

---

## Standardization of reference values of hepatic and renal biochemical markers in rats (*Rattus norvegicus*) Wistar lineage

### Padronização dos valores de referência de marcadores bioquímicos hepáticos e renais de ratos (*Rattus norvegicus*) linhagem Wistar

Received: 2023-02-10 | Accepted: 2023-03-20 | Published: 2023-03-30

---

#### **Kelly Costa de Almeida**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0956-6436>

Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia, Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: [kellycosta@id.uff.br](mailto:kellycosta@id.uff.br)

#### **Priscilla Rodrigues Câmara**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1168-1000>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: [priscilla\\_rodrigues@id.uff.br](mailto:priscilla_rodrigues@id.uff.br)

#### **Cláudia Martins Foly**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3049-7321>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: [claudiafolly@id.uff.br](mailto:claudiafolly@id.uff.br)

#### **Andréa Regina de Souza Baptista**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0461-7521>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: [andrearegina@id.uff.br](mailto:andrearegina@id.uff.br)

#### **Vinicius D'Avila Bitencourt Pascoal**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9009-1190>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: [viniciuspascoal@id.uff.br](mailto:viniciuspascoal@id.uff.br)

#### **Aislan Cristina Rheder Fagundes Pascoal**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4234-4843>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: [aislanfagundes@id.uff.br](mailto:aislanfagundes@id.uff.br)

---

### ABSTRACT

The biochemical parameters of laboratory animals may vary between different lineages and strains of a given species, being influenced by the microenvironment and macroenvironment of the vivarium for breeding and maintenance, as well as particularities of the method and commercial kit used in the analysis. This study aimed to determine the reference values for the hepatic and renal parameters of Unib-line Wistar rats. Forty healthy male Wistar rats were studied, weighing an average of 200 to 300g, from the Laboratory Animal Center of Federal Fluminense University. Quantitative biochemical analysis of the liver profile (AST, ALT, alkaline phosphatase, GT gamma, total proteins, albumin, total bilirubin, and direct bilirubin) and renal markers (urea and creatinine) was performed. The research data established liver and kidney analyte values that were compared with those described in the literature. From the standardization of reference values, it will be possible to optimize the time of experiments with Wistar rats as well as to reduce the number of animals used in the research.

**Keywords:** Biochemistry, rats, reference values.

---

### RESUMO

Os parâmetros bioquímicos de animais de laboratório podem variar entre linhagens e cepas de uma dada espécie, sendo influenciados pelo microambiente e macroambiente do biotério de criação e manutenção, assim como

particularidades do método e kit comercial utilizado na análise. O objetivo do estudo foi determinar os valores de referência para os parâmetros hepáticos e renais de ratos Wistar linhagem Unib. Foram utilizados 40 ratos Wistar, machos, saudáveis, pesando em média 200 a 300 g, oriundos do Núcleo de Animais de Laboratório da Universidade Federal Fluminense. Foi realizada a análise bioquímica quantitativa do perfil hepático (TGO, TGP, fosfatase alcalina, gama GT, proteínas totais, albumina, bilirrubina total e bilirrubina direta) e os marcadores renais (ureia e creatinina). Os dados da pesquisa estabeleceram valores de analitos hepáticos e renais que foram comparados com os descritos na literatura. Acredita-se que a padronização dos valores de referência, irá otimizar o tempo de experimentos com ratos Wistar bem como a redução dos números de animais utilizados na pesquisa.

**Palavras-chave:** Bioquímica; ratos; valores de referência.

---

## INTRODUÇÃO

Os modelos de pesquisa biomédica com animais começaram a ser utilizados há mais de 160 anos. Desde então, são considerados como uma importante ferramenta para o progresso da ciência, já que tais experimentos são úteis para a exploração de doenças humanas e sua causa, prevenção ou cura (IPL, 2021). Além disso, os modelos podem ser empregados no controle de produtos farmacêuticos, produção e desenvolvimento de vacinas, como também de novas técnicas de tratamento cirúrgico.

Animais de várias espécies têm sido utilizados nos últimos tempos, entretanto, os roedores são os mais estudados e também o modelo mais conhecido (MELO *et al.*, 2012). Essa preferência ocorreu, pois apresentam características como fácil domesticação, adaptação a ambientes variados e sociabilidade (MELO *et al.*, 2012). Entre as linhagens, a Wistar tem sido a escolha da maioria dos pesquisadores em diversos modelos de experimentação, pois além dos fatores acima citados, ela possui aproximadamente, 80% de seu DNA idêntico ao do homem (OSOEGAWA, 2004), permitindo que os resultados científicos obtidos possam ser replicados na estimativa de potenciais efeitos de dado tratamento em seres humanos (MATTARAIA; MOURA, 2012).

Os experimentos geralmente são realizados com machos, no intuito de evitar as variações fisiológicas inerentes às fases do ciclo estral. Os pesquisadores apoiam-se no fato de que as variações nos níveis dos hormônios gonadais influenciam em funções que vão além do sistema reprodutivo, podendo interferir nos resultados dos experimentos (MATTARAIA; MOURA, 2012).

Apesar de cada espécie de animal possuir seus próprios parâmetros fisiológicos, podem existir variações diretamente relacionadas com fatores extrínsecos como a dieta, manuseio, micro e macroambientes. Além disso, os animais experimentais podem se comportar de modo diferente dependendo das condições as quais são submetidos, sendo também passíveis de sofrer influência de fatores climáticos (BRANCO *et al.*, 2011), mesmo que sejam seguidas as diretrizes de instituições como do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (BONELLA, 2009). Nesse contexto, é

importante ressaltar que os parâmetros bioquímicos, como os hepáticos e renais, dos animais utilizados em experimentação também podem variar (MELO *et al.*, 2012).

