoplasma das células indica depósito de gordura. Amplificação 200x.

Ao analisarmos os dados histológicos (análise quantitativa por intensidade de reação) observa-se que os animais do grupo F, apresentaram esteatose após 45 dias de exposição à frutose apresentando diferença significativa do controle ($p=0,018$), e que os do grupo SE e F-SE apresentaram redução da esteatose com a ração suplementada com selênio, porém sem significância estatística. O teste estatístico utilizado foi teste de Kruskal-Wallis com teste Dunn de post-hoc (tabela 7).

Tabela 7: Resultado da análise com Oil Red: comparação entre os grupos.

Grupos	n	Mediana	IQR	p-valor
Selênio 2 μ g:	5	2+	1+ 3+	0,018
Frutose+Selênio 2 μ g:	5	2+	1+ 3+	
Controle:	4	1+	1+ 1+	
Frutose:	5	3+	2+ 3++	

Medianas que compartilham letras não diferem entre si: Teste de Dunn

Análise da expressão gênica

A análise da expressão gênica foi realizada para os genes SEPP1, GPx1, GPx4 e Sep15. Os genes GPx4 e Sep15 não amplificaram.

A expressão do gene SEPP1 apresentou maior expressão no grupo suplementado com selênio seguido por frutose (F) e frutose+selênio 2µg (F-SE), porém não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,311$). O teste realizado foi ANOVA (tabela 8 / figuras 11).

O gene GPx1 apresentou regulação negativa no grupo suplementado com selênio, e maior expressão nos grupos frutose (F) e frutose+selênio 2µg (F-SE), porém estatisticamente não apresentou diferença significativa ($p=0,064$). O teste realizado foi ANOVA (tabela 8 / figuras 12).

Tabela 8: Análise da expressão gênica da SEPP1 e GPx1 no fígado.

		N	Média	DP	F	p-valor
Δ CT SEPP1A	CT	5	0,1292	0,36388	1,307	0,311
	FRUT	4	-0,1914	0,56647		
	SE	4	-0,5180	0,32705		
	FRUT+SE	5	-0,1585	0,61684		
FC SEPP1A	CT	5	1,0274	0,28426	1,241	0,332
	FRUT	4	1,3212	0,49602		
	SE	4	1,5984	0,39325		
	FRUT+SE	5	1,3127	0,55255		
Δ CT GPx-1	CT	5	-0,0623	0,16980	2,957	0,064
	FRUT	4	-0,5168	0,54590		
	SE	5	0,2511	0,58478		
	FRUT+SE	6	-0,4735	0,48211		
FC GPx-1	CT	5	1,0058	0,12495	2,387	0,129
	FRUT	4	1,4448	0,53118		
	SE	5	0,8625	0,37996		
	FRUT+SE	6	1,3945	0,48091		

Teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística dos dados.

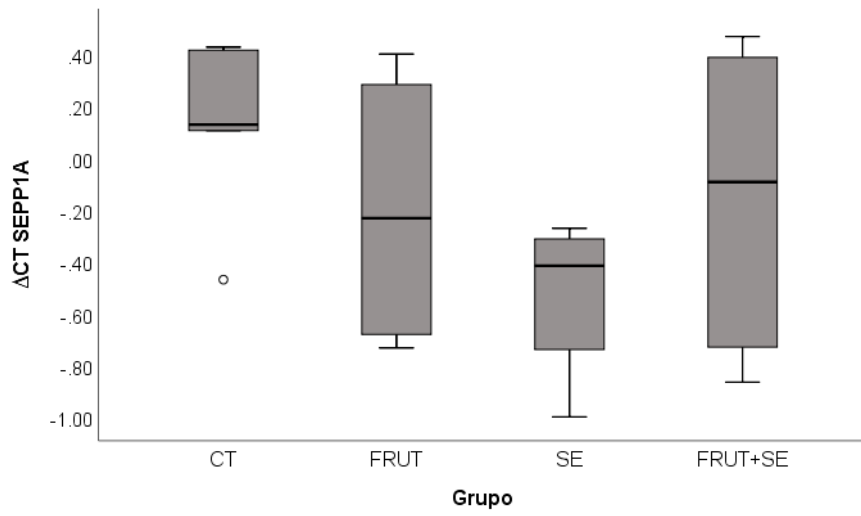


Figura 11: Expressão gênica da SEPP1 no fígado.

Teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística dos dados.

