

**Universidade de São Paulo – USP**  
**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP**  
**Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica**

MARIANE CRISTINA PEREIRA

**Efeitos da administração de altas doses de creatina e etanol no estresse  
oxidativo e função hepática em ratos**

Ribeirão Preto

2021

MARIANE CRISTINA PEREIRA

**Efeitos da administração de altas doses de creatina e etanol no estresse oxidativo e função hepática em ratos**

Versão original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica.

Orientadora: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior

Ribeirão Preto

2021

Pereira, Mariane Cristina

Efeitos da administração de altas doses de creatina e etanol no estresse oxidativo e função hepática em ratos. Ribeirão Preto, 2021.

p. : 43 il. ; DVD

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Jordão Júnior, Alceu Afonso.

1. Creatina. 2. Etanol. 3. Estresse Oxidativo. 4. Função hepática. 5. Antioxidante.

Nome: PEREIRA, Mariane Cristina

Título: Efeitos da administração de altas doses de creatina e etanol no estresse oxidativo e função hepática em ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

## Agradecimentos

Ao meu orientador, pela paciência, conhecimento e dedicação de seu tempo a mim.

Aos meus pais, Maria Cristina e Nilton José, pelo suporte e esforço para que eu pudesse chegar até aqui e pelo apoio em todos os momentos e escolhas. Serei grata eternamente.

Ao meu noivo, por todo seu apoio em tempo integral, amor e carinho nesses últimos anos, para que pudesse concluir mais essa etapa em minha vida. Meu amor eterno.

As minhas irmãs e família, pelo incentivo e apoio. Principalmente minha tia Mestre Ana Lúcia, por todo conhecimento já passado.

Aos meus colegas de laboratório, por todas as reuniões, cafés e trabalhos em bancadas ou biotérios, principalmente nos sacrifícios, muito obrigada!

A nossa querida técnica de laboratório Paula Payão, por todo seu tempo, dedicação, esforço, conhecimento, ajuda, tudo nesses 3 anos.

As minhas amigas tão queridas, por todo seu apoio, mas principalmente Sarah Cury e Paula Sozza que ajudaram nesse meio científico e de pesquisa.

As minhas colegas de mestrado Naiara e Isabela, que estivemos sempre juntas, nos ajudando e nos apoiando a chegar ao final.

A coordenação e administração da Pós graduação da Clínica Médica, principalmente Émerson que sempre presente e prestativo a nos ajudar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo auxílio e oportunidade para a realização desse estudo.

E finalmente, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha formação.

Muito obrigada!

## Dedicatória a CAPES

Agradecimento a Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio e oportunidade para a realização desse estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

## Sumário

1. Introdução.....	13
2. Objetivo.....	16
3. Métodos.....	16
4. Resultados.....	24
5. Discussão.....	36
6. Conclusão.....	40
7. Referências Bibliográficas.....	41
8. Apêndices.....	45

## Lista de Abreviaturas

OMS – Organização Mundial da Saúde  
DHA – Doença Hepática Alcoólica  
ADH - álcool desidrogenase  
ALDH - aldeído desidrogenase  
MEOS - sistema microssômico de oxidação do etanol  
ROS - espécies reativas de oxigênio  
GAMT - guanidino acetato metiltransferase  
AGAT - glicina amidino-transferase  
PCr - creatina fosfato  
GC – Grupo Controle  
GCR – Grupo Creatina  
GET – Grupo Etanol  
GET/CR – Grupo Etanol/Creatina  
GSH – Glutathiona reduzida  
HDL - lipoproteína de alta densidade  
VLDL- lipoproteína de muito baixa intensidade  
AST - aspartato aminotransferase (TGO)  
ALT - alanina aminotransferase (TGP)  
MDA – malondialdeído  
HPLC - cromatógrafo líquido de alta eficiência  
DP – Desvio Padrão  
FAL – fosfatase alcalina  
G - grama  
kg - kilograma  
ml – Mililitro  
gT – grama de Gordura Total  
μmol - micromol  
gP – grama de Proteína  
dL – decilitro

mg – miligrama

nmol - nanomol

UI – unidades internacionais



## Resumo

PEREIRA, M. C. **Efeitos da administração de altas doses de creatina e etanol no estresse oxidativo e função hepática em ratos**. 2021. Tese (Mestrado em Clínica Médica – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021).

Segundo a OMS, aproximadamente 2 bilhões de pessoas consumiam bebidas alcoólicas no mundo em 2011 e 6% de todas as mortes globais são atribuíveis ao uso de álcool. O consumo agudo de álcool é prejudicial e resulta em manifestações clínicas envolvendo todos os órgãos, principalmente o fígado. As células hepáticas possuem enzimas antioxidantes que diminuem os danos causados por espécies reativas de oxigênio, porém se este equilíbrio é danificado pelo etanol podem ser geradas lesões no fígado. Atualmente, estudos mostram que a creatina tem papel de antioxidante, direta e indiretamente. O objetivo desse estudo foi analisar os efeitos de altas doses de etanol e creatina no estresse oxidativo e função hepática em ratos Wistar. Os animais foram divididos em grupos: Controle, Etanol, Creatina e Etanol/Creatina e passaram por intervenção de 14 dias. A creatina foi administrada em doses de 0,3 g/kg de peso do animal nos três primeiros dias de intervenção (fase de carga - *'loading protocol' ou período de saturação*), via gavagem, diluída em água e adiante, no período de manutenção, foi ofertada em água na proporção de 1,25g/L (pensando em ofertar 0,05 g/kg) nos grupos Creatina e Etanol/Creatina. O etanol foi administrado por gavagem em uma única dose em uma quantidade de 5g/kg do peso do animal nos grupos Etanol e Etanol/Creatina. Os grupos Etanol e Etanol/Creatina foram eutanasiados após a dose de etanol em 2, 4, 6 e 24 horas. Foram quantificadas a gordura hepática total, a peroxidação lipídica, glutatona reduzida, concentração de alfa tocoferol hepático, proteína, lipoproteínas e triglicérides, AST, ALT, fosfatase alcalina e creatina sérica. Foi realizado o exame histológico do fígado. Os resultados foram demonstrados em média e desvio padrão. A comparação entre grupos foram realizados por teste ANOVA *one-way* com pós-teste de Turkey, considerando  $p < 0,05$  como nível de significância e a comparação entre momentos diferentes dos grupos foram apresentados com valor de p do teste t de student e intervalo de confiança 95% da diferença entre os grupos

em cada momento. Como principais resultados, a associação creatina e etanol resultaram na diminuição dos valores de AST, do MDA, aumento da GSH hepática e dos níveis de tocoferol hepático e sérico. Porém, também aumentou os valores de ALT e dos níveis de FAL Na análise histológica, tivemos maior degeneração celular no grupo suplementado com etanol e creatina. Concluindo, a creatina pode exacerbar os efeitos hepáticos ocasionados pelo etanol demonstrados pelo aumento de ALT, FAL e degeneração celular nos tecidos. Porém, outras análises, nos fazem repensar em sua proteção, como aumento dos níveis de tocoferol e GSH.

**Palavras chaves:** creatina, etanol, estresse oxidativo, função hepática, enzimas hepáticas, antioxidante

## Abstract

PEREIRA, M. C. **Effects of high doses of creatine and ethanol administration on oxidative stress and liver function in rats.** 2021. Tese (Mestrado em Clínica Médica – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021).

According to WHO, approximately 2 billion people consumed alcoholic beverages worldwide in 2011 and 6% of all global deaths are attributable to alcohol use. Acute alcohol consumption is harmful and results in clinical manifestations involving all organs, especially the liver. Liver cells have antioxidant enzymes that reduce the damage caused by reactive oxygen species, but if this balance is damaged by ethanol, liver damage can be generated. Currently, studies show that creatine plays an antioxidant role, directly and indirectly. The aim of this study was to analyze the effects of high doses of ethanol and creatine on oxidative stress and liver function in Wistar rats. The animals were divided into groups: Control, Ethanol, Creatine and Ethanol/Creatine and underwent a 14-day intervention. Creatine was administered in doses of 0.3 g/kg of animal weight in the first three days of intervention (loading phase - 'loading protocol' or saturation period), via gavage, diluted in water and onwards, in the period of maintenance, was offered in water at the proportion of 1.25 g/L (thinking of offering 0.05 g/kg) in the Creatine and Ethanol/Creatine groups. Ethanol was administered by gavage in a single dose in an amount of 5g/kg of the animal's weight in the Ethanol and Ethanol/Creatine groups. The Ethanol and Ethanol/Creatine groups were euthanized after the ethanol dose at 2, 4, 6 and 24 hours. Total hepatic fat, lipid peroxidation, reduced glutathione, hepatic alpha tocopherol concentration, protein, lipoproteins and triglycerides, AST, ALT, alkaline phosphatase and serum creatine were quantified. Histological examination of the liver was performed. The results were shown in mean and standard deviation. The comparison between groups was performed by one-way ANOVA test with Turkey's post-test, considering  $p < 0.05$  as the level of significance and the comparison between different moments of the groups were presented with p value of Student's t test and interval 95% confidence interval between the groups at each time point. As main results, the association of creatine and

ethanol resulted in a decrease in AST and MDA values, in an increase in hepatic GSH and in hepatic and serum tocopherol levels. However, it also increased the values of ALT and FAL levels. In the histological analysis, we had greater cell degeneration in the group supplemented with ethanol and creatine. In conclusion, creatine can exacerbate the liver effects caused by ethanol demonstrated by the increase in ALT, FAL and cell degeneration in tissues. However, other analyzes make us rethink its protection, such as increased levels of tocopherol and GSH.