Diante da importância das dosagens bioquímicas nos experimentos com modelos animais, se torna imprescindível uma padronização dos valores de referência relacionados ao biotério onde o experimento é realizado. Assim, os biotérios das instituições de pesquisas necessitam manter seu ambiente padronizado e seus parâmetros fisiológicos estabelecidos de acordo com a linhagem, gênero e idade de cada espécie utilizada para que possam servir como referência para os experimentos realizados (BRANCO *et al.*, 2011). Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi realizar a padronização de valores bioquímicos dos marcadores hepáticos e renais de ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), fornecidos pelo Núcleo de Animais de Laboratório/UFF – Niterói – RJ e mantidos no biotério do Laboratório Multiusuário de Pesquisa Biomédica, localizado no Instituto de Saúde de Nova Friburgo/UFF – RJ.

## METODOLOGIA

### *Animais*

Foram utilizados 40 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) adultos, pesando entre 200 e 300 gramas. Esses animais possuem sua matriz fundadora proveniente da Universidade de Campinas – SP, por isso recebem a identificação de Unib e sua distribuição se dá a nível nacional. Os animais foram submetidos à temperatura controlada, com ciclo claro/escuro de 12 horas e com ração e água *ad libitum*. Toda a manipulação dos animais respeitou as instruções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense e aprovado sob o nº 1313080119 (ID 000623).

### *Análise Bioquímica*

A obtenção do soro dos animais para a realização das análises bioquímicas, foi realizada via punção cardíaca, obedecendo as orientações da Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA. Os animais foram anestesiados com relaxante muscular – Xilazina (9 mg/kg solução à 2%) e anestésico geral – Ketamina (90 mg/kg solução à 10%) por meio de injeção intraperitoneal, numa dose de 3µl/g, em seguida sendo realizada a punção sanguínea no ventrículo esquerdo. O sangue coletado foi centrifugado à 3500 rpm durante 10 minutos, para a obtenção do soro. Para a realização das dosagens dos parâmetros, foram seguidas todas as recomendações do fabricante Biotécnica® (Tabela 1) e a leitura das amostras foi realizada utilizando espectrofotômetro Epoch (Biotek®). Todas as amostras foram testadas em triplicadas.

**Tabela 1:** Descrição da metodologia de análise para cada parâmetro.

PARÂMETRO	METODOLOGIA DE DOSAGEM				
	FILTRO	MÉTODOS	PRINCÍPIO DO MÉTODO	VOLUME DE AMOSTRA	VOLUME DE REAGENTE
TGO	340 nm	Cinético – UV	Aspartato aminotransferase (AST ou TGO) catalisa a transferência do grupo amino do aspartato a 2-cetoglutarato, formando oxalacetato e glutamato. A concentração catalítica se determina, empregando a reação acoplada de malato desidrogenase (MDH), a partir da velocidade de desaparecimento no NADH.	100 microlitros	1.000 microlitros
TGP	340 nm	Cinético – UV	Transaminase Glutâmico Pirúvica (ALT ou TGP) catalisa a transferência do grupo amino da alanina a 2-cetoglutarato, formando piruvato e glutamato. A concentração catalítica se determina, empregando a reação acoplada de lactato desidrogenase (LDH), a partir da velocidade de desaparecimento do NADH.	100 microlitros	1.000 microlitros
Fosfatase alcalina	405 nm	Cinético – Enzimático	A fosfatase alcalina em pH alcalino hidrolisa o p-nitrofenilfosfato, liberando p-nitrofenol e fosfato. A concentração catalítica da enzima presente na amostra é determinada a partir da velocidade de formação do p-Nitrofenol.	20 microlitros	1.000 microlitros
Gama GT	405 nm	Cinético – Enzimático	A Gama GT (GGT) catalisa a transferência do grupo glutamil da L-gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida para a glicilglicina, originando L-gama-glutamilglicilglicina e 5-amino-2-nitrobenzoato. A concentração catalítica da enzima presente na amostra é determinada a partir da velocidade de formação do 5-amino-2-nitrobenzoato.	100 microlitros	1.000 microlitros
Proteínas totais	550 nm	Ponto final – Biureto	Os ions cobre, em meio alcalino, reagem com as ligações peptídicas das proteínas formando um complexo colorido que apresenta máximo de absorção. A intensidade da cor é proporcional à concentração de proteínas na amostra.	10 microlitros	1.000 microlitros
Albumina	630 nm	Colorimétrico – Verde de Bromocresol	Em pH ácido, a albumina reage com o verde de bromocresol formando um complexo verde-azulado.	5 microlitros	1.000 microlitros
Bilirrubina total e frações	546 nm	Ponto final – Malloy modificado	A determinação baseia-se na reação diazo, que quantifica colorimetricamente (ponto final - Malloy Modificado) a formação de azoBilirrubina, de coloração vermelha, quando a bilirrubina reage sob determinadas condições com ácido sulfanílico diazotado. A intensidade da cor formada é proporcional à concentração de bilirrubina na amostra. Na presença de dimetilsulfóxido (acelerador) reagem a forma indireta (não-conjugada) e a forma direta (monoconjugada, diconjugada e ligada à proteína), determinando-se a bilirrubina total.	50 microlitros	1.000 microlitros
Ureia	340 nm	Cinético – Enzimático – UV	A ureia da amostra é hidrolisada pela enzima urease com produção de gás carbônico e ions amônio. Estes são captados por uma segunda enzima, a glutamato desidrogenase, que em presença dos substratos NADH e Alfa-cetoglutarato produz NAD <sup>+</sup> e glutamato. A taxa de diminuição da concentração de NADH no meio pode ser medida no espectrofotômetro em 340 nm, sendo proporcional à concentração de ureia na amostra.	10 microlitros	1.000 microlitros
Creatinina	505 nm	Colorimétrico – Jaffe modificado	A creatinina da amostra reage com o picrato em meio alcalino originando um complexo de cor laranja-avermelhado. A intensidade da cor formada é proporcional a concentração de creatinina na amostra.	100 microlitros	1.000 microlitros