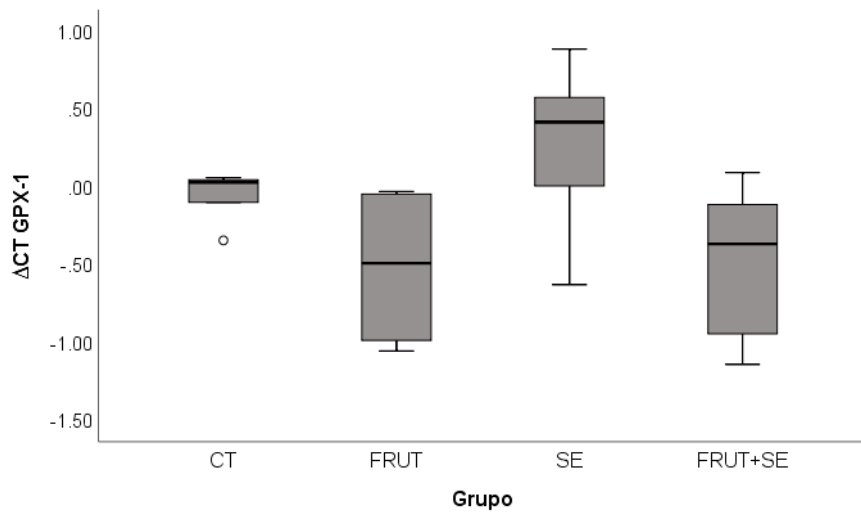


Figura 12: Expressão gênica da GPx1 no fígado.

Teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística dos dados.

8. DISCUSSÃO

O presente estudo se propôs a investigar o efeito da suplementação de selênio no tratamento da esteatose hepática em peixe-zebra expostos à frutose, por meio da avaliação histológica e da expressão de genes envolvidos no metabolismo do selênio. Embora vários estudos sobre esteatose causada por diferentes fatores tenham sido realizados em peixe-zebra (SAPP et al., 2014) (FERRARI et al., 2018) (SCHNEIDER et al., 2021) não registramos na literatura nenhum relacionado à utilização de selênio como suplemento terapêutico.

Alimentação dos peixes

No presente estudo em relação à ração fornecida aos peixes utilizamos uma ração específica para peixes, produzida por empresa especializada na confecção de produtos para experimentos em animais conforme já relatado no item 6.4.1 (página 25).

O cálculo para avaliar a quantidade da ração oferecida diariamente para os peixes foi baseada em estudos anteriores (LAWRENCE et al., 2012; FOWLER et al., 2019). Conforme Lawrence et al. (2012), os peixes alimentados com dieta a 5% do peso corporal 1x, 3x ou 5x ao dia mostraram desempenho de crescimento superior quando comparado a um controle "padrão" com dieta / regime alimentar de *Artemia* (3x ao dia) até a saciedade e peixes alimentados com ração para peixe (Gemma Micro300®) a 5% do peso corporal uma vez a cada dois dias. Em outro experimento, comparando crescimento, composição corporal e reprodução entre peixe-zebra alimentados com cinco dietas comerciais e uma dieta de referência (formulada quimicamente), todos os grupos receberam uma ração diariamente que consistiu em não menos que 5% do peso corporal. Para manter este percentual durante todo o teste de alimentação, as rações foram ajustadas para crescimento a cada 2 semanas (FOWLER et al., 2019).

Com base nestes dados, utilizamos em nosso estudo o cálculo de 5% do peso corporal ao dia, oferecido em 2 momentos (almoço e jantar). O cálculo foi reajustado semanalmente, conforme a aferição de pesos dos peixes. Comparando nossos dados de média de ganho de peso com os estudos de Lawrence et al. (2012) e Fowler et al. (2019) entendemos que o cálculo exato de 5% do peso corporal foi adequado.

Protocolo de frutose na indução de esteatose hepática em peixe-zebra

O consumo de frutose tem sido relacionado ao desenvolvimento e progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Estudos em modelos animais com dieta rica em frutose mostraram que ela promove lipogênese de novo, formação de espécies reativas de oxigênio, aumento da microbiota intestinal e aumento do risco de doenças cardiovasculares (FERRARI et al., 2018).

A frutose já foi utilizada para desenvolver esteatose em larvas e embriões de peixe-zebra e em animais adultos, tanto machos quanto fêmeas. Sapp et al. (2014), realizaram tratamentos com exposição à frutose nas concentrações de 2% e 4% do 5 ao 7 dpf, com o desenvolvimento da esteatose hepática e ativação de genes inflamatórios e lipogênicos nas larvas tratadas com a exposição mais aguda (4%). Em estudos anteriores do nosso grupo, realizado com peixe-zebra adultos, foram testadas as concentrações de 4% e 6% de frutose com exposições diárias (14 dias de experimento) e a cada 2 dias (20 dias de experimento), concluindo como melhor modelo experimental para o desenvolvimento da esteatose hepática, a exposição diária a 6% de frutose (FERRARI et al., 2018).

Mais recentemente, nosso grupo realizou a exposição dos animais à uma concentração de 2% de frutose diariamente por um período de 8 semanas. A exposição diária dos animais por 10 min a 2% de frutose mostrou-se eficaz para induzir doença hepática e aumentar significativamente o peso dos animais (SCHNEIDER et al., 2021).

Assim, no presente estudo optamos por utilizar a concentração de 2% de frutose por 10 minutos diariamente por 45 dias. Observamos que o tempo e a concentração adotados foram eficazes para a indução de esteatose hepática nos animais.

Drogas anestésicas e realização da eutanásia

O bem-estar animal é um aspecto fundamental para um exitoso protocolo de pesquisa. O peixe-zebra pode apresentar sinais de desconforto e estresse durante a anestesia ou indução da eutanásia, inclusive com o anestésico mais utilizado, a triclaína (VON KROGH et al., 2021).