Keywords: creatine, ethanol, oxidative stress, liver function, liver enzymes, antioxidant

## Introdução

Transtorno por consumo de álcool é uma das principais causas de doenças e, também de mortalidade, associada a doenças hepáticas no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) mostrou que 6% de todas as mortes globais são atribuíveis ao uso de álcool (1).

E em 2011, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que 2 bilhões de pessoas consumissem bebidas alcoólicas no mundo todo e que 76,3 milhões apresentam doenças associadas ao consumo excessivo de álcool. Atualmente, sabemos que o etanol é uma substância hepatotóxica, baseados em estudos epidemiológicos (2).

O uso agudo possui fator de risco em relação às causas externas, como acidentes de trânsito, no trabalho, violência e outras (3,4).

Uma pesquisa epidemiológica, realizada em 2013 no Brasil, mostrou que o uso episódico excessivo de álcool alcançou 12,7% da população (4). No Brasil o tema é bem relevante, pois supera a média das Américas no consumo anual de álcool puro/habitante com idade superior a 15 anos e está entre os que apresentam maior taxa de mortalidade devido ao consumo de álcool nas Américas (4).

Embora o consumo de álcool crônico seja a fonte mais comum de doença causada pelo abuso de álcool, o consumo agudo também é prejudicial (5). A intoxicação aguda por álcool resulta de um único episódio de consumo abusivo de álcool (6) ou, como definida pela Pesquisa Nacional sobre o Uso de Drogas e Saúde, o consumo de cinco ou mais bebidas dentro de um período de três horas (4), causando manifestações clínicas envolvendo todos os órgãos, especialmente o fígado, principal alvo das ações do etanol. As células do fígado possuem enzimas antioxidantes que diminuem os danos causados por espécies reativas de oxigênio no organismo. Se este equilíbrio é prejudicado pelo etanol, danificações celulares são geradas (6).

De várias patologias associadas ao consumo excessivo de álcool, a mais relevante é a doença hepática alcoólica (DHA), a qual é caracterizada por lesão do fígado (7).

A cirrose hepática é a décima causa de mortalidade nos Estados Unidos, das quais, 40% são associadas ao álcool. A DHA pode progredir de uma esteatose simples a cirrose, e até a um carcinoma hepatocelular (8). A esteatose é, na maioria das vezes, assintomática e reversível com abstinência. Com o contínuo do consumo de álcool, alguns pacientes desenvolvem inflamação do fígado, gerando danos aos hepatócitos e infiltração de células polimorfonucleares, dois aspectos que definem a DHA (9). A progressão da DHA implica vários mecanismos decorrentes da hepatotoxicidade do etanol no fígado, além de outros fatores, como duração e tipo de consumo de álcool (7).

A quantidade ingerida de etanol ainda não é de acordo entre os autores. Alguns pesquisadores mostram que há vários riscos para a existência de DHA quando o consumo excede 80g por dia, porém outros relatam que no mínimo 160g de etanol é necessário para induzir hepatite ou cirrose. Existem ainda os pesquisadores que afirmam que doses menores já constituem fatores de risco, como 40g por dia para homens e 20g por dia para mulheres (2). Já a OMS caracteriza o consumo abusivo de álcool com consumo de 60 g de álcool ou mais em uma única ocasião (10).

Sendo o maior órgão interno do corpo, o fígado é o responsável por várias funções, dentre elas a metabolização de substâncias, utilizando das vias oxidativas e não oxidativas para metabolizar o álcool (7).

Para a sua metabolização, há necessidade da participação de enzimas e cofatores, os quais: álcool desidrogenase (ADH), aldeído desidrogenase (ALDH), o sistema microssômico de oxidação do etanol (MEOS), que induz o citocromo específico P-4502E1. Primeiramente, o álcool é transformado em aldeído acético com o auxílio da ADH. Após essa etapa, o aldeído acético é transformado em acetato, pela participação do ALDH (2).

Radicais livres contribuem para várias doenças ou situações de toxicidade, como uma dose aguda de etanol. E esses radicais livres podem ser inibidos pela presença de antioxidantes (11).

O dano ao fígado e seus mecanismos são consequentes da oxidação do etanol, a qual propicia uma alta formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como radical hidroxila, superóxido e peróxido de hidrogênio. As ROS

iniciam o dano tecidual por meio de reações com outras moléculas, lipídeos e proteínas, resultando o aumento da peroxidação lipídica gerando produtos tóxicos como o malondialdeído e, a formação de complexos protéicos que atuam como autoantígenos para iniciar a resposta imune e danos ao DNA, respectivamente (12, 13).

O estudo de Kharbanda, et. Al. (14) demonstrou que o consumo de etanol pode afetar a via de biossíntese da creatina hepática, por afetar a atividade de metiltransferases, como a acetato metiltransferase (GAMT), assim levando a prejuízos tanto no fígado, como também em outros órgãos.

A biossíntese da creatina, realizada no fígado, ocorre com ajuda das enzimas metiltransferases, GAMT e a glicina amidino-transferase (AGAT). A creatina desempenha um papel essencial no metabolismo energético, servindo de tampões de potencial de fosforilação citosólica e o transporte de energia em células que demandam de alta energia (14).

A creatina é produto final do metabolismo da glicina e arginina, aminoácidos que juntos produzem o guanidinoacetato. Nos últimos anos, estudos mostram que a creatina tem papel de antioxidante (15), podendo variar de diferentes mecanismos de ação, como a estabilização de membranas celulares e melhora na capacidade energética da célula (16). A estabilização de membranas celulares provém do aumento de concentrações intracelulares de creatina fosfato (PCr) se ligando aos fosfolipídios da membrana, assim diminuindo a permeabilidade e portanto a perda de elementos intracelulares como enzimas(16).

O estudo de Araújo et. Al. (15) teve como objetivo determinar os efeitos da suplementação de creatina em biomarcadores do fígado de estresse oxidativo em ratos treinados por exercícios. Como sabemos, a atividade física modifica o equilíbrio entre o estresse oxidativo e os mecanismos de defesa antioxidante do organismo (17, 18). A creatina tem sido alvo de pesquisas avaliando a creatina como redução do estresse oxidativo celular associado ao exercício extenuante de longo prazo. Como resultado, esse estudo demonstrou que a suplementação de creatina atua de maneira aditiva ao treinamento físico para aumentar as enzimas antioxidantes no fígado de rato (15).

Outros estudos que mostram efeitos diretos da creatina na remoção de espécies reativas de oxigênio concluíram que ela atua como antioxidante primário significativo (16, 19).

Pesquisadores encontraram relação dose-resposta direta da concentração de creatina com ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peroxinitrito (OONO<sup>-</sup>) e ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (16, 19, 20).

Segundo o estudo de Sestile et al. (21), a creatina efetua a eliminação direta de espécies de radicais livres em células de mamíferos cultivadas expostas a vários agentes oxidantes. Porém, nesse último ano, o estudo de Marinello e colaboradores (22), mostrou que a suplementação de creatina associada ao etanol é capaz de interferir no metabolismo do álcool e do estresse oxidativo e exacerbar o dano hepático induzido pelo etanol.

Dentre outras funções, a creatina serve como um importante tampão potencial de fosforilação citosólica e energia, desempenhando papel protetor em outros órgãos, além do fígado, como no sistema nervoso central, atuando contra o dano de hipóxia-isquêmica e regulando o apetite e o peso, agindo em núcleos hipotalâmicos específicos. Sua suplementação também revelou efeitos neuroprotetores em casos de cérebro traumático. Outros efeitos consideráveis são: aumento da força muscular, aumento da densidade mineral óssea, cardioprotetores e anticancerígenos. Estudos demonstraram também melhora do desempenho mental e memória de curto prazo e usada como terapia adjuvante para distrofia muscular, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, doença de Huntington, Parkinson e Alzheimer (23).