\*nm: nanômetros

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na literatura, foi possível verificar trabalhos que utilizaram o modelo animal em ratos, com as linhagens Sprague Dawley e Wistar, conforme a tabela 2. Os animais de ambas as linhagens são ratos albinos, de classificação genética heterogênea. Embora a Sprague Dawley seja caracterizada pelo seu comportamento dócil e rápido ganho de peso, a linhagem Wistar se destaca nos trabalhos, sendo uma das mais utilizadas ao redor do mundo, devido ao seu pequeno porte, ciclo biológico curto, baixo custo de criação e semelhança genética com os seres humanos, como citado anteriormente (OSOEGAWA, 2004). A grande incidência de utilização dessa linhagem, torna mais evidente a importância na aquisição de dados referentes a esses animais e que possam ser reproduzidos em outros experimentos.

Apesar de alguns autores utilizarem grupos de fêmeas para maior análise populacional, como Melo *et al.*, (2012) e El-Boshy *et al.*, (2019), a maioria dos desenhos experimentais optam por machos, visando mitigar as possíveis interferências hormonais das fêmeas, que poderiam ser utilizadas numa segunda etapa do experimento.

É importante salientar, que Wistar é uma linhagem heterogênea e que esse fato deve ser levado em consideração na definição do número de animais por grupo, pois já é esperada uma variação considerável e conseqüentemente, um desvio padrão mais elevado quando comparado com outras linhagens isogênicas. Com relação a idade dos animais, na triagem realizada, ficou evidenciada a preferência pela utilização de animais jovens, pesando em média 250 gramas.

**Tabela 2:** Comparação da linhagem, gênero e peso utilizados neste estudo, com outras pesquisas e fontes que dosaram parâmetros semelhantes (g: gramas).

	ESPÉCIE	SEXO	PESO (g)
Rašković <i>et al.</i> (2019)	Wistar	Machos	200 a 300
Melo <i>et al.</i> (2012)	Wistar	Machos e fêmeas	140 a 310
Lima <i>et al.</i> (2014)	Wistar	Machos e fêmeas	140 a 310
Castelo Branco <i>et al.</i> (2011)	Wistar	Machos e fêmeas	150 a 350
El-Boshy <i>et al.</i> (2019)	Wistar	Machos e fêmeas	150 a 170
O.O. Adewale <i>et al.</i> (2019)	Wistar	Machos	160 a 210
Temel <i>et al.</i> (2019)	Wistar	Machos	220 a 240
Abdeen <i>et al.</i> (2019)	Wistar	Machos	170 a 200
Abdulrazzaq <i>et al.</i> (2019)	Sprague Dawley	Machos	220 a 260
Ahmad <i>et al.</i> (2020)	Wistar	Machos	180 a 200
Ahmad <i>et al.</i> (2019)	Wistar	Machos	150 a 180
Ahmed <i>et al.</i> (2019)	Wistar	Machos	130 a 150
Azarmehr <i>et al.</i> (2019)	Wistar	Machos	200 a 250
Dogaru <i>et al.</i> (2020)	Wistar	Machos	200 a 250
Mohammadi <i>et al.</i> (2019)	Wistar	Machos	160 a 200
Pingili <i>et al.</i> (2019)	Wistar	Machos	180 a 220
Rašković <i>et al.</i> (2019)	Wistar	Machos	250 a 300
Salman <i>et al.</i> (2020)	Wistar	Machos	130 a 150
Sohail <i>et al.</i> (2019)	Sprague Dawley	Machos	150 a 200
Zakaria <i>et al.</i> (2019)	Sprague Dawley	Machos	180 a 200
Hussain <i>et al.</i> (2020)	Wistar	Machos	170 a 220
Mahaldar <i>et al.</i> (2020)	Sprague Dawley	Machos	Não informado
Shehab <i>et al.</i> (2020)	Wistar	Machos	200 a 250
Al-Doaiss <i>et al.</i> (2020)	Wistar	Machos	150 a 200
Taha <i>et al.</i> (2020)	Wistar	Machos	150 a 200

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial definem “valor de referência” como um resultado obtido pela observação ou mensuração quantitativa de um analito em indivíduo selecionado, com base em critérios bem definidos (CLSI, 2000). O presente trabalho buscou estabelecer tais valores para analitos renais e hepáticos com animais em estado de homeostasia, conforme evidenciado nas tabelas 3 e 4, permitindo que esses dados sejam utilizados como referência e auxiliem em pesquisas futuras.

Dos marcadores laboratoriais séricos utilizados no diagnóstico da lesão hepática, as transaminases, representam indicadores universalmente importantes para estudos que vão desde os primeiros testes pré-clínicos em animais ao monitoramento pós-comercialização do paciente (AMACHER, 1998). A alanina aminotransferase (TGP) é altamente específica para o fígado, enquanto

que a aspartato aminotransferase (TGO) também está localizada no coração, cérebro, rim, e músculo esquelético, isso a torna menos específica para avaliação de lesão hepática (REJ, 1978).

