

Estado da publicação: Não informado pelo autor submissor

# EFEITO DO ÓLEO DE COCO NAS COMPLICAÇÕES DA DOENÇA HEPÁTICA

Giovanna Santos Piedade, Cynthia Fontoura Klas, Rebeca Loureiro Rebouças, Gleyce Rodrigues da Costa Farias, Isabelle Guth, Luiz Martins Collaço, Camila Moraes Marques, Luiz Fernando Kubrusly

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.4142>

Submetido em: 2022-05-20

Postado em: 2022-05-20 (versão 1)

(AAAA-MM-DD)

## **EFEITO DO ÓLEO DE COCO NAS COMPLICAÇÕES DA DOENÇA HEPÁTICA**

### *COCONUT OIL EFFECT IN THE COMPLICATIONS OF HEPATIC DISEASE*

Giovanna Santos **PIEIDADE**<sup>1</sup>, Cynthia Fontoura **KLAS**<sup>1</sup>, Rebeca Loureiro **REBOUÇAS**<sup>1</sup>, Gleyce Rodrigues da Costa **FARIAS**<sup>1</sup>, Isabelle **GUTH**<sup>1</sup>, Luiz Martins **COLLAÇO**<sup>1</sup>, Camila Moraes **MARQUES**<sup>2,3</sup>, Luiz Fernando **KUBRUSLY**<sup>1</sup>

Trabalho realizado na <sup>1</sup>Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, Brazil; <sup>2</sup>Faculdades Pequeno Príncipe, Curitiba, Brazil; <sup>3</sup>Pelé Pequeno Príncipe Research Institute, Curitiba, Brazil.

#### **ORCID**

Giovanna Santos Piedade: 0000-0001-9641-0917  
Cynthia Fontoura Klas: 0000-0001-5982-4475  
Rebeca Loureiro Rebouças: 0000-0002-0365-5497  
Gleyce Rodrigues da Costa Farias: 0000-0001-8314-1367  
Isabelle Guth: 0000-0002-5775-9304  
Luiz Martins Collaço: 0000-0002-3215-1650  
Camila Moraes Marques: 0000-0001-5121-922X  
Luiz Fernando Kubrusly: 0000-0002-6546-9841

Conflito de interesse: Nenhum

Fonte de financiamento: PIBIC (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica)

Correspondência:

Rebeca Loureiro Rebouças  
Email: [rebecareboucas@gmail.com](mailto:rebecareboucas@gmail.com)

#### **Mensagem central**

O uso de óleo de coco, em modelo animal, em quadro de cirrose não atenua a evoluçãoda doença.

#### **Perspectiva**

Este estudo avalia o uso do óleo de coco, pelo seu uso difundido e fácil acesso, como um potencial uso terapêutico adjuvante, visto que existem benefícios no uso de outros ácidos graxos em quadro de doença hepática cirrótica. O conhecimento acerca do uso do óleo de coco com fim terapêutico visa esclarecer a população sobre indicações dietéticas inadequadas ou ineficientes.

#### **Contribuição dos autores**

Giovanna Santos Piedade -

Conceituação Cynthia Fontoura Klas -  
Análise formal Rebeca Loureiro  
Rebouças - Investigação  
Gleyce Rodrigues da Costa Farias - Metodologia  
Isabelle Guth - Administração do projeto  
Luiz Martins Collaço - Supervisão  
Camila Moraes Marques - Redação (esboço original)  
Luiz Fernando Kubrusly - Redação (revisão e edição)

**RESUMO – Racional:** A prevenção da evolução da cirrose com suplementação dietética tem estado em foco óleo de coco tem sido sugerido. **Objetivo:** Avaliar o efeito da

suplementação de óleo de coco em ratos cirróticos. **Método:** Quarenta Wistar foram divididos: controle (CO); controle + óleo de coco (CO+OC); tioacetamida (TAA) e tioacetamida + óleo de coco (TAA + OC). O TAA foi adicionado à água por 13 semanas e o óleo de coco administrado por gavagem. Amostras de sangue, fígado, tecido muscular e nervoso foram obtidas para análises laboratorial e histopatológica. **Resultados:** AST, ALT, colesterol total, HDL, LDL, triglicérides não foram estatisticamente significantes. Na histologia, mesmo sem diferenças, houve tendência na significância quanto a proliferação de ductos biliares, septos fibróticos e atrofia da fibra muscular entre os grupos TAA e TAA + OC. **Conclusão:** Não foi encontrado efeito protetor significativo do óleo de coco na doença hepática. **DESCRITORES** - Cirrose hepática, Experimental, Tioacetamida, Óleo de coco.

**ABSTRACT – Background:** Prevention of the progression of cirrhosis with dietary supplementation has been in focus Coconut oil has been suggested. **Objective:** To evaluate the effect of coconut oil supplementation in cirrhotic rats. **Method:** Forty Wistars were divided: control (CO), control + coconut oil (CO + OC), thioacetamide (TAA) and thioacetamide + coconut oil (TAA + OC). TAA was added to water for 13 weeks and coconut oil was administered by gavage. Blood, liver, muscle and nervous tissue samples were obtained for laboratory and histopathological analyses. **Results:** AST, ALT, total cholesterol, HDL, LDL, triglycerides were not statistically significant. In histology, even without differences, there was a tendency towards significance regarding the proliferation of bile ducts, fibrotic septa and muscle fiber atrophy between the TAA and TAA + OC groups. **Conclusion:** No significant protective effect of coconut oil on liver disease was found.

**KEYWORDS** – Liver cirrhosis. Experimental. Thioacetamide. Coconut oil.

## INTRODUÇÃO

A cirrose é responsável por quase 2 milhões de mortes em todo o mundo a cada ano (1), e atualmente é a 11ª causa mais comum de morte no mundo. Ela resulta do processo de fibrose hepática, que se caracteriza pelo acúmulo progressivo de matriz extracelular, que destrói a arquitetura fisiológica do fígado.<sup>(2,3)</sup>

Essa doença pode ser definida como o estágio final da fibrose do parênquima hepático, que resulta na formação de nódulos com função hepática alterada e leva à insuficiência hepatocelular e hipertensão portal<sup>(4,5)</sup>.