Estudos atuais estão sendo realizados para analisar drogas anestésicas previamente à realização da eutanásia dos peixes. Dentre os anestésicos testados

podemos citar o isoeugenol, óleo de cravo, 2-fenoxietanol, tricaína, benzocaína, cloridrato de lidocaína e etomidato (VON KROGH et al., 2021).

O metanossulfonato de tricaína (MS222) é o anestésico mais comumente usado nesse cenário. Este agente bloqueia os canais de íons de sódio, levando à inconsciência, imobilidade e, finalmente, colapso vascular e morte causada por hipóxia (FERREIRA et al., 2022). No entanto, houve relatos alarmantes da droga desencadeando comportamentos aversivos durante a indução da eutanásia em peixe-zebra (espasmos, natação errática e aumento da atividade) que podem afetar até 30-90% dos animais (VON KROGH et al., 2021). Diversos experimentos utilizam a tricaína associada a água gelada. Gupta e Mullins (2010) relataram o uso de tricaína 0,2% seguido por incubação em água gelada por 15 minutos. De acordo com Fowler et al. (2019), os peixes foram mortos por submersão rápida em água gelada com MS-222 (metanossulfonato de tricaína) (300 mg/L) por um mínimo de 10 minutos após o movimento opercular ter cessado. Ghaddar et al. (2020), em seu estudo, realizaram a eutanásia dos peixes com água gelada (2-4°C) para evitar flutuações da glicemia devido ao uso de tricaína.

O óleo de cravo tem sido proposto como um agente anestésico tão ou mais eficaz do que o MS222. O óleo de cravo é um anestésico natural derivado de flores destiladas, caules e folhas da árvore de cravo, *Syzygium aromaticum*, contendo eugenol como principal ingrediente ativo (70-95%) (VON KROGH et al., 2021). Desde a antiguidade, o óleo de cravo tem sido usado como um anestésico tópico leve para dor de dente, dor de cabeça e dor nas articulações em humanos. Em peixes, o óleo de cravo já foi usado com sucesso para imobilizar peixes e suprimir os sistemas sensoriais durante o manuseio, cirurgia e procedimentos invasivos. Embora a maioria dos relatos sobre sua eficácia sejam anedóticos, detalhes do mecanismo de ação do óleo de cravo fornecem suporte para seu uso (DAVIS et al., 2015). O óleo de cravo é altamente lipofílico e é rapidamente absorvido pela pele e brânquias, entrando assim na corrente sanguínea. Sua ação no cérebro induz depressão do sistema nervoso central, morte por inibição respiratória e, por fim, parada cardíaca (FERREIRA et al., 2022). As Diretrizes da AVMA (American Veterinary Medical Association) de 2013 para a anestesia de animais afirmam que as vantagens do óleo de cravo incluem sua ampla disponibilidade, baixo custo, curto tempo de indução e ampla gama de eficácia, sendo agente aceitável para uso em peixes não destinados ao consumo (DAVIS et

al., 2015). As desvantagens incluem a falta de aprovação da FDA (Food and Drug Administration) para uso como agente anestésico.

Outra modalidade anestésica é o uso do choque hipotérmico ou resfriamento rápido, que consiste em adicionar gelo na água até que a temperatura da água atinja 2°C-4°C (FERREIRA et al., 2022). O tempo de 10 minutos foi o adotado por Fowler et al. (2019), para submersão rápida em água gelada após a cessação de todos os movimentos operculares. Este método é aceito nos Estados Unidos para peixe-zebra adultos, de acordo com as diretrizes mais recentes da American Veterinary Medical Association (AVMA), mas não na legislação da Diretiva Europeia (UE) (FERREIRA et al., 2022).

Pensando no bem estar animal, em nosso estudo, optamos por utilizar 2 dos métodos citados acima afim de minimizar desconforto e estresse durante a indução da eutanásia. Constatamos uma rápida perda de equilíbrio e a parada da abertura das guelras em questão de até 1 minuto. Os peixes permaneciam imersos nesta solução por aproximadamente 5 minutos para a confirmação da morte e posterior coleta de tecidos.

Peso, IMC dos animais e suplementação com selênio na dieta

A utilização do IMC (Índice de Massa Corporal) é amplamente utilizada em seres humanos para avaliação do estado nutricional. É importante ressaltar que a utilização do IMC em peixe-zebra é recente, e raros são os estudos que utilizaram este parâmetro (OKA et al., 2010; GHADDAR et al., 2020).

Fowler et al. (2019), utilizaram para aferição destas medidas o método de pesar e fotografar os animais em grupos a cada 2 semanas, utilizando a pesagem e a realização das fotos de forma individual somente no término do experimento. Diferentemente, Ghaddar et al. (2020) realizaram medição de peso e comprimento individual no primeiro e no último dia de experimento. Em nosso estudo optamos por realizar a pesagem dos peixes no início, a cada semana e no final do experimento (61 dias). O peso inicial e a cada semana foi aferido em grupos por aquário e realizada a média de peso por peixes, para então podermos realizar o cálculo das rações. Optamos por peso em grupo para minimizar o risco de estresse dos animais. No final do experimento o peso dos peixes foi realizado individualmente após a eutanásia dos mesmos. O método que utilizamos foi semelhante à Williams et al. (2021), que

realizaram a pesagem total dos peixes do tanque a cada 2 semanas para estimar a biomassa da população e ajustar a ração alimentar.