As atividades das aminotransferases séricas estão aumentadas em todos os tipos de lesão hepática, mas fornecem apenas uma estimativa da quantidade de danos recentes, não sendo capaz de indicar a capacidade funcional residual do órgão (TYGSTRUP, 1990). O grau de aumento não se correlaciona bem com a extensão de lesão hepática ou prognóstico (FRIEDMAN, 1994). Um declínio das concentrações de atividade no soro geralmente indica recuperação, mas em lesão fulminante pode ser um sinal de mau prognóstico, refletindo uma grande perda de hepatócitos funcionais (REJ, 1978).

Os resultados para a TGP observados no presente estudo, apresentaram média de 44,9 U/I com desvio padrão de 5,82 U/I. Resultados próximos foram descritos em trabalhos como de Melo *et al.* (2012), Lima *et al.* (2014), Temel *et al.* (2019) e Shehab *et al.* (2020). Em relação ao desvio padrão dos trabalhos, foi bem variável, com valores que de 0,11 U/I até 17,67 U/I. Quanto as dosagens de TGO, essas apresentaram média de 105 U/I, valores próximos aos descritos por Azarmehr *et al.* (2019), Mohammadi *et al.* (2019) e Rašković *et al.* (2019). O desvio padrão encontrado nos nossos resultados foi de 7,5 U/I, menor entre esses trabalhos, no entanto, no geral os desvios de todos apresentou variação entre 0,12 U/I e 24,09 U/I (Tabela 3).

Embora as enzimas sejam dosadas frequentemente, quando o se trata de um exame de prova de função hepática, existem outros parâmetros como fosfatase alcalina, proteínas totais, albumina, bilirrubinas totais e frações. Para estudos que visam à pesquisa de novos fármacos com ação hepatoprotetora, esses valores são capazes de fornecer um panorama mais amplo do processo hepático agudo e/ou crônico.

A fosfatase alcalina é muito utilizada na análise da alteração hepática, no entanto, a sua especificidade para o fígado não é tão eficaz quando comparado com as transaminases, pois ela está aumentada em várias outras condições (particularmente doenças ósseas, surtos de crescimento ou gravidez) (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018). Os ácidos biliares são responsáveis por esse aumento, pois induzem a sua síntese e exercem um efeito detergente na membrana canalicular, permitindo o extravasamento no soro (FRIEDMAN, 1994). Em contraste com TGO e TGP, o nível sérico de fosfatase está relacionado à função da célula hepática ao invés de sua integridade (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018). Outra situação que dificulta a comparação dos valores de fosfatase são seus valores de referência, que podem variar de acordo com o fabricante e método utilizados, podendo esse ser colorimétrico com variações, como Bowers e McComb modificado, German Society of Clinical Chemistry (DGKC), International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) entre outros. A complexidade da padronização é tão significativa ao ponto de que na literatura é permitida uma variação de 35% nos valores para o cálculo dos intervalos (ABNT, 2005; ABNT 2011). O valor encontrado neste trabalho foi de 170 U/I, com desvio de 18,2 U/I, assim como o observado nos estudos de Pingili *et al.* (2019) e Castelo Branco

*et al.* (2011). No entanto, Lima *et al.* (2014) chegaram a descrever desvio de 35,55 U/I e Abdulrazzaq *et al.* (2019) de 58 U/I (Tabela 3), evidenciando a dificuldade descrita acima.

A gama glutamil transferase (gama GT) está presente em uma variedade de tecidos, incluindo coração, cérebro, rim, pâncreas, baço e as células do ducto biliar do fígado (AHMED *et al.*, 2018). Os seus valores se correlacionam bem com os da fosfatase alcalina, devido a isso geralmente as dosagens são realizadas em conjunto e seu uso primordial está na exclusão de doença óssea como causa do aumento, uma condição que não afeta as concentrações de GGT (LUM; GAMBINO, 1972). A gama GT é razoavelmente específica para o fígado, além de ser um marcador mais sensível para lesões colestáticas que a fosfatase, por esse motivo pode estar elevada até mesmo em pequenos níveis subclínicos de disfunção hepática (STURGILL; LAMBERT, 1997).

Todos os valores para gama GT obtidos neste trabalho, foram negativos. Acredita-se que seja devido à metodologia e ao kit utilizado na sua mensuração (Tabela 3). Esse analito é pouco descrito em outros trabalhos, mas alguns autores obtiveram sucesso na sua dosagem alcançando leitura na absorvância e conseqüentemente resultados positivos (LIMA *et al.*, 2014; AHMED *et al.*, 2018; TAHA; KAMAL, IBRAHIM, 2019).

A maioria das proteínas do sangue (albumina, alfa e beta globulina, fibrinogênio e outros fatores de coagulação) são sintetizadas principalmente no fígado, por células parenquimatosas. Dessa maneira, lesões hepáticas podem alterar a concentração dessas no sangue (DE ALMEIDA *et al.*, 2022).

Normalmente, a lesão do fígado causada por alguns fármacos, como paracetamol, inibe a síntese de proteínas totais e albumina (DE ALMEIDA *et al.*, 2022). Isto ocorre pois, quando administrados em excesso, levam a ruptura dos hepatócitos pela destruição de lipídios de membrana e oxidação de proteínas de membrana, juntos com disfunção mitocondrial (ABDEEN *et al.*, 2018). Conseqüentemente, ocorre queda na síntese de proteínas, ou proteólise aumentada e atividades de degradação no fígado (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018).

As proteínas totais não são frequentemente utilizadas como parâmetro isolado de diagnóstico, no entanto, são de grande importância na interpretação do perfil hepático completo. Elas foram dosadas por alguns autores e apresentam uma homogeneidade nos valores descritos, conseqüentemente com desvio padrão pequeno quando comparado aos outros analitos (Tabela 3).

Com relação à albumina, geralmente é solicitada juntamente com as proteínas totais, sendo considerada uma fração e/ou extensão desse exame. Assim como as proteínas totais, dificilmente ocorre uma pesquisa isolada e interpretação de resultados apenas com esse parâmetro. Outro ponto em comum, é que a variação dos resultados encontrados também foi pequena quando comparamos aos resultados de outros trabalhos (Tabela 3). Essa baixa variação dos valores encontrados de ambos analitos também é evidenciada nos valores de cálculos para intervalos (ABNT, 2005; ABNT 2011) onde a variação padronizada é de 12%. No entanto, Pingili *et al.* (2019) e Hussain *et al.* (2020) observaram resultados



bem discrepantes em comparação aos demais, em que a média dos trabalhos foi de 3,5 g/dL enquanto esses apresentaram resultados de 1,10 g/dL e 0,77 g/dL respectivamente. Nesse estudo, houve média de 3,33 g/dL com desvio de 0,15 g/dL (Tabela 3) semelhante ao encontrado por Melo *et al.* (2012), Ahmed *et al.* (2019) e Salman *et al.* (2020).

**Tabela 3:** Comparação de parâmetros TGO, TGP, fosfatase e gama GT, proteínas totais e albumina obtidos neste estudo, com os valores de outras pesquisas e fontes de referência.

PARÂMETROS	TGP (U/I)*	TGO (U/I)*	FOSFATASE (U/I)*	GGT (U/I)*	PROTEÍNAS TOTAIS (g/dL)	ALBUMINA (g/dL)**
RESULTS	44,9 ± 5,82	105 ± 7,5	170 ± 18,2	-0,55 ± 0,9	5,76 ± 0,23	3,33 ± 0,15
ABDEEN <i>et al.</i> (2019)	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****	6,33 ± 0,33	4,14 ± 0,25
ABDULRAZZAQ <i>et al.</i> (2019)	55 ± 6,5	190 ± 29	150 ± 58	**** ± ****	**** ± ****	4,6 ± 0,4
AHMAD <i>et al.</i> (2019)	34,15 ± 6	83 ± 10,5	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
AHMAD <i>et al.</i> (2020)	29,31 ± 2,02	37,51 ± 2,46	**** ± ****	**** ± ****	9,92 ± 0,58	**** ± ****
AHMED <i>et al.</i> (2019)	30,33 ± 0,91	66,66 ± 15,42	448 ± 17,93	3,5 ± 0,43	**** ± ****	3,23 ± 0,08
AL-DOAISS <i>et al.</i> (2020)	48,34 ± 3,4	85,23 ± 6,4	75,14 ± 2,3	**** ± ****	6,5 ± 0,34	**** ± ****
AZARMEHR <i>et al.</i> (2019)	29,85 ± 3,78	110,83 ± 12,76	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
DANTAS <i>et al.</i> (2011)	61 ± 2,4	152,4 ± 6,5	184 ± 8	**** ± ****	6,1 ± 0,1	3 ± 0
DOGARU <i>et al.</i> (2020)	34,28 ± 2,69	30,14 ± 3,62	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
HADDA <i>et al.</i> (2019)	41,2 ± 3,29	52,8 ± 3,56	118,2 ± 6,21	**** ± ****	7,56 ± 0,49	3,7 ± 0,14
HUSSAIN <i>et al.</i> (2020)	4,2 ± 0,41	18,16 ± 2,71	209,79 ± 6,9	**** ± ****	1,017 ± 0,19	0,8 ± 0,03
KANDEMIR <i>et al.</i> (2019)	38,76 ± 0,75	55,14 ± 1,26	74,21 ± 0,85	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
LIMA <i>et al.</i> (2014)	57,55 ± 11,95	131,33 ± 43,98	91,63 ± 28,7	3,47 ± 1,74	5,75 ± 0,87	2,65 ± 0,3
MAHALDAR <i>et al.</i> (2020)	66,67 ± 6,25	131,83 ± 5,88	**** ± ****	**** ± ****	5,62 ± 0,12	2,75 ± 0,15
MELO <i>et al.</i> (2012)	48,4 ± 6,46	131,7 ± 23,09	127,1 ± 35,55	**** ± ****	6,2 ± 0,26	3 ± 0,12
MOHAMMADI <i>et al.</i> (2019)	110,34 ± 17,67	128,08 ± 24,09	280,65 ± 13,79	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
O.O. ADEWALE <i>et al.</i> (2019)	47,21 ± 6,1	121,13 ± 1,52	213,3 ± 4,32	**** ± ****	9,17 ± 0,57	4,03 ± 0,45
PINGILI <i>et al.</i> (2019)	262,01 ± 9,12	145,27 ± 21,42	167,05 ± 19,27	**** ± ****	8,66 ± 1,09	1,175 ± 0,07
RAŠKOVIĆ <i>et al.</i> (2019)	51,67 ± 8,73	127,5 ± 19,94	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
SALMAN <i>et al.</i> (2020)	36 ± 0,11	98 ± 0,12	282,14 ± 5,63	**** ± ****	6,12 ± 0,04	3,16 ± 0,01
SHEHAB <i>et al.</i> (2020)	46,67 ± 4,51	107,33 ± 5,86	116 ± 7	**** ± ****	6,2 ± 0,7	**** ± ****
SOHAIL <i>et al.</i> (2019)	38,3 ± 6,6	56,8 ± 4,1	77,6 ± 6,5	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
TAHA <i>et al.</i> (2020)	135 ± 1,8	251 ± 2,9	460,2 ± 9,8	49,4 ± 3,5	**** ± ****	**** ± ****
ZAKARIA <i>et al.</i> (2019)	15,83 ± 2,9	95,13 ± 5,9	117,7 ± 7	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****

\*U/I= unidade internacional

Além de várias funções normais, o fígado excreta o produto da decomposição da hemoglobina, a bilirrubina, na bile. A sua concentração tem sido usada para avaliar a lesão hepática induzida

quimicamente (SASIDHARAN *et al.*, 2010). Embora seja um parâmetro importante e um bom marcador para avaliar o funcionamento do fígado, ela não é muito eficaz na determinação da extensão da lesão hepatocelular (SASIDHARAN *et al.*, 2010).

Na rotina laboratorial as bilirrubinas fazem parte de um grupo de analitos que apresentam muita instabilidade quanto aos controles de qualidade, por se tratar de uma detecção muitas das vezes com valor pequeno, associada a fácil deterioração do reagente utilizado na sua reação. Os dados encontrados nesse estudo apresentaram uma média de 0,14 mg/dL com desvio de 0,02 mg/dL (Tabela 4) e corroboram com os experimentos de Hussain *et al.* (2020) e Mahaldar *et al.* (2020), porém esses apresentaram desvios de 0,10 e 0,13 respectivamente, maiores quando comparados com os do presente trabalho.

A bilirrubina direta foi compatível com o que foi descrito por Melo *et al.* (2012) e Lima *et al.* (2014), com média de 0,05 mg/dL (Tabela 4). É importante salientar que as diferenças encontradas nessas dosagens podem estar diretamente relacionadas às diversas apresentações de reagentes que variam de acordo com o fabricante. O fato de ter a apresentação monoreagente (um reagente) e bi-reagente (dois reagentes), influenciam diretamente na reação e no valor de referência do analito, impactando e dificultando a padronização do mesmo. Acredita-se, que esse seja um dos motivos pelo qual as bilirrubinas totais e frações não sejam amplamente dosadas, mesmo diante da sua importância quanto a função hepática.

A nefrotoxicidade causada por substâncias tem sido alvo de muitas pesquisas que analisam as possíveis alterações hepáticas causadas por medicamentos, isso devido ao fato, dela ocorrer em cerca de 1-2% dos doentes que apresentam dano hepático, sendo mais comum em crianças e adolescentes. (MAZER; PERRONE, 2008). É possível o desenvolvimento da toxicidade renal sem ocorrer hepatotoxicidade, o que nos leva a acreditar que são necessárias doses menores para induzir a nefrotoxicidade, como ocorre com o paracetamol (DE ALMEIDA *et al.*, 2022).

A ureia e creatinina são considerados preditores importantes, confiáveis e bem descritos na literatura para a investigação de nefrotoxicidade induzida por drogas em animais e no homem (AHMAD *et al.*, 2012), isso porque entre tantas as funções, uma das principais é a eliminação de substâncias tóxicas do organismo (SINGH *et al.*, 2016). Embora a creatinina seja mais específica do que a ureia na análise do estado de função renal, a análise da correlação desses analitos, permite a determinação da presença da doença renal intrínseca (orgânica) ou extrínseca (funcional) doença.

A ureia é formada no fígado como principal produto do metabolismo de nitrogênio, sendo excretada pelos rins (BAUM; DICHOSO; CARLTON, 1975). A creatinina é um produto do metabolismo muscular, e também é excretada pelos rins. Como sua única fonte é o metabolismo muscular, o único fator extrarrenal que pode afetar seu nível sérico é massa muscular. O nível de creatinina sérica é relativamente estável, variando não mais que 10 a 15 por cento de sua média em um

período de vinte e quatro horas. Portanto, é um índice mais sensível de função renal do que o nitrogênio ureico no sangue (BAUM; DICHOSO; CARLTON, 1975).

A ureia elevada pode causar distúrbios funcionais por exceder a taxa de depuração, enquanto que a creatinina elevada indica distúrbio na função do néfron (SRINIVASAN *et al.*, 2014), geralmente os autores optam por dosar ambas no mesmo experimento devido a sua correlação. Neste trabalho, foi identificada uma média de 45,75 mg/dL (desvio padrão de 5,95 mg/dL) e 0,60 mg/dL (desvio padrão de 0,07 mg/dL) para ureia e creatinina respectivamente (Tabela 4). Valores próximos foram encontrados por Castelo Branco *et al.* (2011) e El-Boshy *et al.* (2019). É possível verificar nos parâmetros pré-definidos de valores de referência, que o desvio padrão encontrado se manteve dentro do esperado, conforme consta na literatura, onde para ureia seria 18% e para creatinina 20% (ABNT, 2005; ABNT 2011).

**Tabela 4:** Comparação dos valores de bilirrubinas, ureia e creatinina obtidos neste estudo, com os valores de outras pesquisas e fontes de referência.

PARÂMETROS	BIL T (mg/dL)***	BIL D (mg/dL)	UREIA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)
RESULTS	0,14 ± 0,02	0,05 ± 0,02	45,75 ± 5,95	0,6 ± 0,07
ABDEEN <i>et al.</i> (2019)	**** ± ****	**** ± ****	32,5 ± 2,1	1,05 ± 0,07
ABDULRAZZAQ <i>et al.</i> (2019)	0,44 ± 0,03	0,26 ± 0,02	**** ± ****	**** ± ****
AHMAD <i>et al.</i> (2019)	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
AHMAD <i>et al.</i> (2020)	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
AHMED <i>et al.</i> (2019)	0,7 ± 0,05	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
AL-DOAISS <i>et al.</i> (2020)	1,57 ± 0,21	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
AZARMEHR <i>et al.</i> (2019)	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
DANTAS <i>et al.</i> (2011)	**** ± ****	**** ± ****	45,2 ± 2,3	0,3 ± 0,1
DOGARU <i>et al.</i> (2020)	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
HADDA <i>et al.</i> (2019)	**** ± ****	**** ± ****	40,1 ± 2,45	0,46 ± 0,07
HUSSAIN <i>et al.</i> (2020)	0,16 ± 0,1	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
KANDEMIR <i>et al.</i> (2019)	**** ± ****	**** ± ****	34,5 ± 0,6	0,44 ± 0,01
LIMA <i>et al.</i> (2014)	0,08 ± 0,04	0,03 ± 0,02	39,97 ± 6,78	0,58 ± 0,24
MAHALDAR <i>et al.</i> (2020)	0,19 ± 0,13	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
MELO <i>et al.</i> (2012)	0,07 ± 0,02	0,03 ± 0,02	35,9 ± 3,58	0,5 ± 0,05
MOHAMMADI <i>et al.</i> (2019)	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
O.O. ADEWALE <i>et al.</i> (2019)	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
PINGILI <i>et al.</i> (2019)	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
RAŠKOVIĆ <i>et al.</i> (2019)	**** ± ****	0,35 ± 0,1	**** ± ****	**** ± ****
SALMAN <i>et al.</i> (2020)	0,37 ± 0,02	0,1 ± 0,01	26,04 ± 0,68	0,54 ± 0,01
SHEHAB <i>et al.</i> (2020)	0,66 ± 0,38	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
SOHAIL <i>et al.</i> (2019)	0,9 ± 0,1	0,1 ± 0,05	21,5 ± 3,7	0,4 ± 0,1
TAHA <i>et al.</i> (2020)	0,78 ± 0,05	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****
ZAKARIA <i>et al.</i> (2019)	0,5 ± 0,2	**** ± ****	**** ± ****	**** ± ****

\*\*\* mg/dL: miligrama por decilitro.

## CONCLUSÃO

A partir da comparação dos dados encontrados na presente pesquisa com os resultados observados na literatura, foi possível constatar a variação quanto às dosagens séricas, reforçando a premissa de que a modificação na metodologia e kit, bem como a utilização de uma linhagem heterogênea, pode impactar potencialmente nos valores encontrados. Os resultados das dosagens obtidas a partir dos analitos estudados permitiram estabelecer valores de referência de parâmetros bioquímicos dos *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, matriz fundadora Unib (provenientes da Unicamp) e mantidos no Biotério do Laboratório Multiusuário de Pesquisa Biomédica, localizado no Instituto de Saúde de Nova Friburgo, os quais são usados em diversas linhas de pesquisas de graduação e pós-graduação, tanto em projetos da Universidade Federal Fluminense, como em projetos de colaboração com outras instituições de ensino. Acredita-se que os valores obtidos no presente trabalho, poderão contribuir com outras pesquisas que utilizem esse modelo animal e que optem por realizar uma análise bioquímica hepática e renal, dessa maneira mitigando o total de animais utilizados e otimizando o tempo de experimento.

## REFERÊNCIAS

ABDEEN, A. *et al.* Protective effect of cinnamon against acetaminophen-mediated cellular damage and apoptosis in renal tissue. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 1, p. 240–249, 3 nov. 2018. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30392171/>

ABDULKHALEQ, F. *et al.* Antioxidative stress effects of vitamins C, E, and B12, and their combination can protect the liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 12, p. 3525–3533, out. 2018. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30425454/>

ABDULRAZZAQ, A. M. *et al.* Hepatoprotective Actions of Ascorbic Acid, Alpha Lipoic Acid and Silymarin or Their Combination Against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Rats. **Medicina**, v. 55, n. 5, 21 maio 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31117289/>

AHMAD, S. T. *et al.* Hesperidin alleviates acetaminophen induced toxicity in wistar rats by abrogation of oxidative stress, apoptosis and inflammation. **Toxicology Letters**, v. 208, n. 2, p. 149–161, jan. 2012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22093918>

AHMED, O. M. *et al.* The Preventive Effects and the Mechanisms of Action of Navel Orange Peel Hydroethanolic Extract, Naringin, and Naringenin in N-Acetyl-p-aminophenol-Induced

Liver Injury in Wistar Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–19, 26 mar. 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31049130>

AHMED, Z. *et al.* Liver function tests in identifying patients with liver disease. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. Volume 11, p. 301–307, ago. 2018. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30197529/>

AMACHER, D. E. Serum Transaminase Elevations as Indicators of Hepatic Injury Following the Administration of Drugs. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 119–130, abr. 1998. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9671567/>

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais sobre a competência dos laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: **ABNT**; 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO/IEC 17043: Avaliação de conformidade - Requisitos gerais para Ensaios de Proficiência. Rio de Janeiro: **ABNT**; 2011.

AZARMEHR, N. *et al.* Hepatoprotective and antioxidant activity of watercress extract on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. **Heliyon**, v. 5, n. 7, p. e02072, jul. 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31334381/>

BAUM, N.; DICHOSO, C. C.; CARLTON, C. EUGENE. Blood urea nitrogen and serum creatinine. **Urology**, v. 5, n. 5, p. 583–588, maio 1975. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1093306/>

BONELLA, A. E. Animais em laboratórios e a lei Arouca. **Scientiae Studia**, v. 7, n. 3, p. 507–514, 2009.

BRANCO, A. C. DA S. C. *et al.* parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 2, p. 209–214, 17 out. 2011.

Clinical and Laboratory Standards Institute. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory. **Document C 28-A2**; 2000.

DE ALMEIDA, K. C. *et al.* Panorama atual do modelo de indução da hepatotoxicidade por paracetamol para estudos de hepatoproteção em ratos: Scoping review / Current overview of the model of induction of hepatotoxicity by paracetamol for studies of hepatoprotection in rats: Scoping review. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 2, p. 12529–12558, 17 fev. 2022.

EL-BOSHY, M. E. *et al.* The remedial effect of Thymus vulgaris extract against lead toxicity-induced oxidative stress, hepatorenal damage, immunosuppression, and hematological disorders in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 22, p. 22736–22746, 6 jun. 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31172438/>

FRIEDMAN, L. S. Diseases of the liver, seventh edition. Edited by L. Schiff and E. R. Schiff, 1,516 pp. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1993. \$195. **Hepatology**, v. 19, n. 3, p. 797–798, mar. 1994.

HUSSAIN, S. *et al.* Cinnamon oil against acetaminophen-induced acute liver toxicity by attenuating inflammation, oxidative stress and apoptosis. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 1296–1304, 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33024703/>

IPL, Advantages And Disadvantages Of Animal Experimentation, 2021| ipl.org acesso em 18 de abril de 2022

LIMA, C. M. *et al.* Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 7 abr. 2014.

LUM, G.; GAMBINO, S. R. Serum gamma-glutamyl transpeptidase activity as an indicator of disease of liver, pancreas, or bone. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 358–362, 1 abr. 1972. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5012259/>

MAHALDAR, K. *et al.* Antioxidant and hepatoprotective activity of Piper retrofractum against Paracetamol-induced hepatotoxicity in Sprague-Dawley rat. *Natural Product Research*, v. 34, n. 22, p. 3219–3225, 19 jan. 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30663362/>

MATTARAIA, V. G. DE M.; MOURA, A. S. A. M. T. Produtividade de ratos Wistar em diferentes sistemas de acasalamento. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1490–1496, ago. 2012.

MAZER, M.; PERRONE, J. Acetaminophen-induced nephrotoxicity: Pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Journal of Medical Toxicology**, v. 4, n. 1, p. 2–6, mar. 2008. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18338302/>

MELO, M. G. D. *et al.* Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 9, 2012.

MOHAMMADI, A. *et al.* Chrysin Effect in Prevention of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Rat. **Chemical Research in Toxicology**, v. 32, n. 11, p. 2329–2337, 18 out. 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31625388/>

OSOEGAWA, K. BAC Resources for the Rat Genome Project. **Genome Research**, v. 14, n. 4, p. 780–785, 1 abr. 2004. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15060022/>

PINGILI, R. B.; PAWAR, A. K.; CHALLA, S. R. Effect of chrysin on the formation of N-acetyl-p-benzoquinoneimine, a toxic metabolite of paracetamol in rats and isolated rat hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 302, p. 123–134, abr. 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30794797/>

RAŠKOVIĆ, A. *et al.* Hepatoprotective and antioxidant potential of Pycnogenol® in acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. **Phytotherapy Research**, 16 dez. 2018. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30556209/>

REJ, R. Aspartate aminotransferase activity and isoenzyme proportions in human liver tissues. **Clinical Chemistry**, v. 24, n. 11, p. 1971–1979, 1 nov. 1978. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30556209/>

SALMAN, A. A. *et al.* Assessment of antioxidant traits and protective action of Egyptian acacia pods extracts against paracetamol-induced liver toxicity in rats. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 9, 21 jul. 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32691869/>

SASIDHARAN, S. *et al.* In Vitro Antioxidant Activity and Hepatoprotective Effects of Lentinula edodes against Paracetamol-Induced Hepatotoxicity. **Molecules**, v. 15, n. 6, p. 4478–4489, 23 jun. 2010. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20657455/>

SHEHAB, N. G. *et al.* Preparation and antihepatotoxicity activity of Fagonia indica extract and its solid dispersion formulation. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, n. 3, p. 1025–1032, 1 maio 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33191226/>

SINGH, H. *et al.* Hepatoprotective effect of trans-Chalcone on experimentally induced hepatic injury in rats: inhibition of hepatic inflammation and fibrosis. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 94, n. 8, p. 879–887, ago. 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27191034/>

SRINIVASAN, V.; PANNEERSELVAM, R.; GUNASEKARAN, S.; SUBRAMANI, PALANI. Ethanolic extract of Melia Azadirachta against acetaminophen induced nephrotoxicity. **International Journal of PharmTech Research**, n. 6, p. 70-79, jan. 2014.

STURGILL, M. G.; LAMBERT, G. H. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 8 Pt 2, p. 1512–1526, 1 ago. 1997. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9265903/>

TAHA, M. E.-S.; KAMAL, A. M.; IBRAHIM, D. R. Possible protective effect of olive leaves extract on paracetamol induced hepatotoxicity in male albino rats. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 1, 31 out. 2019.

TEMEL, Y. *et al.* Protective effect of chrysin on cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via the inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 393, n. 3, p. 325–337, 16 out. 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31620822/>

TYGSTRUP, N. Assessment of liver function: Principles and practice. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, n. 4, p. 468–482, ago. 1990. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2129819/>