Como forma de investigação de tratamentos complementares, é importante estabelecer modelos animais de indução de cirrose que mimetizem a doença

hepática encontrada em humanos. Alguns dos principais métodos de indução incluem tioacetamida (TAA). Ela requer ativação metabólica pelas enzimas CYP450 para se tornar tóxica. Uma análise proteômica de tioacetamida e cirrose induzida por ratos hepatotóxicos que determinam a administração de TAA regulou como enzimas de vias metabólicas primárias, como b-oxidação de ácidos graxos, aminoácidos de cadeia ramificada e quebra de metionina, bem como proteínas oxidativas relacionadas ao estresse reguladas positivamente e até peroxidação lipídica.<sup>(6,7)</sup>

Considerada complicação da doença hepática, a desnutrição está frequentemente associada à cirrose, representando fator importante no prognóstico e progressão da doença. Nesse contexto, a intervenção nutricional desempenha papel importante<sup>(8)</sup>

A literatura científica atualmente tem demonstrado benefícios do óleo de coco (OC) virgem em relação à redução da gordura corporal e outros aspectos na área da saúde. <sup>(9)</sup> Os benefícios terapêuticos do óleo extravirgem se devem à sua composição de 92% de ácidos graxos saturados, com predominância de cadeias médias, fosfolipídios, tocoferol (que são antioxidantes naturais) e outros constituintes voláteis. Entre 40-50% da composição do óleo de coco é ácido láurico, que ao contrário de outras

gorduras saturadas, é rapidamente absorvido, transportado para o fígado e oxidado, em vez de armazenado.<sup>(10)</sup>

Um estudo mostrou que o uso do óleo de coco, por ser rapidamente quebrado e absorvido na circulação portal, seria boa indicação para quem tem cirrose. Ele é capaz de reduzir a esteatorreia, além de promover equilíbrio energético equilibrado.<sup>(11)</sup>

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a suplementação do óleo de coco em um modelo de indução cirrótica por meio da tioacetamida.

## MÉTODOS

A pesquisa foi fundamentada em preceitos éticos e aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná - CEUA/FEMPAR número 1582/2017, bem como com as Declarações de Helsinque e com as Normas Internacionais de Proteção aos Animais.

Quarenta ratos Wistar machos de 5 semanas de idade, com peso médio de 250 g, foram utilizados na pesquisa. Foram mantidos no biotério em gaiolas de propileno de 47x34x18 cm, forradas com maravalha, em fotoperíodo controlado de 12 h claro/escuro (luz das 7-19 h) e temperatura ambiente de 22±2 °C. Após 3 semanas de aclimação com água e ração adequada *ad libitum*, os ratos foram identificados e separados nas gaiolas de acordo com o grupo experimental.

### Grupos experimentais

Os ratos foram distribuídos em 4 grupos com 10 animais cada, denominados: 1) CO, grupo controle alimentado com ração e água por 13 semanas; 2) CO+OC, grupo alimentado com ração e água, além de administração intragástrica de óleo de coco por 13 semanas; 3) TAA, grupo alimentado com ração e água com tioacetamida por 13 semanas; 4) TAA+OC, grupo alimentado com ração e água com tioacetamida, além de administração intragástrica de óleo de coco por 13 semanas.

### **Modelo experimental de cirrose hepática**

A tioacetamida (Sigma-Aldrich) foi administrada na água de bebida dos animais do grupo TAA e TAA + OC por período de 13 semanas, com base no protocolo de Al- Bader et al.<sup>(12)</sup>. A concentração inicial foi de 0,06% por 17 dias. No 18º, a concentração foi reduzida para 0,03% e mantida por 5 semanas. Depois disso, as doses mais altas e mais baixas foram trocadas por 1 semana cada. No 67º dia, a dose de 0,06% foi reiniciada e mantida até o final do experimento. Cuidados foram tomados no manuseio do TAA, uso de máscara, luvas, avental e óculos para evitar contato com a pele e inalação.

Para controle, os animais foram pesados semanalmente e observadas suas características físicas e comportamentais.

Os animais dos grupos CO + OC e TAA + OC receberam 0,5 ml de óleo de coco extra virgem líquido por 200 g de peso corporal por gavagem intragástrica e os animais dos grupos CO e TAA receberam o veículo (água) na mesma quantidade, durante todos os dias do experimento.

Após 13 semanas, os animais foram submetidos a 12 h de jejum e anestesiados com aplicação intraperitoneal de cloridrato de cetamina na dose de 90 mg/kg de peso corporal e cloridrato de xilasina na dose de 10 mg/kg de peso corporal.

Em seguida, o sangue foi coletado em tubos de vidro heparinizado, mantidos em gelo para posterior análise da integridade hepática e perfil lipídico.

Posteriormente, após tricotomia e desinfecção da região abdominal, o fígado foi removido e os animais foram eutanasiados por exsanguinação enquanto anestesiados. A dissecação do cérebro para coleta da formação hipocampal foi realizada após a decapitação e o gastrocnêmio foi removido após a dissecação da perna direita. O fígado e o gastrocnêmio foram então pesados em balança de precisão e medidos com

paquímetro para posterior avaliação. O índice hepatossomático (IHS) foi calculado dividindo o peso do fígado pelo peso do animal e multiplicando o resultado por 100, e a mesma relação foi utilizada para analisar a proporção de gastrocnêmio.

### **Testes de integridade hepática, perfil lipídico e avaliação histológica**

A partir das amostras de sangue, foram determinadas as dosagens de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), além da avaliação do colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos.

Para processamento histológico, os órgãos removidos foram fixados em formaldeído a 10% dissolvido em PBS 0,1M e pH 7,4. Em seguida, eles foram clivados para processamento segundo técnica histológica convencional, utilizando-se fragmentos do lobo esquerdo do fígado, cortes longitudinais de tecido muscular e formação hipocampal. As peças foram coradas com H&E para análise das alterações histopatológicas em microscopia de luz, sem que a identificação de cada lâmina fosse conhecida para garantir resultados imparciais.

### **Análise estatística**

As informações obtidas foram tabuladas de acordo com o protocolo de dados e, em seguida, expressas por meio de gráficos e tabelas. Para a descrição das variáveis qualitativas, foram consideradas frequências e percentuais e para a descrição das variáveis quantitativas, considerou-se a estatística de média  $\pm$  desvio-padrão, segundo a normalidade. O teste utilizado para verificar a normalidade dos dados quantitativos foi o teste de Shapiro-Wilk. Para as variáveis

que tiveram distribuição normal, foi realizado o teste ANOVA One-Way seguido do teste de Tukey, caso fosse obtido resultado significativo. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn se resultado significativo.  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo e as análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism versão 7.04.