Observamos maior ganho de peso no grupo SE, porém, sem apresentar diferença significativa no ganho de peso entre os grupos. Nossos resultados são parcialmente semelhantes aos de Jahanbakhshi et al. (2021). Os autores avaliaram, os efeitos de diferentes fontes dietéticas de selênio, nanopartícula de selênio (nSe) e selenometionina (SeMet) como aditivos alimentares sobre o desempenho de crescimento, atividade de enzimas hepáticas, parâmetros bioquímicos, imunológicos da mucosa, aspectos histológicos e transcrição do gene relacionado ao apetite em peixinho dourado (*Carassius auratus*). Os resultados mostraram que os peixes alimentados com dietas fortificadas com 0,6 mg nSe/kg e 0,6 mg Se/kg apresentaram um ganho de peso maior do que os peixes alimentados com dietas basais.

Há relato também que em outras espécies animais a suplementação com selênio determinou maior ganho de peso. Assim, experimento realizado com camundongos machos com 8 semanas de idade, alimentados com dieta padrão (0.41 ppm Se) e água à vontade e outro grupo com tratamento com selênio (Na_2SeO_4 , 20 $\mu\text{mol/L}$) em água purificada por 16 semanas, foi observado maior ganho de massa corporal nos animais suplementados com selênio ($55\% \pm 5\%$) comparados com controles ($40\% \pm 3\%$) (HU et al., 2018). Neste experimento, nenhuma diferença foi observada no conteúdo de selênio no fígado, transcrição de selenoenzima ou atividade enzimática. O selênio foi maior no coração, rim e urina destes camundongos suplementados, e foram observadas alterações nas vias de lipídios e metabolismo de energia com a suplementação de selênio (genes para homeostase de colesterol, sinalização de células β pancreáticas e metabolismo de ácidos graxos). De acordo com Hu et al. (2018), essas características sugerem que a suplementação de selênio altera a oxidação de AG e cria um desequilíbrio com o metabolismo energético a jusante dependente de acetil-CoA, contribuindo para um aumento da massa corporal, indicando que as respostas fazem parte de sistemas interorgânicos que controlam o balanço energético. A falta de efeito sobre o conteúdo hepático de selênio sugere que a sinalização envolve um mecanismo extra-hepático (HU et al., 2018).

Em resumo, embora o peso do grupo com suplementação de selênio tenha sido maior, não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos, mas o IMC do grupo suplementado foi maior e apresentou diferença estatística na comparação com os outros grupos, indicando que os peixes

apresentaram maior ganho de peso proporcionalmente quando comparado com o ganho de crescimento.

Análise histológica

Embora a estrutura do fígado do peixe-zebra apresente particularidades que a distingue da dos mamíferos, os processos fisiológicos fundamentais, mutações genéticas e manifestações de respostas patogênicas a insultos ambientais exibem muita semelhança (KATOCH; PATIAL, 2021). Nosso grupo vem estudando em peixes-zebra adultos diferentes agentes causadores de esteatose hepática: etanol, obesidade, frutose e tóxicos (HAMMES et al., 2012; SCHNEIDER et al., 2014; FERRARI et al., 2018; SCHNEIDER et al., 2021).

Em larvas, estudo realizado por Chen, Zheng e Zhang, (2018) estabelece três modelos de dietas enriquecidas em colesterol, em frutose e em calorias. Foram utilizadas larvas com 5dpf alimentadas por 10 dias. A concentração de frutose utilizada foi de 0,25% (p/v). Os resultados mostraram que as três dietas induziram o acúmulo de gordura no fígado em larvas de peixe-zebra. Foi identificado acúmulo substancial de gordura na forma de pequenas e grandes gotículas lipídicas nos hepatócitos. Os fígados dos grupos rico em colesterol e em frutose apresentaram leve acúmulo de lipídios e focos de esteatose microvesicular, enquanto que o grupo rico em calorias desenvolveu acúmulo de lipídios no fígado e esteatose macrovesicular grave.

A suplementação de nSe e SeMet nas dietas oferecidas para peixes-dourados por Jahanbakhshi et al. (2021) ocasionou anormalidades no fígado dos animais. As principais lesões histológicas foram detectadas nos tratamentos com 0,9 mg de nanopartícula de selênio (nSe) e selenometionina (SeMet)/kg. A maior dose de fontes de selênio (SeMet e nSe) induziu dano hepático com presença de cariólise, lipidose e hiperemia, sendo semelhante aos dados de nosso estudo, onde também observamos alteração do tecido hepático com presença de gordura nos hepatócitos dos animais que receberam dieta com suplementação de selênio.