#### Justificativa

Por ser um grande problema de saúde, o consumo excessivo de álcool e suas consequências, como doenças hepáticas, entre outras, justifica-se a busca no uso de alternativas, como os antioxidantes, que poderiam diminuir os danos hepáticos causados pelo etanol. Recentemente, a creatina ganhou espaço nas pesquisas com o papel como antioxidante e outros fatores protetores. Assim, hipotetizamos que a suplementação de creatina poderia



proteger o organismo contra o estresse oxidativo em ratos submetidos a altas doses de etanol.

### Objetivo

O objetivo do estudo foi analisar os efeitos de altas doses de etanol e creatina sobre o equilíbrio oxidativo e função hepática em ratos *Wistar*.

### Objetivos específicos

Como objetivo secundário, avaliar a possível função da creatina como antioxidante e protetora de danos hepáticos.

### Materiais e Métodos

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar*, oriundo do Biotério Central do Campus da USP – Ribeirão Preto. Mantidos no Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, passaram pela aprovação da Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), o qual número de protocolo de 77 / 2018. O regime de claro-escuro foi mantido constante, de 12 em 12 horas e a temperatura controlada em 24°C.

Os animais passaram por um período de adaptação ao ambiente e a dieta de 3 dias, em seguida iniciando o experimento, de 14 dias, em que os animais receberam dieta e água *ad libitum*, anestesiados e sacrificados por decapitação, onde foi retirado o tecido hepático.

### Suplementação de Creatina

A creatina foi ofertada em doses de 0,3 g/kg de peso do animal nos três primeiros dias de intervenção, na fase de carga (*'loading protocol' ou período de saturação*), via gavagem, diluída em água. Adiante, no período de manutenção, foi ofertada em água na proporção de 1,25g/L (pensando em ofertar 0,05 g/kg).

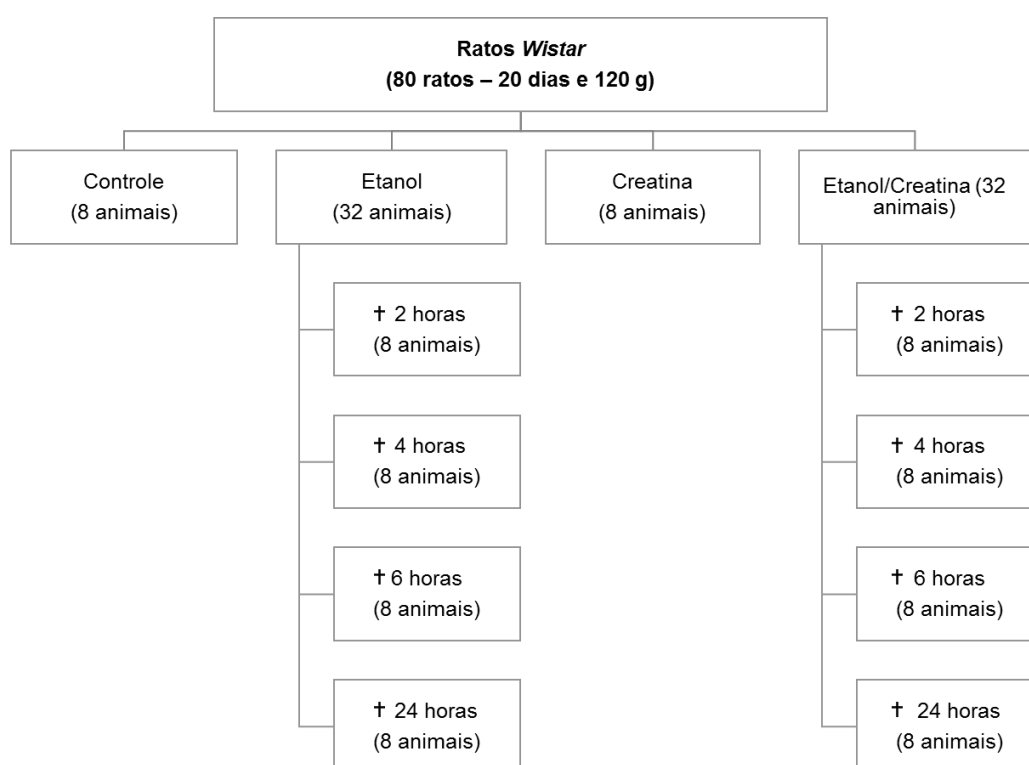
### Oferta de Etanol

O etanol foi ofertado em uma quantidade de 5 g/kg do peso do animal, em uma dose única, via gavagem.

#### Divisão dos Grupos

- **Grupo Controle (GC)** (08 animais): após as duas semanas de intervenção passaram pela gavagem (de salina) e eutanasiados.
- **Grupo CREATINA (GCR)** (08 animais): suplementados com creatina, nos três primeiros dias via gavagem e adiante administrada na água. Após o período do experimento foram eutanasiados.
- **Grupo ETANOL (GET)** (32 animais): receberam dose aguda de etanol por gavagem após as duas semanas de intervenção. Após a gavagem foram eutanasiados após os tempos 02, 04, 06 e 24 horas (8 animais em cada tempo).
- **Grupo ETANOL/CREATINA (GET/CR)** (32 animais): foram suplementados com creatina nos três primeiros dias de intervenção via gavagem e após, a creatina foi administrada na água durante a intervenção. Receberam, após a intervenção, a dose aguda de etanol por gavagem e eutanasiados após os tempos 02, 04, 06 e 24 horas (contendo 8 animais em cada tempo).

Figura 1. Divisão dos Grupos



## **Peso e dieta**

Os animais foram pesados nos dias de chegada e final do experimento. Foi ofertada a dieta controle do biotério (NUVILAB-NUVITAL®), em recipientes individuais de inox continuamente durante o dia todo.

## **Determinação de glutathiona reduzida no soro**

A quantificação da glutathiona reduzida (GSH) foi feita segundo método descrito por Sedlak e Lindsay (23). Utilizando uma alíquota de 25 µL de soro com a adição de 1 mL de tampão Tris-EDTA (tris base 0,25 mol/L e EDTA 0,2 mol/L, pH 8,2) para a realização da primeira leitura no comprimento de onda de 412 nm, obtendo-se A1. Posteriormente, 25 µL do DTNB foram adicionados à esta solução e após 15 minutos de reação a temperatura ambiente, foi realizada a segunda leitura, obtendo-se A2, contra um branco de DTNB. Após a subtração dos valores obtidos A2-A1, a concentração na amostra foi calculada utilizando-se, uma curva padrão de GSH, expressa em umol/L.

## **Determinação da concentração de alfa tocoferol no soro**

Em microtubos de 2 mL, foram pipetados 200 µL de soro e 400 µL de etanol e agitados brevemente em vórtex. Em seguida foram adicionados 400 µL de hexano, e a solução foi novamente agitada em vórtex, dessa vez por 1 minuto. Os microtubos foram então centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos e uma alíquota de 200 µL da fase hexânica (superior) foi transferida para outro microtubo para secagem em fluxo de N<sub>2</sub>(g). Após a secagem, foram acrescentados 200 µL de fase móvel, composta por acetonitrila:diclorometano:metanol 7:2:1. Esse material foi agitado para ressuspender a fase lipídica que ficou no fundo do microtubo e foram injetados 20 µL no HPLC. Para as análises, foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu modelo LC-20AT; coluna tipo C-18 (250 x 4,6mm - 5µm); detector UV-visível modelo SPD-20A; fase móvel; velocidade de fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 292 nm para α-tocoferol. As concentrações foram determinadas por meio do uso de padrão externo e os resultados expressos em µmol/L de soro (38).

### **Determinação de proteína no soro**

A determinação de proteína no soro foi realizada por kit comercial Labtest utilizando o método de Biureto (24).

### **Determinação de Lipoproteínas e Triglicérides séricas**

No soro foram dosados o colesterol total, o colesterol presente na lipoproteína HDL (lipoproteína de alta densidade) e os triglicérides, utilizando kits comerciais da marca Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). A partir do resultado dos triglicérides, foi estimado o valor da lipoproteína de muito baixa intensidade (VLDL). As análises foram realizadas por espectrofotômetro Epoch – BioTek.

### **Determinação de AST, ALT e Fosfatase Alcalina**

Fosfatase alcalina, AST e ALT foram determinadas em soro por meio de Kit comercial da marca Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil), por reação colorimétrica e leitura por espectrofotômetro Epoch – BioTek.