## RESULTADOS

### Observações preliminares

Durante a indução da cirrose por TAA os animais foram observados. A partir da segunda semana foi possível notar perda de peso e coloração amarela na pelagem dos ratos dos grupos TAA e TAA + OC. Eles também apresentaram comportamento agressivo e irritabilidade, em contraste com os ratos dos grupos CO e CO + OC, o que permitiu manipulação mais fácil.

A partir da terceira semana de indução cirrótica, vários animais dos grupos TAA e TAA + OC apresentaram corrimento avermelhado ao redor dos olhos e nariz associado à apatia e pouca responsividade à manipulação.

Um animal do grupo TAA + OC e um do grupo CO + OC apresentaram tumoração na região cervical, evoluindo para drenagem de pus. A mortalidade total durante o experimento foi de 2,5% (1 animal do grupo TAA + OC no 22º dia do experimento, representando 10% dentro deste grupo e 5% entre os 20 animais submetidos ao TAA).

### Peso corporal

Os animais foram pesados semanalmente durante o experimento para verificar as condições de indução cirrótica. A partir da 3ª semana e até o final do experimento, notou-se que o peso médio do grupo TAA + OC foi superior aos do grupo TAA, que não receberam suplementação com óleo de coco. Ainda nesses grupos, os picos de ganho de peso na 3ª e 10ª semanas correspondiam à redução da dose de TAA. Ao comparar

o peso médio entre os 4 grupos ao longo de todo o período do experimento, foi possível observar valor maior do grupo CO (média de 339,5g) em relação aos demais. O peso médio dos animais do grupo TAA + OC (250,7 g) também foi maior que o grupo TAA

(241,1 g,  $p < 0,0001$ ). Ao comparar os grupos 2 a 2, observou-se significância estatística entre as pesagens dos grupos CO e TAA, CO e TAA + OC, CO + OC e TAA e CO + OC e TAA + OC ( $p < 0,0001$ ).

Usando apenas a última pesagem antes da eutanásia como parâmetro de comparação, resultados semelhantes foram obtidos. Da mesma forma, o grupo TAA apresentou menor peso médio (238,8 g) em relação ao grupo TAA + OC (243,1 g). Em relação aos grupos controle, os animais que receberam suplementação com óleo de coco apresentaram peso médio inferior (373 g) quando comparados aos do grupo CO (384,5 g,  $p = 0,001$ ).

### Macroscopia

Os fígados dos grupos CO e CO + OC apresentaram coloração e textura normais, sem alterações macroscópicas.

Em relação aos grupos TAA e TAA + OC, notou-se que os fígados estavam

atrofiados e apresentavam coloração amarelada. Micronódulos, macronódulos e lesões hemorrágicas também foram encontrados.

Em relação aos músculos gastrocnêmios, não foi possível notar alterações macroscópicas além das medidas de comprimento e largura.

### **Peso do fígado e índice hepatossomático**

Ao analisar o valor absoluto do peso do fígado obtido na eutanásia, observou-se maior média no grupo TAA (12,04 g) em relação aos grupos TAA + OC (11,57 g), CO (9,69 g) e CO + OC (9,36 g,  $p=0,003$ ).

Comparando os resultados grupo a grupo, obteve-se significância estatística entre os grupos CO e TAA, CO e TAA + OC, CO + OC e TAA e CO + OC e TAA + OC. A relação do peso absoluto do fígado e corporal ao final do experimento pelo índice hepatossomático (IHS) demonstrou resultados semelhantes entre ambos. O grupo TAA obteve a maior média (5,1%) se comparado a todos os outros grupos, incluindo o TAA + OC (4,85%,  $p<0,0001$ ).

Analisando a correlação entre cada um dos grupos, foi encontrada significância estatística entre todas as comparações com exceção dos grupos CO e CO + OC entre si ( $p>0,9999$ ) e grupos TAA e TAA + OC ( $p>0,9999$ ).

### **Medidas e proporção do gastrocnêmio**

Em relação ao gastrocnêmio, as maiores médias foram obtidas nos grupos CO + OC (2,12 g) e CO (2,11 g,  $p<0,0001$ ). Relacionando os grupos separadamente, observou-se resultado estatisticamente significativo em todas as correlações, exceto entre os grupos controle ( $p=0,9999$ ) e entre os grupos cirróticos ( $p=0,9912$ ). Ao analisar a proporção entre o peso do músculo gastrocnêmio e o peso corporal do animal, não foi encontrada significância estatística ( $p=0,3091$ ).

Da mesma forma, utilizando o comprimento do gastrocnêmio como parâmetro, também não houve resultado estatisticamente significativo ( $p=0,2257$ ). Por outro lado, ao comparar a medida da largura do músculo gastrocnêmio, obteve-se média maior entre os animais do grupo CO (14 mm) se comparado a todos os demais ( $p=0,0119$ ). Comparando os grupos 2 a 2, houve significância estatística apenas entre os grupos CO e TAA ( $p=0,0256$ ).

### **Achados histopatológicos**

Para análise histopatológica, as amostras de tecido foram visualizadas em aumentos de 40, 100 e 400x de acordo com os dados de cada lâmina. Os achados histopatológicos foram analisados estatisticamente de acordo com a presença e intensidade das alterações observadas em cada órgão de cada grupo de animais.

Na análise histológica do fígado foram analisados 5 parâmetros: presença de septos fibróticos, presença de nódulos regenerativos, infiltrado inflamatório, proliferação das vias biliares e necrose hepatocelular. Cada critério foi classificado como ausente, discreto, moderado e acentuado.

Em relação à presença de septos fibróticos, 50% das amostras do grupo TAA apresentaram alterações acentuadas, além de moderadas 20%. Já no grupo TAA + OC, 44,44% também houve presença marcante de septos, seguidos de 33,33% discretos e 22,22% moderados.