Na atual pesquisa, observamos que os animais expostos à frutose desenvolveram esteatose hepática demonstrada por meio de material histológico corado com Hematoxilina & Eosina e confirmado o conteúdo lipídico pela coloração de *Oil Red*. Observamos a presença de gordura microgoticular e macrogoticular nos hepatócitos com deslocamento dos núcleos para a periferia celular nos grupos expostos à frutose.

Análise da expressão gênica

Peixe-zebra possui 37 genes de selenoproteína em contraste com os 25 que foram relatados em humanos tendo esta diferença possivelmente devido à duplicação do genoma (BETANCOR et al., 2015). Estes genes são altamente conservados entre humanos e peixes-zebra, tornando-os um sistema útil para estudar os mecanismos básicos da doença hepática (GOESSLING; SADLER, 2015).

O selênio (Se) é um micronutriente essencial tendo suas funções biológicas mediadas em parte por selenoproteínas que contêm selenocisteína (Sec) em seu sítio ativo (BETANCOR et al., 2015).

Pesquisas recentes sugerem que, embora o baixo nível de selênio cause estresse oxidativo e distúrbios metabólicos, o alto nível de selênio também aumentou a prevalência de hipertensão, dislipidemia, diabetes (LIU et al., 2022). O selênio é conhecido por ter uma margem estreita entre a essencialidade e a toxicidade (ROMAN; JITARU; BARBANTE, 2014).

Pouco se sabe sobre os papéis das selenoproteínas nos peixes (PENGLASE et al., 2014; BETANCOR et al., 2015; PETTEM; WEBER; JANZ, 2017). Betancor et al. (2015), em seu estudo investigaram os efeitos da suplementação de Se no estado oxidativo do peixe-zebra, juntamente com a expressão de selenoproteínas quando submetidos a uma dieta rica em DHA (Ácido docosahexaenóico) e suplementação de Se orgânico (7 mg/kg), por 8 semanas. Por meio da avaliação de valores TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), um indicador de peroxidação lipídica, observaram redução do estresse oxidativo nos animais com suplementação de Se. No entanto, a avaliação da GPx3 e GPx4 apresentou menor expressão em peixes alimentados com altos teores de DHA, independentemente da suplementação de Se e independente dos teores de TBARS, e SEPP1 no fígado apresentou regulação negativa, sugerindo que a proteção contra o estresse oxidativo associada à alta ingestão dietética de Se pode não ter sido mediada por alterações transcricionais, e que a regulação pode estar a nível proteico (BETANCOR, 2015).

Em nosso estudo, optamos por analisar 4 genes que são expressos no fígado do peixe-zebra: GPx1, GPx4, Seleno P(SEPP1) e Seleno 15. Observamos regulação negativa na expressão da GPx1 hepática na dieta suplementada com selênio, e maior expressão nos grupos F e F-Se respectivamente (Δ CT -0,0623; 0,2511; -0,5168; -0,4735 sendo controle, selênio, frutose e frutose + selênio respectivamente. $P=0,064$).

Em contrapartida, Penglase et al. (2014), observou correlação positiva entre status de Se e a expressão de GPx1, sendo importante destacar que a avaliação das expressões gênicas ocorreram no corpo inteiro ao invés de um tecido (como realizado em nosso experimento com avaliação da GPx1 no fígado). Em seu estudo avaliando o efeito de diversas doses de selênio dietético (0,09mg/Kg a 30mg/Kg) em peixe-zebra de 27 a 254dpf com relação aos principais parâmetros do metabolismo e utilização do Se, observou resposta transcricional diferencial para SEPP1 quando alimentação acima de 0,03mg/kg de Se na forma de selenometionina (PENGLASE et al., 2014). Estes dados foram semelhantes o nosso estudo em que observamos tendência maior da expressão de SEPP1 no grupo suplementado com selênio (Δ CT 0,1292; -0,5180; -0,1914; -0,1585 sendo controle, selênio; frutose; frutose+selênio respectivamente. $P=0,311$), refletindo sensibilidade deste gene para expressão dose dependente.

Assim como Penglase et al. (2014), o estudo realizado por Pettem, Weber e Janz (2017) com peixes-zebra adultos oferecendo ração controle (1,1 μ g/g Se) e suplementada com selênio (10,3 ou 28,8 μ g/g Se) por 90 dias, para avaliar os mecanismos de toxicidade subletal com implicações cardiovasculares por exposição crônica a selenometionina. Os autores observaram aumento dose dependente na expressão de SEPP1 no fígado (com maior expressão no tratamento de 28,8 μ g/g Se), e tendência a aumento com relação a avaliação da expressão de GPx1 (PETTEM; WEBER; JANZ, 2017).

Sabe-se que o SEPP1 é sintetizado e secretada principalmente pelos hepatócitos e liberado na corrente sanguínea (DI GIUSEPPE et al., 2017), funcionando como principal transportador de Se do fígado para outros tecidos, onde outras selenoproteínas podem ser sintetizadas (SAITO, 2020). Observamos na atual pesquisa que os dados parecem sugerir um efeito positivo do selênio no SEPP1 (gene sensível a suplementação de selênio), porém não sendo suficiente para alteração na expressão da GPx1.