### **Determinação da creatina sérica**

A creatina sérica foi determinada pela reação de Jaffe usando um método adaptado de Taussky (25) e De Saedeleer & Marechal (26). Esse método consiste na conversão da creatina em creatinina por aquecimento, onde a creatinina reage com o ácido pícrico em meio alcalino formando um complexo de cor avermelhada que é medido fotometricamente. Para realização do ensaio, 600 µL de ácido pícrico (44,4 mmol/L) foi adicionado a 200 µL de amostra e o conteúdo foi homogeneizado. O material foi então centrifugado para separação do resíduo de desproteinização. Em seguida, o sobrenadante foi separado em duas partes de 300 µL em novos tubos contendo 300 µL de água destilada (A1 e B1). Após aquecimento de uma das partes (A1) a 100°C por 1,5h em vials fechados, 1mL de solução tampão contendo hidróxido de sódio (208 mmol/L), tetraborato de sódio (12,7mmol/L) e surfactante foi adicionado em todas as amostras (A1 e B1). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 510 nm acertando o zero como branco, após a incubação por 10 min a 37 °C em banho-maria. As absorbâncias dos testes foram A1 e B1. Após a adição de 100 L de ácidoacético (11,4 mmol/L) e incubação de 5

min em temperatura ambiente, as amostras foram relidas e suas respectivas absorbâncias serão A2 e B2. O cálculo da concentração de creatina foi realizado através da fórmula  $(A1 - B1) - (A2 - B2)$  na curva padrão de Cr de 10 a 1000 mol/L realizada em triplicata (27)(25)(26).

### **Preparação do tecido hepático para dosagem**

Foi pesado aproximadamente 200mg de tecido, anotados todos os pesos para posteriores correções, e armazenados em eppendorf de 2mL em congelador de -80°C. Antes da análise foram acrescentados 200µL da solução tampão ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – fosfato de sódio) e homogeneizado com micro homogeneizador MA1102 da marca Marconi, então foi adicionada solução tampão até atingir 1mL. Essa solução foi centrifugada a 4000r.p.m. por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi separado e pipetado para cada análise que foi realizada posteriormente, o restante do sobrenadante foi armazenado em um microtubo tipo eppendorf.

### **Quantificação da gordura hepática**

Foi extraída a gordura total de acordo com o método proposto por Bligh; Dyer (28). Foram homogeneizados em tubos de ensaio, com micro homogeneizador Marconi MA1102, 500mg do tecido hepático em 800µL de água Milli-Q; a essa solução foram acrescentados 1mL de clorofórmio e 2mL de metanol e agitados em vórtex (modelo Phoenix Lufenco AP59) na velocidade máxima durante 1 minuto. Em seguida foram adicionados 1mL de água Milli-Q e 1mL de clorofórmio, e a mistura foi agitada novamente em vórtex durante 2 minutos. As amostras foram centrifugadas em centrífuga Sorvall Legend Mach 1.6 R por 5 minutos a 4000 r.p.m.. A fase clorofórmica (inferior) foi extraída para um microtubo contendo aproximadamente 500mg de sulfato de sódio anidro, agitados em vórtex e centrifugadas por 5 minutos a 4000 r.p.m. Sendo assim, obtivemos a fase clorofórmio livre de água, onde 1mL da dessa fase foi transferido para um microtubo tipo eppendorf previamente pesado, e posteriormente colocado aberto em estufa a 50°C por 18 horas, para que todo o clorofórmio evaporasse. Então foi realizada nova pesagem dos microtubos, agora contendo a gordura e foram feitos os cálculos de gordura total

subtraindo-se o peso dos microtubos com gordura do peso dos mesmos ainda vazio.

#### **Determinação de malondialdeído (MDA) hepático**

A análise de MDA hepático foi realizada de acordo com Gérard-Monnier et al. (29), com algumas adaptações. Em um microtubo foram colocados 100µL do homogenato do tecido e 300µL de solução de 1-metil-fenilindol à concentração de 10mM em acetonitrila e metanol (2:1, v/v) e agitado em vórtex AP 59 – Phoenix Luferco. Em seguida foram adicionados 75µl de HCl fumegante (37%) e agitado novamente em vórtex. As amostras foram então incubadas em banho-maria a 45°C por 40 minutos, e em seguida centrifugadas 4000r.p.m. a 4°C por 5 minutos. A leitura de absorvância do sobrenadante foi realizada em equipamento Epoch – BioTek, a um comprimento de onda de 586nm, e a concentração de MDA foi calculada comparando-a a uma curva padrão de MDA.

#### **Determinação da glutatona reduzida (GSH) hepática**

A dosagem de Glutaciona Reduzida (GSH) foi realizada no tecido hepático a partir do método descrito por Sedlak & Lindsay (30), com algumas adaptações. Uma alíquota de 25µL do homogenato foi retirada, e misturada a 200µL de água deionizada e 50µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% e 500µL EDTA. Logo após foi agitado em vortex AP 59 – Phoenix Luferco, esperou 15 minutos e agitou novamente, em seguida a amostra foi centrifugada por 15 minutos (4000 r.p.m. a temperatura ambiente). Após a centrifugação, 250µL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e, a esse material, foram adicionados 250µL de tampão TRIS (0,4M, pH 8,9) e 25µL de DTNB (ácido ditionitrobenzóico) (0,01M em metanol). A solução foi homogeneizada e, após 5 minutos, a leitura da absorvância foi realizada no comprimento de onda de 412nm em espectrofotômetro Epoch – BioTek. A concentração foi calculada utilizando-se uma curva padrão de GSH em EDTA (0,02M) contra um branco composto por EDTA, TRIS e DTNB.

### **Determinação de vitamina E hepática**

As análises hepáticas de vitamina E (alfa-tocoferol) foram realizadas por cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), segundo método adaptado de Arnaud et al. (31) . Em microtubos de 2mL, cerca de 100mg de tecido foram homogeneizados em 0,5mL de etanol; em seguida foi adicionado 0,5mL de hexano e a mistura foi agitada em vórtex AP 59 – Phoenix Lufenco por 1 minuto, e centrifugada a 3500 r.p.m. durante 5 minutos, em centrífuga Sorvall Legend Mach 1.6 R. Após a centrifugação, 100µL da fase hexânica (sobrenadante) foram transferidos para outro microtubo, onde foi realizada a secagem com fluxo de nitrogênio para que ficasse no microtubo apenas a parte lipídica do material. A esses microtubos foram adicionados 100µL da fase móvel (70% acetonitrila, 20% diclorometano e 10% metanol) e, para ressuspender a gordura, os microtubos foram agitados. Em seguida, todo o material foi transferido para o vial e lido em HPLC Shimadzu modelo LC-20AT, coluna tipo C-18 (250 x 4,6 mm – 5µm), detector UV-visível modelo SPD-20A.

### **Determinação de proteína hepática**

A determinação da proteína hepática foi realizada de acordo com kit comercial, pelo método de Biureto (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil), e feita a leitura em espectrofotômetro Epoch – BioTek. Para o teste foi utilizado o homogenato de fígado.

### **Exame Histológico**

Para a análise histológica, seções de tecido hepático fixado em formalina e embebido em parafina foram realizadas a uma espessura de 5 um e coradas com hematoxilina & eosina para exame histológico. A análise foi realizada em 30 campos escolhidos aleatoriamente em grande aumento (40x ampliação microscópica) em cada lâmina. A classificação da gravidade da esteatose hepática foi a seguinte: grau 0, pouca ou nenhuma evidência de esteatose <5%; grau 1, esteatose leve 6-33%; grau 2, moderada a grave esteatose 34-66%; grau 3, esteatose grave > 66% (32).

### **Análise Estatística**

Os resultados foram apresentados em média e desvio padrão.

Para a comparação entre os grupos foi feita uma análise ANOVA-oneway (considerando  $p < 0,05$  como nível de significância) e para evidenciar essas diferenças foi feito o pós-teste de comparações múltiplas de Tuckey. Para a comparação entre os dois grupos em momentos diferentes (Etanol e Etanol/Creatina) foram apresentadas as médias, desvios-padrão, valor p do teste t de student para amostras independentes e intervalo de confiança 95% da diferença entre os grupos em cada momento.

Para verificar possíveis associações entre os grupos e a Análise histológica foram feitos gráficos de barras, tabelas de contingência e testes de associação. É apresentado o valor p do teste de associação, foi utilizado o teste exato de Fisher.

## Resultados

### Ganho de Peso

Na tabela abaixo temos média e desvio padrão do ganho de peso de cada grupo de animais, assim como a comparação entre os grupos pelo teste ANOVA, com valor do ganho de peso em g.

Tabela 1 - Ganho de Peso (g): Média, Desvio Padrão e Comparação entre os grupos

Grupos	Média	DP	P
GC	56,62	6,88	
GET	70,19	13,07	
GCR	59,75	9,82	0,0001
GET/CR	77,09	11,08	

Nesses resultados vemos uma diferença estatística dos grupos suplementados com etanol com maior ganho de peso.



Tabela 2 - Ganho de Peso (g): comparando os horários de Grupo Etanol e Grupo Etanol/Creatina

Horário	GET		GET/CR		Valor p
	Média	DP	Média	DP	
2H	63,25	18,08	69	14,93	0,4996
4H	68	8,94	76	7,09	0,0685
6H	69	11,61	86,88	5,51	0,0028
24H	80,5	5,63	76,5	7,37	0,2440

Comparando os grupos que consumiram etanol com e sem o consumo de creatina, vemos que o grupo do horário de 6 horas teve um aumento de ganho de peso expressivo, quando comparado aos outros grupos.

### Peso de Fígado por g de Peso animal

Nas tabelas abaixo temos média e desvio padrão dos pesos hepáticos de cada grupo de animais, assim como a comparação entre os grupos pelo teste ANOVA com o valor do peso hepático (mg) por g de peso do animal.

Tabela 3 - Peso do Fígado (mg) por g de Peso animal : Média, DP e comparação entre os grupos

Grupo	Média	DP	Valor p
GC	33,52	1,65	0,0001
GET	35,56	3,94	
GCR	38,24	2,19	
GET/CR	32,66	2,35	

Nos resultados do Peso Hepático (mg) por g de peso do animal obtivemos diferença estatística em relação do grupo Etanol/Creatina ao Grupo Etanol ( $p = 0,0017$ ) e Grupo Creatina ( $p = 0,0001$ ), com menor valor na média do peso hepático dos animais deste grupo. Para diferenciar os horários dos grupos Etanol e Etanol/Creatina, fizemos a comparação segmentada entre esses dois grupos.

Tabela 4 – Peso do Fígado (mg) por g de Peso animal: comparando os horários de Grupo Etanol e Grupo Etanol/Creatina

Horário	GET		GET/CR		Valor p
	Média	DP	Média	DP	
2H	36,43	6,55	33,96	2,44	0,3439
4H	34,36	3,71	31,72	2,23	0,1109
6H	36,37	2,15	32,41	2,78	0,0071
24H	35,08	2,06	32,57	1,69	0,0191

Nestes resultados obtivemos diferença significativa nos horários 6 e 24H (p=0,0071 e 0,0191, respectivamente).

### Gordura Hepática

Nas tabelas abaixo temos média, desvio padrão e comparação entre os grupos pelo teste de ANOVA.

Tabela 5 – Gordura Hepática: Média, DP e comparação entre os grupos

Grupo	Média	DP	Valor de p
GC	0,09137	0,0099	0,0001
GET	0,1282	0,0175	
GCR	0,2582	0,0172	
GET/CR	0,1244	0,0258	

Comparando os grupos quanto a Gordura hepática tivemos diferença significativa entre quase todos os grupos, exceto comparando o GET/CR com GET. O GCR teve maiores valores de gordura no fígado.

### Proteínas Totais Séricas e Hepática

Tabela 6 – Proteínas Totais no Fígado (g/gT) e no Soro (g/dL): Média, DP e comparação entre os grupos

Variáveis		GC	GET	GCR	GET/CR	Valor de p
Proteínas Totais Séricas	Média	7,24	6,31	7,72	6,06	0,0001
	DP	0,483	0,767	0,523	0,641 0,156	
Proteínas Totais Hepáticas	Média	0,138	0,157	0,152	0,027	0,4199
	DP	0,034	0,025	0,035		

Em proteínas totais do fígado não obtivemos diferença significativa entre os grupos.

Nos valores de Proteínas totais no soro, obtivemos diferença significativa entre os grupos GET/CR ao GCR ( $p = 0,0001$ ) e GC ( $p = 0,0002$ ), do GCR ao GET ( $p = 0,0001$ ) e do GET ao GC ( $p = 0,0044$ ). Abaixo os valores dos horários dos grupos GET e GET/CR.

Tabela 7 – Proteínas Totais no Soro (g/dL): comparando os horários de Grupo Etanol e Grupo Etanol/Creatina

Horário	Etanol		Etanol/Creatina		Valor p
	Média	DP	Média	DP	
2H	6,31	0,25	5,93	0,77	0,2133
4H	5,57	0,49	6,08	0,40	0,0406
6H	6,74	0,86	5,97	0,54	0,0534
24H	6,61	0,79	6,27	0,83	0,4060

Nos valores dos horários nos grupos Etanol e Etanol/Creatina apenas obtivemos diferença significativa no horário 4H.

### GSH hepática e Sérica

Tabela 8 – GSH hepática ( $\mu\text{mol/gP}$ ) e GSH Sérica ( $\mu\text{mol/GP}$ ): Média, DP e comparação entre os grupos

Variáveis		GC	GET	GCR	GET/CR	Valor de p
<b>GSH Sérica</b>	Média	2,678	3,544	3,038	3,110	0,3835
	DP	0,712	1,757	0,683	1,311 1,016	
<b>GSH Hepática</b>	Média	0,811	0,592	0,821	0,259	0,0001
	DP	0,181	0,157	0,302		

Não obtivemos diferença significativa nos valores de GSH sérica.

Nos valores de GSH, obtivemos diferença significativa apenas entre os Grupos Etanol/Cretina e Etanol ( $p = 0,0001$ ). Para verificarmos os horários segue a tabela abaixo.

Tabela 9 – GSH hepática ( $\mu\text{mol/gP}$ ): comparando os horários de Grupo Etanol e Grupo Etanol/Creatina

Horário	GET		GET/CR		Valor p
	Média	DP	Média	DP	
<b>2H</b>	0,60	0,09	1,00	0,28	0,0040
<b>4H</b>	0,64	0,16	1,08	0,32	0,0054
<b>6H</b>	0,53	0,17	0,85	0,13	0,0009
<b>24H</b>	0,59	0,20	1,13	0,23	0,0002

Na comparação entre os horários nos GET e GET/CR, obtivemos diferença significativa entre todos os grupos, com a média maior em todos os horários do GET/CR.

### Triglicérides, Colesterol Total e HDL Sérico

Tabela 10 – Triglicérides sérico (mg/dL), Colesterol Total Sérico (mg/dL) e HDL sérico (mg/dL): Média, DP e comparação entre os grupos

Variáveis		GC	GET	GCR	GET/CR	Valor de p
<b>Triglicérides</b>	Média	66,27	175,1	176,9	180,3	0,0006
	DP	37,52	78,50	53,53	65,83	
<b>Colesterol Total</b>	Média	56,72	80,88	83,35	80,71	0,0004
	DP	7,61	14,34	12,06	16,20	
<b>HDL</b>	Média	52	46,94	67,61	45,65	0,0001
	DP	6,67	7,56	8,71	10,90	

Os resultados de Triglicérides sérico nos mostram diferença significativa entre os demais grupos com o grupo Controle, com menores valores. Não tivemos diferença significativa comparando o GET/CR ao GET.

Nos valores de Colesterol Total sérico, tivemos diferença significativa de todos os demais grupos ao grupo controle, com menores valores. O Grupo Creatina foi o que teve maior valor de colesterol. Em relação a comparação entre os horários dos Grupos GET e GET/CR, não obtivemos diferença significativa.

Nos valores de HDL sérico obtivemos uma diferença significativa maior quanto ao grupo GCR, com maior valor. Entre os horários dos grupos GET e GET/CR não tiveram diferença significativa.

### AST e ALT séricas

Tabela 11 – AST e ALT (U/ml): Média, DP e comparação entre os grupos

Variáveis		GC	GET	GCR	GET/CR	Valor de p
<b>AST</b>	Média	89,23	79,2	79,55	69,26	0,0001
	DP	14,53	10,82	10,24	10,64 29,66	
<b>ALT</b>	Média	26,11	21,32	22,29		0,0001
	DP	5,93	7,74	4,57	4,96	

Nos valores de AST, tivemos uma diminuição dos valores de todos os grupos comparados ao controle. Uma diferença significativa foi apontada do GET/CR ao GC ( $p = 0,0001$ ) e ao GE ( $p = 0,0033$ ).

Tabela 12 – AST (U/ml): comparando os horários de Grupo Etanol e Grupo Etanol/Creatina

Horário	GET		GET/CR		Valor p
	Média	DP	Média	DP	
2H	73,83	10,75	69,45	4,58	0,3155
4H	87,21	4,18	67,03	10,05	0,0005
6H	81,01	5,96	68,41	17,24	0,0837
24H	74,77	14,77	72,15	8,14	0,6692

Nos horários dos Grupos GET e GET/CR tivemos uma maior diferença no horário 4H, com menor valor do GET/CR.

Nos valores de ALT sérica, tivemos uma diferença significativa do Grupo GET/CR aos Grupos GET ( $p = 0,0001$ ) e GCR ( $p = 0,0209$ ), com uma média maior.

Para analisar melhor a comparação entre os grupos Etanol e Etanol/Creatina abaixo os valores dos horários.

Tabela 13 – ALT sérica (U/ml): comparando os horários de Grupo Etanol e Grupo Etanol/Creatina

Horário	GET		GET/CR		Valor p
	Média	DP	Média	DP	
2H	15,27	7,16	32,74	1,60	0,0002
4H	25,20	9,99	26,84	2,74	0,6668
6H	21,05	5,83	28,79	5,57	0,0168
24H	23,78	3,76	30,28	6,83	0,0383

Dos valores entre os horários dos grupos, tivemos diferença significativa nos horários 2H, 6H e 24H, analisando valores maiores de média do GET/CR.

### **Peroxidação Lipídica Hepática e Sérica (MDA)**

Tabela 14 – MDA hepático (nmol/GP) e sérico (nmol/GP): Média, DP e comparação entre os grupos

Variáveis		GC	GET	GCR	GET/CR	Valor de p
<b>MDA hepático</b>	Média	368,9	273,4	190,7	201,5	0,0001
	DP	58,26	81,32	45,93	31,26 53,27	
<b>MDA sérico</b>	Média	104,6	213	62,25	12,41	0,0001
	DP	42,31	153,64	23,94		

Em relação aos valores da Peroxidação Lipídica no Soro os resultados nos mostram uma diferença significativa dos grupos GET/CR ( $p = 0,0001$ ) e GCR ( $p = 0,0015$ ) em relação ao Grupo GET. Para visualizarmos melhor temos os valores dos horários dos grupos Etanol e Etanol/Creatina.

Tabela 15 – MDA sérico (nmol/GP): comparando os horários de Grupo Etanol e Grupo Etanol/Creatina

Horário	Etanol		Etanol/Creatina		Valor p
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
<b>2H</b>	338,00	224,65	50,68	9,88	0,2133
<b>4H</b>	231,30	43,77	60,95	10,64	0,0406
<b>6H</b>	188,29	130,00	55,06	13,50	0,0534
<b>24H</b>	94,25	14,42	46,39	12,49	0,4060

Entre os horários dos grupos GET/CR e GET obtiveram diferença significativa no horário de 4H.

Nos valores hepáticos de peroxidação lipídica tivemos diferença significativa entre todos os grupos, com o grupo Creatina com valores menores.

Tabela 16 – MDA hepático (nmol/GP): comparando os horários de Grupo Etanol e Grupo Etanol/Creatina

Horário	Etanol		Etanol/Creatina		Valor p
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
2H	340,45	69,36	200,53	30,52	0,0004
4H	313,02	69,36	217,32	36,04	0,0057
6H	248,23	58,42	177,45	24,29	0,0109
24H	192,01	32,09	210,58	21,59	0,1989

Nos resultados da peroxidação lipídica hepática entre os horários, tivemos diferença significativa relevante nos horários 2H, 4H e 6H, sendo que o grupo GET/CR teve valores menores do que o grupo GET.

### Fosfatase alcalina sérica

Tabela 17 – Fosfatase alcalina (U/l): Média, DP e comparação entre os grupos

Grupos	Média	DP	Valor de p
GC	168,1	39,81	0,0001
GET	130,6	31,97	
GCR	156	33,21	
GET/CR	198,2	66,75	

Quanto aos valores de FAL sérica, tivemos diferença significativa apenas do grupo GET/CR ao GET ( $p = 0,0001$ ).



Tabela 18 – Fosfatase alcalina (UI): comparando os horários de Grupo Etanol e Grupo Etanol/Creatina

Horário	Etanol		Etanol/Creatina		Valor p
	Média	DP	Média	DP	
2H	135,83	42,31	234,54	49,06	0,0008
4H	110,07	23,44	217,78	40,60	0,0000
6H	143,71	30,15	226,85	55,65	0,0035
24H	132,82	23,78	113,55	38,82	0,2551

Apenas o grupo 24H não teve diferença significativa, os outros todos tiveram. O Grupo GET/CR com valores maiores em relação ao grupo Etanol.

### Creatina Sérica

Tabela 19 – Creatina Sérica ( $\mu\text{mol/l}$ ): Média, DP e comparação entre os grupos

Grupos	Média	DP	Valor de p
GC	394,2	72,84	
GET	354	80,64	
GCR	415,1	116,73	0,0025
GET/CR	451	101,32	

Nos valores de Creatina sérica, tivemos diferença significativa do Grupo GET/CR ao GCR ( $p = 0,0001$ ). Dos dois grupos suplementados com Creatina (Grupo Creatina e grupo Etanol/Creatina) tivemos um maior valor no grupo com a suplementação de etanol também.

Tabela 20 – Creatina Sérica ( $\mu\text{mol/l}$ ): comparando os horários de Grupo Etanol e Grupo Etanol/Creatina

Horário	Etanol		Etanol/Creatina		Valor p
	Média	DP	Média	DP	
2H	305,13	58,51	466,35	55,65	0,0010
4H	361,11	76,89	472,53	115,90	0,0644
6H	365,38	96,55	399,84	132,48	0,5625
24H	367,79	80,86	467,95	88,23	0,0330

E nos horários dos grupos Etanol e Etanol/Creatina temos uma diferença significativa nos horários de 2H e 24H.

### Tocoferol Sérico e Hepático

Tabela 21 – Tocoferol sérico ( $\mu\text{mol/l}$ ) e hepático (nmol/g de Tecido): Média, DP e comparação entre os grupos

Variáveis		GC	GET	GCR	GET/CR	Valor de p
Tocoferol Sérico	Média	0,2512	0,4069	0,4812	0,6644	0,0001
	DP	0,0750	0,1116	0,1011	0,2251 44,44	
Tocoferol Hepático	Média	20,47	18,98	27,96	19,5649	0,0001
	DP	13,7976	11,2469	4,0987		

Nos valores dos níveis de Tocoferol no soro, obtivemos diferença significativa entre os grupos, com o grupo GET/CR com maiores valores. Este e os demais grupos com valores maiores em comparação ao grupo GC.

Tabela 22 – Tocoferol Sérico ( $\mu\text{mol/l}$ ): comparando os horários de Grupo Etanol e Grupo Etanol/Creatina

Horário	Etanol		Etanol/Creatina		Valor p
	Média	DP	Média	DP	
2H	0,43	0,15	0,49	0,15	0,4761
4H	0,41	0,12	0,67	0,26	0,0300
6H	0,38	0,11	0,69	0,15	0,0006
24H	0,40	0,08	0,82	0,21	0,0006

Nos horários, obtivemos diferença significativa em 4H, 6H e 24H, onde o grupo GET/CR com maiores valores em relação ao grupo GET.

Nos valores de tocoferol hepático tivemos diferença significativa do grupo GET/CR aos grupos GC ( $p = 0,0008$ ) e GET ( $p = 0,0001$ ).

Tabela 23 - Tocoferol hepático (nmol/g de Tecido): comparando os horários de Grupo Etanol e Grupo Etanol/Creatina

Horário	Etanol		Etanol/Creatina		Valor p
	Média	DP	Média	DP	
2H	22,58	16,15	34,58	28,82	0,3263
4H	19,81	4,83	49,27	9,87	0,0000
6H	10,62	10,49	55,77	14,01	0,0000
24H	22,89	7,30	38,14	15,53	0,0309

Nos horários dos grupos GET e GET/CR tivemos uma diferença significativa nos horários 4H, 6H e 24H, onde em todos os horários, o grupo Et/Cr teve maiores valores.

### Análise Histológica

Tabela 24 – Análise Histológica: quantidade de amostras

Classe	Grupo				Valor p
	GC	GET	GCR	GET/CR	
Sem alterações	4 (57,1%)	21 (84%)	7 (87,5%)	21 (72,4%)	0,033
Leve esteatose	3 (42,9%)	0	0	6 (20,7%)	
Degeneração baloniforme	0	4 (16%)	1 (12,5%)	2 (6,9%)	

Na análise histológica, o grupo com maior porcentagem de degeneração foi o grupo GET e o com maior porcentagem de leve esteatose foi o grupo GET/CR. O Grupo GCR teve apenas 1 com degeneração baloniforme. Houve

diferença significativa entre eles, porém entre os horários de cada grupo não houve diferença significativa.

## **Discussão**

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de altas doses de etanol e creatina em danos hepáticos e sobre o equilíbrio oxidativo. Alguns estudos anteriores relataram a ação de antioxidante da creatina (15) e após o início desse projeto, uma pesquisa mostrou que a creatina associada ao uso de etanol é capaz de gerar estresse oxidativo em ratos (22), contrário a nossa suposição. Porém com métodos diferentes, utilizando a suplementação da creatina em 14 e 28 dias e com consumo de etanol crônico (22), quando nós utilizamos o uso de etanol agudo (apenas uma dose). Nas seções subsequentes discutiremos os principais achados deste trabalho, comparando com dados obtidos por outros autores.

### **Ganho de Peso dos Animais e Peso do Fígado**

Nos nossos resultados do ganho de peso dos animais obtivemos maiores valores nos ratos suplementados com etanol e comparando com o grupo que recebeu etanol e creatina, no horário de 6H, tivemos maior aumento do ganho de peso. Já no estudo de Jordão e colaboradores (11) que teve como objetivo avaliar a peroxidação lipídica e hepática em ratos com diferentes dietas, ofertando dose aguda de etanol, em 4 semanas e sacrificados 0, 2, 4, 8 e 24 horas após a administração do etanol, não tiveram diferença significativa no ganho de peso dos animais em todo o experimento. Mesmo resultado foi encontrado por Deminice e colaboradores (27), que investigou os efeitos da suplementação de creatina sobre os níveis de homocisteína e biomarcadores de peroxidação lipídica, suplementando ratos com creatina por 28 dias.

A associação etanol/creatina nos mostrou uma diminuição significativa no peso do fígado por g de peso animal, sendo que o consumo de etanol e creatina isolados gerou um aumento comparando ao controle (nos horários 6 e 24 H o grupo Etanol com maiores valores). No estudo de Marinello e colaboradores (22), o consumo de etanol isolado não houve aumento comparado ao controle e a suplementação de creatina associada ao etanol em 14 dias gerou um aumento do peso do fígado, contrário aos nossos resultados.

Outro estudo de Deminice e colaboradores (33), que teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de creatina no acúmulo de gordura no fígado induzido por uma dieta rica em gordura em ratos, a creatina associada a dieta rica em gordura diminuiu o peso do fígado.

### **Gordura Hepática**

A suplementação de creatina isolada aumentou os valores de gordura hepática, porém a associação etanol/creatina não alterou essa variável.

No estudo de Marinello e colaboradores (22), onde utilizaram da suplementação de creatina e etanol por 14 dias, obtiveram um aumento do acúmulo de gordura em 200%, comparado ao uso isolado de etanol. No estudo de Deminice e colaboradores (33), o grupo suplementado com creatina e dieta rica em gordura teve menor valor de gordura hepática comparado ao grupo apenas com dieta rica em gordura. Já o grupo suplementado apenas com etanol, no estudo de Demori e colaboradores (34), também não aumentou a gordura hepática. Com esses resultados, adicionada ao etanol, a creatina pode aumentar a gordura hepática, porém em uma dieta rica em gordura ela pode prevenir o aumento de gordura hepática.

### **GSH**

Em nosso estudo, não achamos diferença significativa na GSH sérica, porém na GSH hepática, a associação de etanol e creatina elevou os valores comparados ao grupo etanol, significativo em todos os horários.

No estudo de Araújo (15), que teve como objetivo avaliar a suplementação de creatina como protetora do estresse oxidativo do exercício físico, não encontraram diferença significativa nos dados de glutathione reduzida. Já no estudo de Marinello e colaboradores (22), a associação etanol/creatina promoveu um aumento de 56% dos níveis de GSH hepática após 14 dias, como em nosso estudo.

No estudo de Jordão e colaboradores (11) a administração aguda de etanol levou a uma diminuição dos níveis de GSH hepático no grupo com deficiência de vitamina E na dieta, nos intervalos de 2 e 4 h e também no grupo suplementado com vitamina E no intervalo de 8 h. Porém, no grupo controle,

apenas com a dose aguda de etanol, não houve diferença, nem aumento nem diminuição da GSH. Podemos sugerir que a creatina elevou esses valores associada ao etanol.

### **ALT E AST**

A associação etanol/creatina diminuiu os valores de AST significativamente e o horário de 4 horas teve a maior significância.

O estudo de Jordão e colaboradores (11) com dose aguda de etanol, em diferentes momentos, não obteve diferença significativa dos valores de AST. Assim como no estudo de Demori (34), onde nenhuma diferença significativa foi encontrada nos valores de AST.

Já o estudo de Souza e colaboradores (37), também mostrou que a suplementação de creatina diminuiu os valores de AST.

A associação etanol/creatina aumentou os valores de ALT, significativamente nos horários 2H, 6H e 24H. No estudo de Marinello (22), a associação também aumentou os níveis de ALT comparado ao grupo controle e etanol. No estudo de Demori (34) o grupo suplementado com dieta rica em gordura e etanol teve aumento de ALT comparado ao grupo controle e ao grupo ofertado apenas com etanol. Isso nos mostra que a associação da creatina ao etanol gerou esse aumento.

### **Peroxidação Lipídica sérica e hepática (MDA)**

Tanto no soro, como no fígado, a combinação de etanol e creatina diminuiu os valores de MDA. Nos valores de MDA hepáticos, todos os horários tiveram diferença significativa, exceto o de 24 horas. Em relação ao MDA sérico, o etanol isolado aumentou os valores, porém nos resultados hepáticos, ele e a creatina isolada, diminuíram os valores de MDA.

Diferente do nosso estudo, Marinello e colaboradores (22) encontraram valores elevados na associação etanol/creatina após 14 dias, comparados ao grupo controle e etanol.

No estudo de Stefani e colaboradores (35), cujo objetivo era avaliar o efeito da suplementação de creatina associada ao treinamento de resistência

sobre o ganho máximo de força e estresse oxidativo em ratos, o grupo suplementado com creatina teve diminuição dos valores de MDA sérico e hepático, assim como em nosso estudo. Assim, isolada ou associada ao etanol, a creatina diminuiu os valores de MDA nesse estudo e no nosso.

### **Fosfatase alcalina**

A combinação de etanol e creatina aumentou os valores de FAL (em todos os horários, exceto 24h).

Diferente do nosso estudo, a creatina diminuiu os valores de FAL em ratos sedentários suplementados com creatina no estudo de William Marciel Souza (37) e no estudo de Renato A. Souza e colaboradores (36).

### **Creatina**

A combinação de etanol e creatina elevou a concentração de creatina no soro, comparado ao grupo etanol (os horários 2 e 24H com diferença significativa).

Assim como vimos um menor valor de creatina no grupo alimentado com etanol, no estudo de Kharbanda (14), eles observaram uma diminuição de 60% dos níveis séricos de creatina nos ratos alimentados com etanol, comparados ao controle.

No estudo de Marinello e colaboradores (22), a associação de etanol e creatina aumentou os níveis de creatina no fígado.

### **Tocoferol hepático e sérico**

No soro, o etanol e a creatina, isolados e associados, aumentaram os valores do tocoferol, sendo que a combinação entre os dois obtiveram valores maiores (em todos os horários, exceto 2h).

Assim como no soro, a associação creatina e etanol elevaram a concentração de tocoferol hepático (em todos os horários, exceto 2h).

No estudo de Jordão (11), o grupo controle com dose aguda de etanol nos horários 2 e 8 horas tiveram menores valores de tocoferol hepático, assim como em nosso estudo.

No estudo de Deminice (27), não houve diferença significativa nem na análise hepática nem sérica do tocoferol.

### **Análise Histológica**

A combinação de etanol e creatina levou a uma maior degeneração celular significativamente e o etanol isolado causou maiores números de degeneração baloniforme.

No estudo de Marinello (22), também encontraram degeneração celular aumentada após 14 dias combinando etanol e creatina. No estudo de Souza (36) não houve diferença significativa da análise histológica dos grupos suplementados com creatina.

Os resultados de proteínas totais séricas e hepáticas, triglicérides séricos, colesterol, HDL não obtiveram resultados relevantes.

### **Conclusão**

Esses resultados contribuem para o crescimento do conhecimento da creatina e sua ação antioxidante, protetora ou não dos efeitos do etanol.

Com os nossos achados, vemos que a suplementação de creatina pode exacerbar os efeitos tóxicos hepáticos ocasionados pelo etanol, demonstrados pelas análises de ALT e FAL elevadas assim como a degeneração celular hepática significativa. Porém outros parâmetros nos fazem pensar na sua capacidade de proteção, como diminuição da gordura hepática, aumento da GSH, diminuição da peroxidação lipídica e aumento do tocoferol sérico e hepático.

No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer a ação protetora da creatina. Pensando em outras questões a serem levantadas: avaliação do consumo crônico e agudo tanto de etanol como creatina, pois a experimentação de modo agudo pode não refletir ainda todas as alterações hepáticas, quando comparamos com modelos de administração crônica. Também podem ser testadas outras doses de creatina, experimentalmente. Deve-se também ter um maior cuidado em relação a dieta, quantidade de calorias e contabilização do etanol para avaliar possível proteção da creatina frente aos efeitos do etanol.



O conjunto destes dados nos faz repensar sobre a nossa hipótese de proteção completa da creatina aos efeitos do etanol, devido a sua ação antioxidante, com alguns achados promissores como os já citados: aumento da glutatona reduzida, diminuição da peroxidação lipídica e aumento do tocoferol hepático.

### **Referências Bibliográficas**

1. YOON, Young-Hee; CHEN, Chiung M. Surveillance Report# 105: Liver cirrhosis mortality in the United States: National, state, and regional trends, 2000–2013. **National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA), Bethesda, MD, 2016.**
2. MINCIS, Moyses; MINCIS, Ricardo. Álcool e o Fígado. **GED gastroenterol. endosc. dig**, v. 30, n. 4, p. 152-162, 2011.
3. World Health Organisation. Global status report on alcohol and health 2014. Glob status Rep alcohol [Internet]. 2014;1–392. Available from: [http://www.who.int/substance\\_abuse/publications/global\\_alcohol\\_report/m\\_sbgstrupprofiles.pdf](http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/m_sbgstrupprofiles.pdf)
4. MACHADO, Ísis Eloah et al. Pesquisa Nacional de Saúde 2013: relação entre uso de álcool e características sociodemográficas segundo o sexo no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 20, p. 408-422, 2017.
5. ARTEEL, Gavin Edward. Acute alcohol-induced liver injury. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 193, 2012.
6. CHEN, Chen et al. The protective effects of Buzui on acute alcoholism in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.
7. BUCHO, Maria Sofia Correia Ribeiro da Cruz. **Fisiopatologia da Doença Hepática Alcoólica**. 2012. Tese de Doutorado. [sn].
8. CHEN, Peng et al. Supplementation of saturated long-chain fatty acids maintains intestinal eubiosis and reduces ethanol-induced liver injury in mice. **Gastroenterology**, v. 148, n. 1, p. 203-214. e16, 2015.
9. MATHURIN, Philippe; BATALLER, Ramon. Trends in the management and burden of alcoholic liver disease. **Journal of hepatology**, v. 62, n. 1, p. S38-S46, 2015.

10. MUNHOZ, Tiago N. et al. Tendências de consumo abusivo de álcool nas capitais brasileiras entre os anos de 2006 a 2013: análise das informações do VIGITEL. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, p. e00104516, 2017.
11. JORDÃO JR, Alceu Afonso et al. Effect of an acute dose of ethanol on lipid peroxidation in rats: action of vitamin E. **Food and chemical toxicology**, v. 42, n. 3, p. 459-464, 2004.
12. SONG, B. J.; CEDERBAUM, Arthur I. Ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1): biochemistry, molecular biology and clinical relevance: 1996 update. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 20, p. 138a-146a, 1996.
13. BROOKS, Phillip John. DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity—a review. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 21, n. 6, p. 1073-1082, 1997.
14. KHARBANDA, Kusum K. et al. Alcohol consumption decreases rat hepatic creatine biosynthesis via altered guanidinoacetate methyltransferase activity. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 38, n. 3, p. 641-648, 2014.
15. ARAÚJO, Michel B. et al. Creatine supplementation and oxidative stress in rat liver. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2013.
16. DEMINICE, Rafael et al. Suplementação de creatina, homocisteína e estresse oxidativo. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 40, n. 3, p. 368-377, 2007.
17. NAVARRO-ARÉVALO, Ana; SÁNCHEZ-DEL-PINO, María Jesús. Age and exercise-related changes in lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in liver and soleus muscle tissues of rats. **Mechanisms of ageing and development**, v. 104, n. 1, p. 91-102, 1998.
18. OGONOVSKY, Helga et al. The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers and DNA repair in rat liver. **Canadian journal of applied physiology**, v. 30, n. 2, p. 186-195, 2005.
19. LAWLER, John M. et al. Direct antioxidant properties of creatine. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 290, n. 1, p. 47-52, 2002.
20. COQUEIRO, Audrey Yule et al. Creatina como antioxidante em estados metabólicos envolvendo estresse oxidativo. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício (RBPFE)**, v. 11, n. 64, p. 128-137, 2017.
21. SESTILI, Piero et al. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 5, p. 837-849, 2006.

22. MARINELLO, Poliana Camila et al. Creatine supplementation exacerbates ethanol-induced hepatic damage in mice. **Nutrition**, v. 66, p. 122-130, 2019.
23. COSTA, Carolina M. da; DOS SANTOS, Rita CC; LIMA, Emerson S. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, v. 42, p. 345-350, 2006.
24. GONALL, A. G. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem**, v. 177, p. 751-766, 1949.
25. TAUSSKY, Hertha H. et al. A microcolorimetric determination of creatine in urine by the Jaffe reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 208, p. 853-861, 1954.
26. DE SAEDELEER, M.; MARÉCHAL, Georges. Chemical energy usage during isometric twitches of frog sartorius muscle intoxicated with an isomer of creatine,  $\beta$ -guanidinopropionate. **Pflügers Archiv**, v. 402, n. 2, p. 185-189, 1984.
27. DEMINICE, Rafael et al. Effects of creatine supplementation on homocysteine levels and lipid peroxidation in rats. **British journal of nutrition**, v. 102, n. 1, p. 110-116, 2008.
28. BLIGH, E. Graham; DYER, W. Justin. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
29. GÉRARD-MONNIER, Dominique et al. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. **Chemical research in toxicology**, v. 11, n. 10, p. 1176-1183, 1998.
30. SEDLAK, Jozef; LINDSAY, Raymond H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.
31. ARNAUD, J. et al. Simultaneous determination of retinol,  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 572, n. 1-2, p. 103-116, 1991.
32. BRUNT, Elizabeth M. et al. Misuse of scoring systems. **Hepatology**, v. 54, n. 1, p. 369-370, 2011.
33. DEMINICE, Rafael et al. Creatine supplementation prevents the accumulation of fat in the livers of rats fed a high-fat diet. **The Journal of nutrition**, v. 141, n. 10, p. 1799-1804, 2011.
34. DEMORI, Ilaria et al. Combined effects of high-fat diet and ethanol induce oxidative stress in rat liver. **Alcohol**, v. 40, n. 3, p. 185-191, 2006.

35. STEFANI, Giuseppe Patrick et al. Effects of creatine supplementation associated with resistance training on oxidative stress in different tissues of rats. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2014.
36. SOUZA, Renato A. et al. Effects of high-dose creatine supplementation on kidney and liver responses in sedentary and exercised rats. **Journal of sports science & medicine**, v. 8, n. 4, p. 672, 2009.
37. SOUZA, William Marciel et al. Effects of creatine supplementation on biomarkers of hepatic and renal function in young trained rats. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 23, n. 9, p. 697-701, 2013.
38. JORDÃO JR, Alceu Afonso et al. Effect of an acute dose of ethanol on lipid peroxidation in rats: action of vitamin E. **Food and chemical toxicology**, v. 42, n. 3, p. 459-464, 2004.

## Apêndice 1. Aprovação do Comitê de Ética de Animais (CEUA/FMRP-USP)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CEUA  
FMRP-USP  
Comitê de Ética no Uso de Animais  
Replacement/Reduction/Refinement

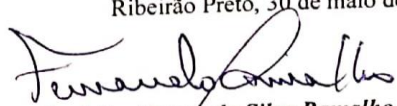
### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Efeitos da administração de altas doses de creatina e etanol no estresse oxidativo e função hepática em ratos*”, registrado com o número **077/2018**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 30 de maio de 2018.

Este Protocolo prevê a utilização de 77 ratos Wistar-OLD machos pesando 120g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 30/05/2018 a 02/07/2020.

We certify that the Protocol nº 077/2018, entitled “*Effects of administration of high doses of creatine and ethanol on oxidative and hepatic stress in rats*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 05/30/2018. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 77 male Wistar-OLD rats weighing 120g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 02/07/2020.

Ribeirão Preto, 30 de maio de 2018

  
**Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho**  
Coordenador do CEUA-FMRP - USP