Ao analisar a presença de nódulos regenerativos, 30% das amostras do grupo TAA foram classificadas como alterações acentuadas, assim como 30% com

alterações moderadas e 10% com nódulos discretos. Em relação ao grupo TAA + OC, 44,44% dos fígados apresentavam marcada presença de nódulos regenerativos, 11,11% moderados e 44,44% discretos ou ausentes.

O infiltrado inflamatório foi alteração encontrada em 100% das amostras nos grupos TAA e TAA + OC. Avaliando a intensidade dessa alteração, 7 animais do grupo TAA (70%) apresentaram infiltração leve, seguida de 20% moderada e 10% acentuada. Quanto ao grupo TAA + OC, 55,56% das amostras foram classificadas como infiltrado leve, 33,33% moderado e 11,11% acentuado.

Utilizando a proliferação do ducto biliar como parâmetro, a alteração esteve ausente em 30% das amostras do grupo TAA, enquanto no grupo TAA + OC, ela não foi encontrada em mais da metade das amostras (55,56%). Ainda comparando os dois grupos, a proliferação ductal foi acentuada em 30% dos fígados analisados no grupo TAA, enquanto a mesma intensidade ocorreu em 22,22% das amostras no grupo TAA + OC.

Quanto à avaliação da necrose hepatocelular, os resultados foram semelhantes entre os grupos cirróticos. A necrose discreta foi encontrada em 60% dos animais do grupo TAA e em 66,67% do grupo TAA + OC.

Em relação ao músculo gastrocnêmio, foram utilizados os seguintes critérios: atrofia das fibras musculares, proliferação de tecido conjuntivo e infiltração por tecido adiposo. Novamente as alterações foram classificadas como ausentes, discretas, moderadas e acentuadas.

Os resultados quanto à atrofia das fibras musculares, observadas à microscopia, ocorreram no grupo TAA discretamente 60%, moderadamente 20% e acentuadamente 10%. Em relação ao grupo TAA + OC, a alteração foi ausente em 33,33% das amostras, discreta em 55,56% e acentuada em 11,11%.

Em relação à proliferação de tecido conjuntivo entre as fibras musculares, apenas 1 amostra (10% do grupo TAA) apresentou discreta alteração. A infiltração de tecido adiposo no músculo não foi encontrada em nenhuma amostra.

Na análise do hipocampo, o parâmetro utilizado como sugestivo de encefalopatia hepática foi o inchaço dos astrócitos. Não foi observado inchaço em 60% dos animais do grupo CO, CO + OC e TAA + OC. No grupo CO + OC, a alteração foi discreta em 60% das amostras.

### **Análises clínicas**

A análise laboratorial inclui resultados de ALT, AST, colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos. O grupo TAA teve média de 65,38 UI/L, enquanto o TAA + OC média de 51,6 UI/L. Os resultados, porém, não foram estatisticamente significantes ( $p=0,7507$ ). Em relação aos níveis de AST, o grupo TAA teve média de 182,8 UI/L enquanto o TAA + OC média de 127,4 UI/L, embora não tenha havido valor de  $p$  estatisticamente significativo ( $p=0,0940$ ).

Em relação aos resultados de colesterol, observou-se que os grupos cirróticos tiveram valor de colesterol total menor em relação aos controles. O grupo TAA apresentou valor médio de 100,2 mg/dL e o grupo TAA + OC média de 94,7 mg/dL ( $p=0,0959$ ).

Em relação ao HDL, o grupo TAA teve valor médio de 56,21 mg/dL, enquanto no grupo TAA + OC o HDL teve média foi de 46,98 mg/dL ( $p=0,1069$ ).

Em relação aos resultados da medida de LDL, o grupo TAA + OC apresentou a maior média com 38,28mg/dL, enquanto que o grupo TAA teve resultado médio de 33,02 mg/dL. O valor de p, no entanto, não foi significativo ( $p=0,0531$ ).

Em relação ao VLDL, houve significância estatística ( $p=0,0066$ ) ao comparar os resultados entre os 4 grupos experimentais. A média foi maior entre os grupos controle (CO com média de 20,4 mg/dL e CO+OC com média de 18,6 mg/dL) em relação aos grupos cirróticos (TAA média de 10,8 mg/dL e TAA+OC média de 9,4 mg/dL).

Ao comparar os grupos separadamente, observou-se que foi encontrado resultado significativo apenas na correlação dos dados dos grupos CO e TAA + OC ( $p=0,0293$ ).

Em relação aos valores séricos de triglicérides, a média no grupo TAA foi de 54,64 mg/dL enquanto que no grupo TAA + OC foi de 47,04 mg/dL. Os valores encontrados nos grupos-controle foram maiores, com média de 101,5 mg/dL nas amostras do grupo CO e 92,12 mg/dL no CO+OC ( $p=0,0045$ ).

Ao realizar o teste de comparações múltiplas, observou-se que o resultado significativo encontrado sobre os valores de triglicérides foi a correlação entre os grupos CO e TAA, CO e TAA + OC, além de CO + OC e TAA + OC.

## DISCUSSÃO

A desnutrição em pacientes cirróticos varia de 50-90%, o que é preocupante devido à sua associação com aumento da mortalidade. A desnutrição está associada ao maior número de complicações, como síndrome hepatorenal, encefalopatia e pior função hepática. Entre os pacientes desnutridos, 20% tiveram taxa de mortalidade de 1 ano<sup>(13)</sup>. Não avaliaram-se estatisticamente as taxas de mortalidade

Existem vários fatores que contribuem para a má absorção de nutrientes, especialmente gorduras e proteínas. Os ácidos biliares são produzidos pelo fígado com a função de absorção de ácidos graxos no sistema linfático. A deficiência de ácidos biliares é comum em pacientes cirróticos, levando à menor capacidade de produção de bile<sup>(13)</sup>.

Nesse contexto, a terapia nutricional é de grande potencial na cirrose<sup>(5)</sup>. As recomendações quanto à intervenção nutricional visam oferecer substratos como proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas e minerais. A identificação precoce e correção da desnutrição em pacientes com doença hepática leva à melhor evolução da doença e previne complicações da cirrose.<sup>(14)</sup>

O óleo de coco é fonte de ácido láurico e triglicérides de cadeia média (TCM), contendo 90% de gorduras saturadas.<sup>(15)</sup> Eles foram citados na literatura como sugestão no tratamento complementar da cirrose, pois são rapidamente absorvidos na circulação portal e capazes de promover balanço energético e redução da esteatorreia.<sup>(11)</sup>

Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo de indução de cirrose para avaliar a suplementação de óleo de coco nos parâmetros macroscópicos, microscópicos e laboratoriais da cirrose hepática e suas complicações.