9. CONCLUSÕES

O presente estudo onde avaliamos o efeito da suplementação de selênio na esteatose hepática de peixe-zebra expostos à frutose, nos permite concluir que:

a) *Reproduzir o modelo animal de esteatose hepática não alcoólica em peixe-zebra expostos à frutose:*

Houve indução de esteatose hepática por exposição à frutose com baixa mortalidade dos animais durante protocolo.

b) *Avaliar ganho de peso durante experimento e IMC ao término do estudo.*

Foi observado maior ganho de peso para o grupo SE, porém sem diferença estatística significativa. Em relação ao IMC houve maior ganho de massa para o grupo SE quando comparado com os outros grupos.

c) *Avaliar do ponto de vista histológico a esteatose hepática em peixe-zebra no término do experimento:*

As colorações Hematoxilina & Eosina e *Oil Red* possibilitaram a visualização das alterações histológicas hepáticas: demonstraram depósitos de gotículas de lipídios nos hepatócitos. No padrão macrovesicular, o vacúolo lipídico desloca o núcleo rumo a periferia celular, enquanto no padrão microvesicular o núcleo permanece na posição central de célula.

d) *Analisar o efeito da suplementação de selênio no tratamento da esteatose por meio de análise histológica hepática:*

Não foi demonstrada redução dos depósitos de lipídios intra-hepáticos com a suplementação de selênio na dieta

e) *Determinar expressão gênica de SEPP1, GPx1, GPx4 e Seleno 15 nos quatro grupos experimentais:*

Não houve amplificação dos genes GPx4 e Seleno 15. GPx1 apresentou regulação negativa para o grupo suplementado com selênio e maior expressão nos grupos F seguido de F-SE. Em relação ao SEPP1 houve maior expressão no grupo suplementado com selênio, porém sem diferença estatística significativa quando comparado com os outros grupos. Estes resultados parecem indicar que um possível efeito protetor da suplementação de selênio possa não estar associado às alterações transcricionais.

10. REFERÊNCIAS

- ARAB, J. P. et al. Bile acids and nonalcoholic fatty liver disease: Molecular insights and therapeutic perspectives. **Hepatology**, v. 65, n. 1, p. 350–362, 2017.
- BETANCOR, M. B. et al. Roles of selenoprotein antioxidant protection in zebrafish, *Danio rerio*, subjected to dietary oxidative stress. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 705–720, 2015.
- BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 65, n. 8, p. 1038–1048, 2016.
- CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. **Hepatology**, v. 55, n. 6, p. 2005–2023, 2012.
- CHEN, B.; ZHENG, Y. M.; ZHANG, J. P. Comparative study of different diets-induced NAFLD models of zebrafish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. JUL, p. 1–11, 2018.
- CICHOZ-LACH, H.; MICHALAK, A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 25, p. 8082–8091, 2014.
- COMISSÃO EUROPEIA. **Conselho da União Europeia**. 2016
- CONCEA-MCT. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA. **Brazilian Government**, v. 1, p. 1–50, 2016.
- CONCEA. DIRETRIZ DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA. **Diário Oficial da União**, 2015.
- COTRIM, H. P. et al. Nonalcoholic fatty liver disease Brazilian society of hepatology consensus. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 53, n. 2, p. 118–122, 2016.
- DAMMSKI, A. P. et al. **Zebrafish - Manual de Criação em Biotério**. 1ª Edição ed. Curitiba: [s.n.].
- DAVIS, D. J. et al. Effects of clove oil as a euthanasia agent on blood collection efficiency and serum cortisol levels in *Danio rerio*. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 54, n. 5, p. 564–567, 2015.
- DI GIUSEPPE, R. et al. Circulating selenoprotein P levels in relation to MRI-derived body fat volumes, liver fat content, and metabolic disorders. **Obesity**, v. 25, n. 6, p. 1128–1135, 2017.
- FAVORETTO, S. M.; SEABRA, D. I.; OLIVATO, M. C. M. **Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa**. [s.l: s.n.].
- FEDERICO, A. et al. The role of fructose in non-alcoholic steatohepatitis: Old relationship and new insights. **Nutrients**, v. 13, n. 4, 2021.
- FERRARI, J. T. et al. Experimental model of hepatic steatosis by fructose in adult zebrafish: A pilot study. **Clinical & Biomedical Research**, v. 38, n. g2, p. 151–154, 2018.
- FERREIRA, J. M. et al. Anesthesia Overdose Versus Rapid Cooling for Euthanasia of Adult Zebrafish. **Zebrafish**, v. 19, n. 4, p. 148–159, 2022.
- FOWLER, L. A. et al. Influence of Commercial and Laboratory Diets on Growth, Body Composition, and Reproduction in the Zebrafish *Danio rerio*. **Zebrafish**, v. 16, n. 6, p. 508–521, 2019.
- GHADDAR, B. et al. Impaired brain homeostasis and neurogenesis in diet-induced overweight zebrafish: a preventive role from *A. borbonica* extract. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2020.