Não foram encontrados estudos na literatura analisando diretamente o efeito do óleo de coco nos parâmetros histológicos e laboratoriais da cirrose. Dada a grande prevalência e importância da cirrose no contexto atual, muitos modelos

experimentais de indução e formas de prevenção e tratamento têm sido desenvolvidos e descritos na literatura.<sup>(5)</sup> O modelo utilizado neste estudo foi através da administração de tioacetamida para promover cirrose hepática semelhante ao envolvimento em humanos, com baixa mortalidade em relação à ligadura do ducto biliar e com mais parâmetros histológicos evidentes do que a indução com tetracloreto de carbono. Possui segurança de uso e maior reprodutibilidade. A administração oral na água de bebida é método não invasivo e prático para experimentação em grande número de animais<sup>(5)</sup>, embora haja dificuldade em controlar a dosagem do fármaco administrado pelo animal, devido à fragilidade do próprio modelo.<sup>(9)</sup>

O mecanismo de ação do TAA na lesão hepática é baseado na ativação metabólica após o metabolismo pela isoenzima CYP2E1, resultando em produto altamente reativo (dióxido de S-tioacetamida). Este produto, derivado da biotransformação, faz com que o TAA tenha atividade citotóxica, resultando em redução da atividade antioxidante no fígado e aumento da peroxidação de lipoproteínas. Em seguida, estabelece-se o estresse oxidativo, culminando em necrose e fibrose celular

(16,17)

A dose inicial de TAA utilizada foi de 0,06% na água de beber, que foi então reduzida para 0,03% por 5 semanas, com as 2 doses intercaladas, e a maior mantida nas últimas 3 semanas do experimento. Optou-se por reduzir a dose inicialmente proposta devido à grande perda de peso e fragilidade dos animais submetidos ao TAA. No entanto, observou-se ganho ponderal contínuo com a redução da dose, sendo a de 0,06% reintroduzida até o final do experimento.

O protocolo utilizado é semelhante ao descrito por Al-Bader et al.<sup>(12)</sup>, através da administração oral de TAA 0,05% por 12 semanas, mostrando aumento dos marcadores de função hepática e diminuição do peso dos animais. Outro estudo utilizou a dose de 0,03% em água por 12 semanas, sendo eficaz na indução de cirrose à macro e microscopia em 90% dos animais, sem mortalidade.<sup>(18)</sup> A literatura sugere, no entanto, que é obtida maior eficiência com o ajuste da dose de acordo com o peso individual de cada animal, minimizando a mortalidade e proporcionando cirrose homogênea.<sup>(5)</sup>

Na observação dos sinais clínicos nos animais durante a indução da cirrose, observou-se corrimento avermelhado ao redor dos olhos e focinho nos grupos TAA e TAA + OC. Essa alteração é compatível com secreção porfirinêmica da glândula de Harder.<sup>(17)</sup> A manifestação da porfirina é denominada cromodacrioreia, ocorrendo em situações de estresse por doenças crônicas.<sup>(19)</sup> Além disso, houve amarelecimento da pelagem dos animais submetidos à administração de TAA - incluindo os que receberam óleo de coco - descrito na literatura como consequência do acometimento do sistema biliar.<sup>(19)</sup> A taxa de mortalidade encontrada foi consistente com outros experimentos descritos na literatura.<sup>(17,19,20)</sup>

As mudanças de peso registradas durante o experimento foram compatíveis com as da dose de TAA. Nas duas primeiras semanas de exposição à dose de TAA 0,06%, foi observada intensa perda de peso nos ratos dos grupos TAA e TAA + OC. Após a redução nas 5 semanas seguintes, os animais passaram a ganhar peso de forma semelhante aos constituintes do grupo controle. Da 7ª à 8ª semana, com aumento da concentração de TAA, houve discreta perda de peso, seguida de recuperação da 8ª à 9ª semana com diminuição da dose. Na 11ª semana, foi observada intensa perda de peso com a reintrodução de TAA 0,06%, sem grandes

variações de peso até o final do experimento com a manutenção da dose. A dose escolhida de ingestão de óleo de coco, gorduras saturadas, foi limitada a menos de 10% das calorias diárias aproximadamente.

(21)

Em relação ao peso corporal ao final do experimento, a diferença entre o grupo CO ( $384,5 \pm 10,14$ ) e o TAA ( $238,8 \pm 10,78$ ) foi significativa em 37%. O resultado encontrado é compatível com a literatura, uma diferença de aproximadamente 31% descrita entre um grupo controle e um cirrótico devido à exposição ao TAA.<sup>(14)</sup> Em relação à comparação entre os grupos TAA e TAA + OC, o peso final médio foi maior em o grupo suplementado com óleo de coco ( $243,1 \pm 15,61$ ) do que nos animais do grupo TAA ( $238,8 \pm 10,78$ ), mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. A literatura defende que o apetite dos animais é diminuído quando o dano hepático se instala excessivamente, limitando a ingestão de água com TAA. Isso pode estar associado a baixa mortalidade e perda de peso mais lenta após certo período de exposição ao TAA.<sup>(18)</sup>

O peso final médio entre os grupos CO e CO + OC foi semelhante ( $339,5$  e  $336,2$ , respectivamente) e não houve diferença significativa. Esse resultado coincide com o estudo de Santana et al. (2016) e Schumacher et al. (2016), que concluíram que o óleo

de coco não está relacionado ao ganho de peso.<sup>(22,23)</sup> Este último estudo, porém, analisou a gordura peritoneal e descreveu redução de 25,6% com o uso do óleo de coco. A macroscopia encontrada em fígados cirróticos está de acordo com a literatura, demonstrando modularidades, em contraste com a superfície lisa dos fígados dos animais controle.<sup>(24)</sup> Em estudo com administração intraperitoneal de TAA também foram observados congestão, micro e macronódulos.<sup>(25)</sup> As lesões hemorrágicas nesta amostra também foram observadas no estudo de Lima TC<sup>(19)</sup> que correlaciona esse achado com o aumento da pressão nos capilares hepáticos, em decorrência da hipertensão. As características macroscópicas da cirrose também foram encontradas, em intensidade semelhante, no grupo cirrótico que recebeu suplementação com óleo de coco.

Quanto às medidas hepáticas e relação hepatossomática, no presente estudo houve diferença significativa entre os grupos controle e cirrótico, mas não entre TAA e TAA + OC. O aumento da relação hepatossomática na cirrose provavelmente está relacionado ao acúmulo de colágeno, aumentando o peso do fígado.<sup>(26)</sup>

Os achados histológicos das amostras de fígado mostraram presença intensa de septos fibróticos, encontrados em 100% das amostras do grupo TAA + OC (44,44% acentuado) e em 70% do grupo TAA (50% acentuado). Nódulos regenerativos também foram mais encontrados no grupo TAA + OC (77,77%, sendo 44,44% acentuados) em relação ao grupo TAA (70%, sendo 30% acentuados). Infiltrado inflamatório foi registrado em todas as amostras de ambos os grupos e a necrose hepatocelular teve proporções semelhantes (achado discreto em 60% do grupo TAA e 66,67% do grupo TAA + OC). A proliferação de vias biliares foi o único critério com menor prevalência no grupo cirrótico com óleo de coco (presente em 44,44%, sendo metade discreta e metade acentuada). No grupo TAA, 70% das amostras apresentaram proliferação ductular, sendo acentuada em 30%, moderada em 10% e discreta em 30%. Assim, a histologia entre os grupos TAA e TAA + OC foi muito semelhante, com maior frequência de alterações no grupo suplementado com óleo de coco - exceto pela proliferação de ductos biliares.

As alterações histopatológicas são semelhantes às encontradas no estudo de Guerra et al. (2009)<sup>(27)</sup>, através da administração intraperitoneal de TAA: perda da arquitetura do parênquima hepático, com formação de septos fibróticos delimitando nódulos regenerativos, associada à necrose e proliferação de ductos biliares. O estudo de Silva (2011)<sup>(17)</sup> realizado com indução de cirrose por TAA e administração de fatores hepatotróficos, demonstrou que o tratamento não alterou a atividade histológica, o estadiamento da fibrose e a proliferação das vias biliares. Os fatores hepatotróficos, no entanto, reduziram a deposição de colágeno e a ativação das células estreladas.

De acordo com a literatura, as aminotransferases AST e ALT são confiáveis indicadores de alterações nas células hepáticas, presença de fibrose e lesão tecidual.

<sup>(16)</sup> Um estudo com administração de TAA 0,03% por 12 semanas obteve valores significativamente maiores ( $p < 0,001$ ) de enzimas hepáticas no grupo cirrótico (AST de 271,63 e ALT de 105,38) se comparado ao grupo controle (AST de 158,88 e ALT de 62,88).<sup>(28)</sup>

No presente estudo, entretanto, não foi encontrado aumento das enzimas hepáticas nos animais dos grupos TAA em relação aos controles, mesmo com cirrose estabelecida macro e microscopicamente. O óleo de coco também não foi associado à diminuição significativa nos marcadores de lesão hepática. Essa condição coincide com outros estudos encontrados na literatura, onde a cirrose foi instalada com sucesso, apresentando as características morfológicas típicas da doença, mas sem alterações significativas nas provas de função hepática.<sup>(18,29)</sup> Pode ser possível que o aumento das transaminases seja marcador relevante durante a fase aguda da lesão hepática, mas não durante os estágios avançados da cirrose.<sup>(29)</sup>

Em geral, os lipídios e lipoproteínas plasmáticos tendem a diminuir com a doença hepática parenquimatosa, com redução progressiva do colesterol e suas frações de acordo com a gravidade da doença. Os níveis de triglicerídeos estão mais associados à cirrose de origem alcoólica.<sup>(30)</sup> O estudo de Chen et al. (2012)<sup>(31)</sup> com indução de cirrose por TAA intraperitoneal encontrou redução nos níveis de colesterol total e triglicerídeos no grupo cirrótico (84,2 mg/dL e 57,4 mg/dL, respectivamente) em relação ao controle (167,1 mg/dL e 83,2 mg/dL).

Essa diferença no perfil lipídico, entretanto, não foi observada no presente estudo em relação ao colesterol total e suas frações (HDL, LDL e VLDL) entre os grupos CO e TAA. A suplementação com óleo de coco também não teve efeito significativo. Em relação à dosagem de triglicerídeos, houve diferença significativa entre o grupo CO ( $101,5 \pm 15,5$ ) com o TAA ( $54,64 \pm 5,24$ ) e TAA + OC ( $47,04 \pm 3,89$ ) grupos. Também

houve valor significativo ao comparar os valores de triglicerídeos no grupo CO + OC ( $92,12 \pm 12,98$ ) com TAA + OC. Mas, novamente, ao relacionar o efeito do óleo de coco entre os dois grupos cirróticos, não foi observada diferença estatística.

O efeito isolado do óleo de coco entre os grupos controle não cirróticos também não foi estatisticamente significativo no presente estudo. No entanto, a maioria dos ensaios clínicos randomizados analisados sugere um efeito protetor cardiovascular. mostram que a ingestão de óleo de coco, quando comparado com outros óleos vegetais, aumenta o HDL e diminui os triglicerídeos, embora este último achado seja questionável.

<sup>(21,32)</sup>

Considerada uma complicação da cirrose hepática, a caquexia é distúrbio

metabólico associado à perda de massa celular, rápida degradação de proteínas e diminuição da ingestão alimentar e atividade física. Esta síndrome está presente em diversas doenças crônicas, sendo importante fator de mau prognóstico<sup>(33)</sup>. A diminuição da massa muscular é observada em aproximadamente 50% dos pacientes com cirrose, sendo preditor de mortalidade nesses pacientes.<sup>(34)</sup>

A patogênese da caquexia na doença hepática está relacionada ao desequilíbrio entre gasto energético e ingestão. O hipermetabolismo é identificado pelo aumento do gasto energético em repouso em pacientes cirróticos e está associado às citocinas pró- inflamatórias. A ingestão nutricional é prejudicada naqueles com doença hepática devido ao apetite desregulado. A literatura descreve que a intervenção nutricional melhora a composição corporal, função hepática e muscular e mortalidade.<sup>(8)</sup>

No presente estudo, a mensuração do peso do gastrocnêmio teve resultado significativo na comparação dos grupos controle com os cirróticos, mas não na avaliação da suplementação com óleo de coco no grupo TAA. As medidas de largura, comprimento e a relação entre peso muscular e peso total não resultaram em diferenças estatisticamente significativas na maioria dos grupos. Em relação à histologia das amostras de gastrocnêmios, a atrofia das fibras foi encontrada em 90% dos animais do grupo TAA e com menor frequência (66,67%) nos ratos do grupo TAA + OC.

A encefalopatia hepática é seqüela da doença hepática crônica com significativa morbimortalidade, estando relacionada ao mau prognóstico e comprometimento da qualidade de vida. A etiopatogenia da encefalopatia é multifatorial, mas o aumento da amônia circulante e o ciclo da ureia desempenham papel crucial. Os compostos nitrogenados são excretados pela microbiota intestinal e transportados para o fígado de acordo com o ciclo da ureia para eliminação na urina. Na doença hepática avançada, no entanto, a amônia desvia o fígado devido a alterações portal e se acumula na circulação sistêmica. Ao cruzar a barreira cerebral, ocorre o metabolismo pelos astrócitos e a produção de glutamina.<sup>(35)</sup>

O manejo nutricional da encefalopatia hepática está relacionado ao consumo adequado de proteínas, com aminoácidos de cadeia ramificada, fibras e vegetais, além de dissacarídeos não absorvíveis e probióticos.<sup>(35)</sup>

No presente estudo, o objetivo foi analisar a encefalopatia hepática através da histopatologia do hipocampo. A literatura descreve que o acúmulo de glutamina nos astrócitos leva ao edema progressivo e citotóxico, resultando em edema celular.<sup>(36)</sup> Os astrócitos tornam-se maiores, com núcleos volumosos e vesiculares chamados astrócitos tipo II de Alzheimer, encontrados na substância cinzenta.<sup>(37)</sup>

Essa alteração de astrócitos, no entanto, foi de difícil caracterização nas amostras de hipocampo e não foi encontrada em nenhum grupo. Argumenta-se que a análise histopatológica das alterações nos astrócitos seria mais bem caracterizada em amostras de córtex e núcleos na base. Outra hipótese é que a indução de cirrose pelo TAA oral teria efeitos menos tóxicos em órgãos extra-hepáticos como rins e cérebro, pois é transportado diretamente para o fígado pela veia porta após entrar na circulação sistêmica. A administração de hepatotoxinas por via subcutânea ou inalatória pode, mais provavelmente, causar dados extra-hepáticos mais evidentes.<sup>(18)</sup>

## CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que não foi encontrado efeito protetor do óleo de coco como suplemento no tratamento da cirrose hepática ao analisarem-se marcadores de integridade hepática, perfil lipídico e histopatologia, tanto hepática como muscular e nervosa, embora tenha havido tendência para os parâmetros de melhoria.

## REFERÊNCIAS

- 1 Moon AM, Singal AG, Tapper EB. Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2020 Nov;18(12):2650–66. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542356519308493>
- 2 Roehlen N, Crouchet E, Baumen TE. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and. *Cells*. 2020. 1–43 p.
- 3 Berumen J, Baglieri J, Kisseleva T, Mekeel K. Liver fibrosis: Pathophysiology and clinical implications. *WileyInterdiscip Rev Syst Biol Med*. 2021;13(1):1–17.
- 4 Sherlock S.; Dooley J. *Doenças do fígado e do sistema biliar*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
- 5 Friedman SL. Liver fibrosis from bench to bedside. *Journal of Hepatology*, v. 38,n. 1, p. 38-53, 2003.
- 6 Teck YL, Chon KL, Salto-Tellez M, Chung MCM. A proteomic analysis of thioacetamide-induced hepatotoxicity and cirrhosis in rat livers. *Proteomics*. 2004;4(12):3960–74.
- 7 Passos CC; Ferreira AO; Blazquez FJH; Guerra RR. Modelos experimentais para indução de cirrose hepática em animais: Revisão de literatura. *Biotemas*, v. 23, n. 2, p. 183-190, 2010.
- 8 Plauth M; Schutz E. Cachexia in liver cirrhosis. *International Journal of Cardiology*, v. 85, n. 1, p. 83-87, 2002.
- 9 Cardoso DA; Moreira AS; Oliveira GM; Luiz RR. A coconut extra virgin oil-rich diet increases HDL cholesterol and decreases waist circumference and body mass in coronary artery disease patients. *Nutr Hosp*, v. 32, n. 5, p. 2144-2152, 2015.
- 10 Deen A, Visvanathan R, Wickramarachchi D, Marikkar N, Nammi S, Jayawardana BC, et al. Chemical composition and health benefits of coconut oil: an overview. *J Sci Food Agric*. 2021;101(6):2182–93.
- 11 Bavdekar A; Bhav S; Pandit A. Nutrition management in chronic liver disease. *Indian journal of pediatrics*, v. 69,n. 5, p. 427-431, 2002.
- 12 Al-Bader A; Mathew TC; Khourshed M; Asfar S; Al-Sayer H; Dashti HM. Thiocetamide toxicity and the spleen: histological and biochemical analysis. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, v. 29, n. 1, p. 3-8, 2000.
- 13 Juakiem, W; Torres DM; Harrison SA. Nutrition in cirrhosis and chronic liver disease. *Clin Liver Dis.*, v. 18, n. 1, p. 179-190, 2014.
- 14 Nishikawa H; Osaki Y. Liver Cirrhosis: Evaluation, Nutritional Status and Prognosis. *Mediators Inflamm*, v. 2015,n. 872152, p. 1-9, 2015.
- 15 Dauqan E; Sani HA; Abdullah A; Kasim Z M. Effect of four different vegetable oils (red palm olein, palm olein, corn oil, coconut oil) on lipid profile in rat. *Food and Nutrition Sciences*, v. 2, p. 253-258, 2011.
- 16 Delire B; Starkel P; Leclercq I. Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development. *J Clin Transl Hepatol*, v. 3, n.1, p. 53-66, 2015.
- 17 Silva EA. Avaliação morfológica e molecular pós-tratamento com os fatores hepatotróficos, da cirrose hepática induzida em ratas pela tioacetamida: análise a curto e longo prazo. 2011. 151 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- 18 Li X; Benjamin IS; Alexander B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in therat with no mortality. *Journal of Hepatology*, v. 36, p. 488-493, 2002.
- 19 Lima TC. Cirrose hepática induzida por tioacetamida: estudo do modelo por injeção intraperitoneal a longo prazo em ratas Wistar. 2008. 139 p. Tese (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- 20 Guerra RR. Efeito do tratamento com fatores hepatotróficos em ratas (Wistar) induzidas experimentalmente à cirrose por Tioacetamida. 2006. 152 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- 21 Santos HO, Howell S, Earnest CP, Teixeira FJ. Coconut oil intake and its effects on the cardiometabolic profile – A structured literature review. *Prog Cardiovasc Dis* [Internet]. 2019;62(5):436–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2019.11.001>
- 22 Santana LF; Cordeiro KW; Soares FLP; Freitas KC. Coconut oil increases HDL-c and decreases triglycerides in Wistar rats. *Acta Scientiarum, Health Sciences*, v. 38, n. 2, p. 185-190, 2016.
- 23 Sschumacher BO; Preuss EM; Vargas CG; Helbig E. Coconut oil on biochemical and morphological parameters

- in rats submitted to normolipidic and hyperlipidic diets. *Ciência Rural*, v. 46, n. 10, p 1818-1823, 2016.
- 24 David P; Alexandre E.; Chenard-Neu MP. Failure of liver cirrhosis induction by thioacetamide in Nagase analbuminaemic rats. *Laboratory Animals*, v. 36, p. 158-164, 2002.
- 25 Salama SM.; Abdulla MA; Alrashid A; Ismail S; Alkiyumi SS; Goldbabapour S. Hepatoprotective effect of ethanolic extract of *Curcuma longa* on thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 13, n.56, p. 1-17, 2013.
- 26 Vercelino, R. Potencial antioxidante da NAC e da SNAC sobre estresse oxidativo e complicações da cirrose biliar secundária. 2009. 125 p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Faculdade de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grandedo Sul, Porto Alegre, 2009.
- 27 Guerra RR; Trotta MR; Parra OM; Avanzo JL; Bateman TPA; Aloia MLZ; et. al. Modulation of extracellular by nutritional hepatotrophic factors in thioacetamide- induces liver cirrhosis in the rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 42, n. 11, p. 1027-1034, 2009.
- 28 Czechowska G; Celinski K; Korolczuk A; Wojcicka G; Dudka J; Reiter R J. Protective effects of melatonina against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 66, n. 4, p. 567-579, 2015.
- 29 Cruz A; Padilo FJ; Torres E; Navarrete CM; Muñoz-Castañeda JR; Cabarello FJ; et. al. Melatonin prevents experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats. *Journal of pineal research*, v. 39, n. 2, p. 143-150, 2005.
- 30 Chrostek L; Supronowicz L; Panasiuk A; Cylwik B; Gruszewska E; Flisiak R. The effect of the severity of liver cirrhosis on the level of lipids and lipoproteins. *Clinical and Experimental Medicine*, v. 14, n. 4, p. 417-421, 2014.
- 31 Chen I; Chen YC; Chou CH; Chuang RF; Sheen LY; Chiu CH. Hepatoprotection of silymarin against thioacetamide-induced chronic liver fibrosis. *Journal of Science of Food and Agriculture*, v. 92, p. 1441-1447, 2012.
- 32 Nevin KG, Rajamohan T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. *Clin Biochem*. 2004;37(9):830–5.
- 33 Bracht L. Aspectos morfológicos e funcionais de macrófagos peritoneais de animais portadores de tumor de Walker. 2006. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- 34 Ishizu Y; Ishigami M; Kuzuya T; Honda T; Hayashi K; Ishikawa T; et al. Low skeletal muscle mass predicts early mortality in cirrhotic patients with acute variceal bleeding. *Nutrition*, v. 42, p. 87-91, 2017.
- 35 Suraweera D; Sundaram V; Saab S. Evaluation and Management of Hepatic Encephalopathy: Current Status and Future Directions. *Gut Liver*, v. 10, n. 4, p. 509- 519, 2016.
- 36 Sofroniew M; Vinters H. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, v. 119, p. 7-35, 2010.
- 37 Wouters ATB. Caracterização microscópica das alterações encefálicas relacionadas a hepatopatias tóxicas em bovinos. 2011. 47 p. Tese (Doutorado em Patologia Veterinária) – Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

## Este preprint foi submetido sob as seguintes condições:

- Os autores declaram que estão cientes que são os únicos responsáveis pelo conteúdo do preprint e que o depósito no SciELO Preprints não significa nenhum compromisso de parte do SciELO, exceto sua preservação e disseminação.
- Os autores declaram que os necessários Termos de Consentimento Livre e Esclarecido de participantes ou pacientes na pesquisa foram obtidos e estão descritos no manuscrito, quando aplicável.
- Os autores declaram que a elaboração do manuscrito seguiu as normas éticas de comunicação científica.
- Os autores declaram que os dados, aplicativos e outros conteúdos subjacentes ao manuscrito estão referenciados.
- O manuscrito depositado está no formato PDF.
- Os autores declaram que a pesquisa que deu origem ao manuscrito seguiu as boas práticas éticas e que as necessárias aprovações de comitês de ética de pesquisa, quando aplicável, estão descritas no manuscrito.
- Os autores declaram que uma vez que um manuscrito é postado no servidor SciELO Preprints, o mesmo só poderá ser retirado mediante pedido à Secretaria Editorial do SciELO Preprints, que afixará um aviso de retratação no seu lugar.
- Os autores concordam que o manuscrito aprovado será disponibilizado sob licença [Creative Commons CC-BY](#).
- O autor submissor declara que as contribuições de todos os autores e declaração de conflito de interesses estão incluídas de maneira explícita e em seções específicas do manuscrito.
- Os autores declaram que o manuscrito não foi depositado e/ou disponibilizado previamente em outro servidor de preprints ou publicado em um periódico.
- Caso o manuscrito esteja em processo de avaliação ou sendo preparado para publicação mas ainda não publicado por um periódico, os autores declaram que receberam autorização do periódico para realizar este depósito.
- O autor submissor declara que todos os autores do manuscrito concordam com a submissão ao SciELO Preprints.