- GOESSLING, W.; SADLER, K. C. Zebrafish: An Important Tool for Liver Disease Research. **Gastroenterology**, v. 149, n. 6, p. 1361–1377, 2015.
- GUPTA, T.; MULLINS, M. C. Dissection of organs from the adult zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, n. 37, p. 3–7, 2010.
- HAMMES, T. O. et al. The effect of taurine on hepatic steatosis induced by thioacetamide in Zebrafish (*Danio rerio*). **Digestive Diseases and Sciences**, v. 57, n. 3, p. 675–682, 2012.
- HANYANG, L. et al. Application of zebrafish models in inflammatory bowel disease. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAY, 2017.
- HARIHARAN, S.; DHARMARAJ, S. Selenium and selenoproteins: it's role in regulation of inflammation. **Inflammopharmacology**, v. 28, n. 3, p. 667–695, 2020.
- HENGIST, A.; KOUMANOV, F.; GONZALEZ, J. T. Fructose and metabolic health: governed by hepatic glycogen status? **Journal of Physiology**, v. 597, n. 14, p. 3573–3585, 2019.
- HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **nature**, v. 291, p. 293–296, 1981.
- HU, X. et al. Selenium supplementation alters hepatic energy and fatty acid metabolism in mice. **Journal of Nutrition**, v. 148, n. 5, p. 675–684, 2018.
- JAHANBAKHSI, A. et al. Selenium nanoparticle and selenomethionine as feed additives: effects on growth performance, hepatic enzymes' activity, mucosal immune parameters, liver histology, and appetite-related gene transcript in goldfish (*Carassius auratus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 639–652, 2021.
- KATOCH, S.; PATIAL, V. Zebrafish: An emerging model system to study liver diseases and related drug discovery. **Journal of Applied Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 33–51, 2021.
- LAWRENCE, C. et al. The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquaculture**, v. 368–369, p. 103–108, 2012.
- LIU, J. et al. The association between non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and advanced fibrosis with blood selenium level based on the NHANES 2017-2018. **Annals of Medicine**, v. 54, n. 1, p. 2259–2268, 2022.
- MAIYO, F.; SINGH, M. Selenium nanoparticles: potential in cancer gene and drug delivery. **Nanomedicine**, v. 12, n. 9, p. 1075–1089, 2017.
- MCPHERSON, S. et al. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: Implications for prognosis and clinical management. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 5, p. 1148–1155, 2015.
- MISRA, S. et al. Tissue-specific accumulation and speciation of selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to elevated dietary selenomethionine. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 155, n. 4, p. 560–565, 2012.
- MOHAMMED ESLAM et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. **J Hepatol**, v. 73, n. (1), p. 202–209, 2020.
- NADER, L. A.; DE MATTOS, A. A.; BASTOS, G. A. N. Burden of liver disease in Brazil. **Liver International**, v. 34, n. 6, p. 844–849, 2014.
- NASSIR, F. et al. Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 3, p. 167–175, 2015.
- NATH, B. et al. Hepatocyte-specific Hypoxia Inducible Factor-1 α is a.pdf. v. 53, n. 5, p. 1526–1537, 2012.
- OKA, T. et al. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological

- pathways with mammalian obesity. **BMC physiology**, v. 10, p. 1–13, jan. 2010.
- OLIVEIRA, C. P. et al. The transcontinental variability of nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatoma Research**, v. 2020, 2020.
- PENGLASE, S. et al. Selenium status affects selenoprotein expression, reproduction, and F 1 generation locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 11, p. 1918–1931, 2014.
- PETTEM, C. M.; WEBER, L. P.; JANZ, D. M. Cardiac and metabolic effects of dietary selenomethionine exposure in adult Zebrafish. **Toxicological Sciences**, v. 159, n. 2, p. 449–460, 2017.
- POLYZOS, S. A. et al. Selenium and selenoprotein P in nonalcoholic fatty liver disease. **Hormones**, v. 19, n. 1, p. 61–72, 2020.
- REJA, M. et al. Increased serum selenium levels are associated with reduced risk of advanced liver fibrosis and all-cause mortality in NAFLD patients: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III. **Annals of Hepatology**, v. 19, n. 6, p. 635–640, 2020.
- REZZANI, R.; FRANCO, C. Liver, oxidative stress and metabolic syndromes. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 1–4, 2021.
- RIVES, C. et al. Oxidative stress in NAFLD: Role of nutrients and food contaminants. **Biomolecules**, v. 10, n. 12, p. 1–69, 2020.
- ROMAN, M.; JITARU, P.; BARBANTE, C. Selenium biochemistry and its role for human health. **Metallomics**, v. 6, n. 1, p. 25–54, 2014.
- SAITO, Y. Selenoprotein P as an *in vivo* redox regulator: disorders related to its deficiency and excess. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 66, n. 1, p. 1–7, 2020.
- SAPP, V. et al. Fructose leads to hepatic steatosis in zebrafish that is reversed by mechanistic target of rapamycin (mTOR) inhibition. **Hepatology**, v. 60, n. 5, p. 1581–1592, 2014.
- SCHNEIDER, A. C. R. et al. Effect of Melatonin on the Reduction of Hepatic Steatosis and Intestinal Leptin Expression in Zebrafish Exposed to Fructose. **Zebrafish**, v. 18, n. 3, p. 184–189, 2021.
- SHANG, N. et al. The Functions of Selenium and Selenoproteins Relating to the Liver Diseases. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 19, n. 4, p. 1875–1888, 2018.
- SHORT, S. P.; PILAT, J. M.; WILLIAMS, C. S. Roles for selenium and selenoprotein P in the development, progression, and prevention of intestinal disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 127, p. 26–35, 2018.
- SILVEIRA, T. R. DA; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, 2012.
- SOFTIC, S.; COHEN, D. E.; KAHN, C. R. Role of Dietary Fructose and Hepatic de novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. **Dig Dis Sci**, v. 61, n. 5, p. 1282–1293, 2016.
- SU, L. J. et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.
- TER HORST, K. W.; SERLIE, M. J. Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1–20, 2017.
- VANNI, E. et al. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? **Digestive and Liver Disease**, v. 42, n. 5, p. 320–330, 2010.
- VON KROGH, K. et al. Screening of anaesthetics in adult zebrafish (*Danio rerio*) for

the induction of euthanasia by overdose. **Biology**, v. 10, n. 11, 2021.

WANG, S. et al. Making it new again: Insight into liver development, regeneration, and disease from zebrafish research Shuang. **Curr Top Dev Biol.**, v. 124, p. 161–195, 2017.

WILLIAMS, M. B. et al. Effect of Long-Term Consumption of Poultry Egg Products on Growth , Body Composition , and Liver Gene Expression in Zebrafish , *Danio rerio*. **Current Developments in Nutrition**, v. 5, n. 12, p. 1–13, 2021.

YOUNOSSI, Z. M. et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 73–84, 2016.

11. ANEXOS

11.1. APROVAÇÃO CEUA



CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 262/19

2) DATA DO PARECER: 13/11/2019 Parecer 661/19

3) TÍTULO DO PROJETO:

Estudo do papel do selênio e das selenoproteínas em zebrafish (*Danio rerio*).

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Silvana de Almeida

5) RESUMO DO PROJETO:

A esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) é definida como o acúmulo de gordura no fígado sem a associação do consumo excessivo de álcool. A prevalência geral para essa doença é cerca de 25%, com o Brasil apresentando uma taxa de 36%. Apesar do avanço nas pesquisas, ainda não foi desenvolvido um método ou marcador não invasivo eficiente para o diagnóstico e estadiamento do NAFLD. O selênio (Se) é um micronutriente essencial para o funcionamento de todos os organismos, exercendo seu efeito através de selenoproteínas. As selenoproteínas são enzimas antioxidantes capazes de combater os malefícios do estresse oxidativo. O objetivo é avaliar o efeito da suplementação de selênio no desenvolvimento da esteatose hepática gordurosa não alcoólica, no padrão de expressão das selenoproteínas e no comportamento de zebrafish (*Danio rerio*). Serão utilizados zebrafish adulto *wild-type* que serão divididos em grupos de acordo com a suplementação de dieta com selênio e indução da esteatose (controle - CT, suplementação de selênio - SE1 e SE2, dano hepático - DN, dano hepático com suplementação de selênio - DN-SE1 e 2). Serão analisados alguns comportamentos dos animais, a quantificação dos depósitos lipídicos no fígado, a expressão gênica de selenoproteínas e a concentração corporal de selênio. O presente estudo será submetido ao CEUA-UFCSPA.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Avaliar o efeito da suplementação de selênio no desenvolvimento da esteatose hepática não alcoólica, no padrão de expressão das selenoproteínas e no comportamento de zebrafish (*Danio rerio*).

Determinar histologicamente o desenvolvimento da esteatose hepática não alcoólica em zebrafish (*Danio rerio*).

Avaliar o efeito da suplementação de selênio no desenvolvimento da esteatose hepática não alcoólica em zebrafish (*Danio rerio*).

Avaliar o efeito da suplementação no comportamento de zebrafish (*Danio rerio*).



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Analisar o padrão de expressão de mRNA de selenoproteínas diante da suplementação do selênio e do dano hepático causado pela esteatose hepática não alcoólica em zebrafish (*Danio rerio*).

7) FINALIDADE DO PROJETO: Ensino Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título Adequado Comentários

Introdução Adequada Comentários

Objetivos Adequados Comentários

Relevância e Justificativa Adequados Comentários

Materiais e Métodos Adequados Comentários

Cronograma para execução da pesquisa Adequado Comentários

Orçamento e fonte financiadora Adequados Comentários

Referências Bibliográficas Adequadas Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE: Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B C D E

Justifique:

Espécie: Número Amostral:



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Redução Amostral: Sim Não

Justifique:

Substituição de Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Laboratório):

Outra instituição. Qual?



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
	<i>Danio rerio</i>	Machos	339
	<i>Danio rerio</i>	Fêmeas	339

12) RECOMENDAÇÃO: As pendências deverão ser respondidas em uma carta, indicando as páginas do projeto que foram alteradas (nova versão), assinadas pelo pesquisador responsável.

- Aprovado
- Com Pendência
- Não aprovado

Data de início 01/11/2019 Data de Término 20/12/2022

Comentários gerais sobre o projeto: