



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

FERNANDO CEZAR FAÇANHA FONSECA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA BERGENINA E DO EXTRATO SECO
DA *ENDOPLEURA UCHI* NO TRATAMENTO DA OBESIDADE E DA ESTEATOSE
HEPÁTICA INDUZIDA EM CAMUNDONGOS.**

**MANAUS-AM
(2019)**

FERNANDO CEZAR FAÇANHA FONSECA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA BERGENINA E DO EXTRATO SECO
DA *ENDOPLEURA UCHI* NO TRATAMENTO DA OBESIDADE E DA ESTEATOSE
HEPÁTICA INDUZIDA EM CAMUNDONGOS.**

Tese de doutorado apresentado à banca examinadora do Programa de Pós-graduação Multi-Institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como parte integrante para a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Rosany Piccolotto Carvalho

Co-Orientador: Prof. Dr Emerson Silva Lima

Colaboradora: Profa. Dra. Rita de Cássia Nunomura

**MANAUS-AM
(2019)**

FICHA CATALOGRÁFICA

F676_a FONSECA, Fernando Cezar Façanha.

Avaliação do efeito protetor da Bergenina e do extrato seco da *Endopleura uchi* no tratamento da obesidade e da esteatose hepática induzida em camundongos. Fernando Cezar Façanha Fonseca. Manaus-AM: UFAM, 2019.

95 p. il 44.

Tese de doutorado apresentado ao Programa de pós-graduação Multi-Institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como pré-requisito para a obtenção do grau de Doutor na área de saúde.

Orientador(a): Profa. Dra. Rosany Piccolotto Carvalho

Co-orientador(a): Prof. Dr Emerson Silva Lima

Colaborador(a): Profa. Dra. Rita de Cássia Nunomura

Título em Inglês: Evaluation of the protective effect of Bergenine and dry Extract of *Endopleura uchi* in the treatment of obesity and steatosis induced in mice.

Key words: 1. *Endopleura uchi*, 2. Bergenina, 3. Esteatose Hepática, 4. Síndrome Metabólica, 5. Obesidade.

I. Carvalho, Rosany Piccolotto (Orient.) II. Lima, Emerson Silva (Co-orient.)
III. Universidade Federal do Amazonas.

Ficha Catalográfica elaborada pela bibliotecária Marilene de Sena e Silva.
CRB - 11-AM 561.



253ª. ATA DE DEFESA DE TESE

No dia 14 de novembro (quinta-feira) de 2019, às 08h:00 no auditório do Bloco M, Mini-Campus, Setor Sul – UFAM. **Fernando Cezar Façanha Fonseca** defendeu sua Tese de Doutorado intitulada: “Avaliação do efeito protetor da Berberina e do extrato seco da *Endopleura uchi* no tratamento da obesidade e da esteatose hepática induzida em camundongos”.

Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Dra. Rosany Piccolotto Carvalho	Aprovado (<input checked="" type="checkbox"/>) Reprovado ()	Assinatura: CPF: 345023550-68
Dra. Aparecida Emiko Hirato	Aprovado (<input checked="" type="checkbox"/>) Reprovado ()	Assinatura: CPF: 05725105865
Dr. Gerson Sugiama Nakajima	Aprovado (<input checked="" type="checkbox"/>) Reprovado ()	Assinatura: CPF: 033.545.928-50
Dra. Adele Salomão de Oliveira	Aprovado (<input checked="" type="checkbox"/>) Reprovado ()	Assinatura: CPF: 806.686.311-04
Dr. Arteiro Queiroz Menezes	Aprovado (<input checked="" type="checkbox"/>) Reprovado ()	Assinatura: CPF: 405.363.862-34

Manaus, 14 de novembro de 2019.

Resultado Final: Aprovado(a) ()
Reprovado(a) ()

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia

Prof. Dr. Ed. Carlos de Andrade
Coordenador

Coordenador do PPGBIOTEC/UFAM

DEDICATÓRIA

À minha família (pais, esposa, filhos e irmãos) por terem sido compreensivos com minha ausência durante essa jornada, essa vitória é nossa. Todas as minhas conquistas só foram possíveis graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. E graças à união de todos, os obstáculos foram ultrapassados, vitórias foram alcançadas e alegrias divididas. Agradeço pela paciência e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Deus por minha vida e pelas conquistas. Tu és o Deus que opera quando o homem diz: “Não dá”. E abre um caminho onde solução “não há”.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) por ter me proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Rosany Piccolotto Carvalho, pela confiança em compartilhar seu conhecimento, tempo e experiência.

Ao co-orientador Prof. Dr. Emerson Silva Lima, pelo apoio e disponibilidade que foram fundamentais para a realização do estudo.

À Dra. Suely de Souza Costa pela ajuda preciosa, disponibilidade e imensurável contribuição no desenvolvimento das análises estatísticas.

À Helita da Conceição Cardoso, pela ajuda de forma amiga e generosa. Agradeço pela amizade, apoio e sua sempre inteira disponibilidade.

EPÍGRAFE

Profissional de talento é aquele que soma dois pontos de esforços, três pontos de talento e cinco pontos de caráter.

Roland Barthes

Operar é divertido, é uma arte, é ciência e faz bem aos outros.

Euryclides de Jesus Zerbini.

LISTA DE QUADROS

1	Mutações identificadas em avaliações de peças histológicas ou da gordura hepática	56
2	Classificação da Esteato-Hepatite Não-Alcoólica (EHNA)	31
3	Características dos grupos de camundongos estudados	56
4	Procedimentos de tóracolaparotomia dos grupos de camundongos estudados	57

LISTA DE TABELAS

1	Avaliação bioquímica realizada por Santo <i>et al.</i> (2016)	48
2	Dados da concentração de Bergenina, nos extratos aquosos das cascas de <i>Endopleura uchi</i>	61
3	Análise da composição da RH no laboratório de nutrição do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA.....	63
4	Análise da composição bioquímica dos animais tratados profilaticamente <i>versus</i> grupos controles.....	69
5	Análise bioquímica dos animais submetidos a tratamento curativo <i>versus</i> grupos controles	70
6	Distribuição do percentual dos animais alimentados com dieta padrão (GM1) e animais com RH (GM2) <i>versus</i> grau de esteatose	73
7	Distribuição do percentual de esteatose no grupo GM2 e nos animais com tratamento profilático (GM5, GM6, GM9 e GM10) <i>versus</i> graus de esteatose	74
8	Distribuição do percentual de animais nos animais dos (GM2, GM3, GM4, GM7, GM8) <i>versus</i> graus de esteatose	75

LISTA DE FIGURAS

1-A	Árvore da <i>Endopleura uchi</i>	50
1-B	Coleta da casca da <i>Endopleura uchi</i>	50
1-C	Preparação do chá popular de <i>Endopleura uchi</i>	50
2-A	Ração balanceada (TEKLAD, GLOBAL DIETS)	52
2-B	Ração hiperlipídica moldada em formato de rolha	52
3	Delineamento do estudo	53
4	Análise cromatográfica do extrato seco das cascas de <i>E. uchi</i> na concentração de 200 µg/mL	60
5	Curva de calibração da Bergenina obtida após análises em triplicata intra-day e inter-day	61
6-A	Cromatografia dos exames de pureza da Bergenina	62
5-B	Análise cromatográfica do padrão de Bergenina na concentração de 200 µg/mL	62
7	Grupo controle negativo (A-GM1, B-GM2, C-GM5, D-GM6, E-GM9, F-GM10)	65
8	Grupo de tratamento curativo (A-GM3, B-GM4, C-GM7, D-GM8)	67
9	Grupo de tratamento profilático (A-GM1, B-GM2, C-GM5, D-GM6, E-GM9, F-GM10)	71
10	Grupo de tratamento curativo A e B (GM3, GM4, GM7, GM8)	72

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ADGAT2	Diacylglycerol O-Acyltransferase 2
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
C/EBP α	Control /enhancer binding protein alfa
C/EBP α -p300	Control /enhancer binding protein alfa- p30
C/EBP β	Control /enhancer binding protein beta
CCL4	Tetracloroeto de Carbono
CCR2.....	Chemokine receptors-2
CH	Cirrose Hepática
CHC	Carcinoma Hepato Celular
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
<i>E.uchi</i>	<i>Endopleura uchi</i>
EH	Esteatose Hepática
EHNA	Esteato Hepatite Não Alcoólica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fosfatase Alcalina
FAS	Proteína integrante de membrana, indutora de apoptose análoga ao TNF alfa.
FDFT1	Farnesyl-diphosphateFarnesyltransferase
FIB-4	Fibrose 4
GCGR	Glucokinase regulator
GGT	Gama Glutamil Transferase
GRACE	Global Registry of Acute Coronary Events
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL	Conhecido como “bom colesterol ”
IC	Intervalo de Confiança
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IMC	Índice de Massa Corporal
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LYPLAL1	LysophoslipaseLike 1
LDL-C.....	Lipoproteína de baixa densidade
mg	Medida de peso (miligrama)
NAFLD	Non alcoholic fatty liver disease
NCAN	Neurocan
NAS	Non alcoholic Steatohepatitis score
NASH.....	Non alcoholic steatohepatitis
NFS	Fibrose score
NIH	NationalInstitute of Health
OR	OddsRatio (medida de intensidade de associação)
PAIC	Programa de Iniciação Científica
PNPLA3	Patin like phospholipase domain contain 3
PPAR α	Peroxisomeproliferators- activatedreceptos
PPP1R3B.....	Protein phosphatase 1 regulatory sub unit 3B

RH	Ração Hiperlipídica
RI	Resistência Insulínica
SAF	<i>Steatosis, Activity and Fibrosis</i>
SM	Síndrome Metabólica
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
IL	Interleucinas
IFN	Interferon
TM6SF2	Transmembrane 6 superfamily Member 2
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1	DHGNA: DEFINIÇÃO E HISTÓRICO	19
3.2	HISTÓRIA NATURAL	19
3.3	EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO	21
3.3.1	Prevalência da DHGNA	21
3.3.2	Fatores de risco associados à DHGNA	22
3.3.3	Prevalência da DHGNA em população específica	23
3.3.4	Distribuição da DHGNA por gênero	23
3.4	APRESENTAÇÃO E PERFIL CLÍNICO DOS PORTADORES DE DHGNA .	23
3.5	FISIOPATOLOGIA E FATORES PREDISPOANTES À DHGNA.....	25
3.6	FATORES GENÉTICOS	26
3.7	PROGRESSÃO PARA EHNA	28
3.8	ESTRESSE OXIDATIVO	29
3.9	CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS	30
3.10	CLASSIFICAÇÃO DA DHGNA	30
3.10.1	Classificação de Brunt	30
3.10.2	Classificação de Matteoni	31
3.10.3	NAS	31
3.10.4	SAF Score	32
3.11	ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DA DHGNA	33
3.12	CARÁTER SISTÊMICO	34
3.13	DIAGNÓSTICO DA DHGNA	36
3.14	EXAMES SÉRICOS	36
3.15	EXAME DE IMAGEN	37
3.15.1	Ultrassonografia	37
3.16	EXAMES INVASIVOS	38
3.17	TRATAMENTO	39
3.18	PROGNÓSTICO	41
3.18.1	Esteatose hepática experimental	42
3.19	<i>ENDOPLEURA uchi</i> : CARACTERIZAÇÃO E USO POPULAR	43
3.20	ANÁLISES FITOQUÍMICAS E PROPRIEDADES DO UCHI AMARELO ...	44
3.21	TOXICIDADE DA <i>ENDOPLEURA uchi</i>	45
3.22	BERGENINA: CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES	45
3.23	PANORAMA DOS TRABALHOS DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL NO CONTEXTO DA DHGNA	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1	AQUISIÇÃO DA <i>ENDOPLEURA uchi</i>	50
4.1.1	Preparação do extrato seco	50
4.2	AQUISIÇÃO DA BERGENINA	51
4.2.1	Preparação da solução aquosa da Bergenina	51

4.3	RAÇÃO	51
4.3.1	Preparação da ração	52
4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ANIMAIS.....	56
4.6	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	57
4.7	ANÁLISES BIOQUÍMICA	56
4.8	ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA	58
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
4.10	ASPECTOS ÉTICOS	59
5	RESULTADOS	60
5.1	ANÁLISE DO EXTRATO SECO DE <i>ENDOPLEURA uchi</i> versus CONCENTRAÇÃO DE BERGENINA NOS EXTRATOS	60
5.1.1	Cromatograma do Extrato Seco e da Bergenina	60
5.2	ANÁLISE DA PUREZA DA BERGENINA COMERCIAL	62
5.3	DIETA DOS ANIMAIS (RAÇÃO HIPERLIPÍDICA-RH)	63
5.4	EFEITO DO TRATAMENTO PROFILÁTICO SOBRE A MASSA CORPORAL	63
5.5	EFEITO DO TRATAMENTO CURATIVO SOBRE A MASSA CORPORAL	65
5.6	EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	68
5.7	ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA DOS FÍGADOS DOS CAMUNDONGOS	71
5.7.1	Tratamentos profiláticos	71
5.7.2	Tratamentos curativos	72
5.7.3	Grau de esteatose	72
6	DISCUSSÃO	76
7	CONCLUSÃO	81
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

ANEXOS:

- A. Certificado protocolo do Comitê de Ética
- B. Certificado de análises do CN LabNutrition

APÊNDICES:

- A. Protocolo para avaliação histológica.
- B. Quadro de análise descritiva dos resultados bioquímicos dos tratamentos profiláticos.
- C. Artigo publicado, 2018 (Efeito do chá de uxi (*Endopleura uchi*) na esteatose hepática.
- D. Artigo submetido, 2019 (Use of *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec tea to preclude induced obesity through na experimental model.

RESUMO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) tem sido considerada a forma mais frequente de doença hepática no mundo ocidental, devido ao aumento de prevalência da obesidade nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec é uma espécie de árvore nativa da Amazônia com propriedades fitoterápicas comprovadas em vários trabalhos de pesquisadores da região e do mundo. Da sua casca é isolada uma substância chamada Bergenina, que apresenta entre suas propriedades, atividades antioxidantes, hepatoprotetoras e hipolipemiantes. O objetivo deste estudo foi avaliar o Efeito Protetor da Bergenina e do Extrato seco da *Endopleura uchi* (*E. uchi*), no tratamento da DHGNA induzida em camundongos e na obesidade. A DHGNA e obesidade foram induzidas em camundongos C57BL/6J machos por meio de Ração Hipercalórica e Hiperlipídica (RH). Foram utilizados 60 camundongos C57BL/6J, machos, divididos em 10 grupos de seis animais cada, com as seguintes características: GM1, Controle Negativo; GM2, Grupo Sham: Controle Positivo; GM3, alimentados com RH por oito semanas e em seguida, tratados com extrato seco de *Endopleura uchi*, 200mg/kg/dia, por sete semanas; GM4, semelhante ao anterior, tratado com 100mg/kg/dia de extrato de *E. uchi*; GM5, Alimentados com RH por sete semanas e, tratado concomitantemente com 200mg/kg/dia de extrato seco de *Endopleura uchi*; GM6, semelhante ao GM5, tratado com 100mg/kg/dia, a fim de verificar um potencial efeito profilático em ambas as doses. Grupos GM7 e GM8, alimentados com RH por oito semanas e tratados em seguida com 50 e 25mg/kg/dia, por sete semanas com solução aquosa de Bergenina respectivamente; GM9 e GM10, semelhantes aos grupos profiláticos GM5 e GM6 e tratados com solução aquosa de Bergenina nas doses de 50 e 25 mg/kg/dia, respectivamente. Foram realizado exames bioquímicos de prova de função hepática e histopatologia, a fim de comprovarem os efeitos anti obesidade e no tratamento da DHGNA, de ambas as soluções. Foi realizada análise descritiva dos dados e os resultados estão apresentados em tabelas, figuras e medidas descritivas, tais como média, erro padrão, dentre outras. Para verificar a influência dos tratamentos, foi utilizada ANOVA com teste *post hoc* de Student Newman Keuls. Havendo influência significativa dos tratamentos, foi utilizado o teste de Tukey para verificar as diferenças entre as médias dos grupos. Em todas as comparações foi considerado estatisticamente significante quando $p < 0,05$. Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o software *SPSS Statistics* versão 14.0. Como resultado, foi verificado que a RH, foi eficiente em desenvolver obesidade e esteatose hepática (EH), em 100% dos animais do grupo GM2, controle positivo. Tanto o tratamento profilático como o tratamento pós-indução, foram eficientes em conter o desenvolvimento da obesidade e da EH. Na DHGNA e na obesidade, o tratamento com ambas as soluções, em suas doses maiores, foram eficientes em reduzir o grau de esteatose de forma significativa, com redução de 50% das esteatoses grau 2 no grupo tratado com 200mg/kg/dia de extrato seco de *Endopleura uchi* e redução de 60% da esteatose grau 2 no grupo tratado com 50mg/kg/dia de solução de Bergenina, demonstrando dose dependência nesta situação e apresentando-se com potencial farmacológico no auxílio aos pacientes obesos e com DHGNA.

Descritores: *Endopleura Uchi*. Bergenina. Esteatose Hepática. Síndrome Metabólica. Obesidade.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has been considered the most common form of liver disease in the western world, due to the increased prevalence of obesity in developed and developing countries. *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec is a native Amazonian tree species with proven herbal properties in several works by researchers from the region and around the world. From its shell is isolated a substance called Bergenin, which has among its properties, antioxidant, hepatoprotective and hypolipidemic activities. The aim of this study was to evaluate the protective effect of bergenin and dry extract of *endopleura uchi* on the treatment of induced NAFLD in mice and obesity. NAFLD and obesity were induced in male C57BL / 6J mice by Hypercaloryc and Hyperlipid Feed (HF). Sixty male C57BL / 6J mice were divided into 10 groups of six animals each, with the following characteristics: GM1, Negative Control; GM2, Sham Group: Positive Control; GM3, fed HF for eight weeks and then treated with dry *Endopleura uchi* extract, 200mg/kg/day for seven weeks; GM4, similar to the above, treated with 100mg/kg/day of *E. uchi* extract; GM5, HF-fed for seven weeks and treated concomitantly with 200mg/kg/day of *Endopleura uchi* dry extract; GM6, similar to GM5, treated with 100mg/kg/day to verify a potential prophylactic effect at both doses. Groups GM7 and GM8, fed HF for eight weeks and then treated with 50 and 25mg/kg/day for seven weeks with aqueous Bergenin solution respectively; GM9 and GM10, similar to GM5 and GM6 prophylactic groups and treated with aqueous Bergenin solution at doses of 50 and 25 mg/kg/day, respectively. Biochemical examinations of liver function tests and histopathology were performed to prove the anti-obesity effects and treatment of NAFLD of both solutions. Descriptive data analysis was performed and the results are presented in tables, graphs/figures and descriptive measures, such as mean, standard error, among others. To verify the influence of treatments, ANOVA with post hoc test by Student Newman Keuls was used. Having significant influence of the treatments, the Tukey test was used to verify the differences between the means of the groups. In all comparisons, it was considered statistically significant when $p < 0.05$. All statistical calculations were performed using the SPSS Statistics version 14.0 software. As a result, it was found that HF was efficient in developing obesity and hepatic steatosis (HS) in 100% of the GM2 positive control animals. Both prophylactic and post-induction treatment were effective in containing the development of obesity and HS. In NAFLD and obesity, treatment with both solutions, at their highest doses, was effective in significantly reducing the degree of steatosis, with a 50% reduction in grade 2 steatosis in the 200mg/kg/day of the dry extract of *Endopleura uchi* and 60% reduction of grade 2 steatosis in the group treated with 50mg/kg/day of Bergenin solution, demonstrating dose dependence in this situation and presenting pharmacological potential to help obese patients with NAFLD.

Descriptors: *Endopleura Uchi*. Bergenin. Hepatic steatosis. Metabolic syndrome. Obesity.

INTRODUÇÃO

O conhecimento da Esteatohepatite não Alcoólica (EHNA) com a denominação Anglo-saxônica de *Non-Alcoholic steatohepatitis-NASH*, já tem algum tempo e foi inicialmente introduzido por (LUDWIG *et al.*, 1980).

A Esteatose Hepática (EH), a Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA) e a Esteato Hepatite não Alcoólica (EHNA), fazem parte do espectro de doença preocupante em termos de saúde pública nos países ocidentais, inclusive no Brasil, visto as evidências de sobrepeso alcançando proporções preocupantes na população dos países desenvolvidos e em desenvolvimento (BROWNING *et al.*, 2004).

A Esteatose hepática caracteriza-se pela presença de gordura acumulada no hepatócito, e para ser definida como DHGNA necessita de comprovação, seja por imagem ultrassonográfica e/ou histopatológica, em indivíduos que não consomem álcool ou o fazem de forma social (<20g/dia), sem desordens hereditárias que possam cursar com esteatose (ex. Doença de Wilson, hepatite C, Abeta lipoproteinemia, lipodistrofia, etc.) e não estejam fazendo uso de nenhuma medicação esteatogênica (ex: Amiodarona, metotrexato, corticosteroides), Terapia Nutricional Parenteral (CHALASANI *et al.*, 2012).

Existem fatores de risco, comumente associados à DHGNA e entre eles, o Diabetes Mellitus (DM), Obesidade, Dislipidemias que associados à Hipertensão Arterial (HA) e Resistência Insulínica (RI) compõe a chamada Síndrome Metabólica (SM). Esta situação vem emergindo num contexto mundial, como a principal causa de doença hepática crônica (SOUZA *et al.*, 2012). Pode evoluir para EHNA e finalmente para cirrose com risco de desenvolver carcinoma hepatocelular (CHC) (ASCHA *et al.*, 2010).

Na história natural desta patologia, pacientes que desenvolvem DHGNA, podem evoluir para EHNA, fibrose severa e finalmente cirrose. Entre os pacientes com cirrose criptogênica, mais de 70% apresentam fatores de risco para o desenvolvimento de DHGNA (ONG; YOUNOSSI, 2007).

A fisiopatologia da DHGNA não está completamente esclarecida, mas, vários estudos têm demonstrado múltiplos fatores que podem contribuir para o seu desenvolvimento, dentre eles, a Obesidade, Diabetes tipo 2, Sedentarismo, Síndrome Metabólica, Resistência à Insulina e anormalidade no Metabolismo dos Lipídeos. Existem outros fatores que podem contribuir para o seu desenvolvimento, tais como; intoxicação por hidrocarbonetos, cirurgia bariátrica, e etc (YU; KEEFFE, 2002).

O tratamento da DHGNA tem como objetivo, controlar as condições associadas (Obesidade, Diabetes *Mellitus* tipo II, Dislipidemia), reduzir o stress oxidativo, reduzir a resistência à insulina assim como reduzir a inflamação e a fibrose. Muitos estudos já foram e estão sendo realizados, mas, ainda não há medicamento de uso bem estabelecido indicado para o tratamento desta patologia. A modificação do estilo de vida, com dietas e práticas de exercícios associada ao tratamento medicamentoso da Síndrome Metabólica (anti-hipertensivos, inibidor da lipase gástrica e pancreática, Rimonabant, agentes insulinosensibilizantes, ácido ursodesoxocólico, etc.) são as opções atuais. No entanto, não se conseguiu benefícios quanto a evolução da esteatohepatite que justificasse a recomendação rotineira de qualquer destas medicações (LA BRECQUE *et al.*, 2012; VUPPALANCHI; CHALASANI, 2008).

A biodiversidade amazônica, o maior ecossistema do nosso planeta, tem documentado em inúmeros trabalhos dos pesquisadores da região, produtos fitoterápicos com ações terapêuticas, entre eles, encontra-se a Bergenina, um C-glicosídeo com 4-O-metil ácido gálico, encontrada na polpa dos frutos e cascas da *Endopleura uchi*. Muitas ações farmacológicas foram atribuídas à Bergenina, dentre elas, as atividades anti-inflamatória, e hepatoprotetora (NUNOMURA *et al.*, 2009; LIM *et al.*, 2000).

Sabe-se que a intoxicação hepática por tetracloreto de carbono (CCL₄) se comporta laboratorialmente como uma hepatite viral, elevando os níveis das transaminases e gama GT, aumento dos níveis de Malondialdeído e reduzindo níveis de Glutathiona no hepatócito. O tratamento prévio dos animais com Bergenina ameniza de forma significativa esta elevação, indicando a ação hepatoprotetora da Bergenina (LIM *et al.*, 2000; HIKINO *et al.*, 1985).

Não encontramos na literatura nenhum experimento semelhante a esta proposta para tratamento da DHGNA, exceto em nossos resultados preliminares em experimento, usando, a Solução Aquosa de *Endopleura uchi*, para verificar seu efeito no tratamento da esteatose hepática (EH) induzida em fígado de ratos *Wistars*. Desta forma, indiretamente, avaliamos a ação hepatoprotetora da Bergenina, por ser esta substância o princípio ativo do chá da *Endopleura uchi* (BRANCO *et al.*, 2018). Este trabalho teve como finalidade, verificar a eficácia do extrato seco da *Endopleura uchi* e da Bergenina na obesidade e na DHGNA induzida em camundongos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Avaliar ação hepatoprotetora e terapêutica da Bergenina e do Extrato aquoso de *Endopleura uchi* na obesidade e na esteatose induzida em camundongos C57BL/6.

ESPECÍFICOS

- Avaliar o impacto dos tratamentos profiláticos e pós-indução, na massa corporal dos camundongos;
- Determinar os aspectos da dislipidemia em animais tratados com Extrato seco da *Endopleura uchi* e solução aquosa da Bergenina, após indução da esteatose com dieta hiperlipídica;
- Analisar os aspectos bioquímicos das transaminases hepáticas (AST, ALT), entre os grupos tratados e não tratado com solução aquosa de Bergenina e Extrato seco da *Endopleura uchi*, após indução da esteatose com ração hiperlipídica;
- Verificar a existência de ação profilática contra obesidade e esteatose hepática induzida em camundongos com uso concomitante de solução aquosa de Bergenina e Extrato seco da *Endopleura uchi*;
- Avaliar o percentual de resolução histopatológica da esteatose hepática, após tratamento com solução aquosa de Bergenina e Extrato seco da *Endopleura uchi*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DHGNA: DEFINIÇÃO E HISTÓRICO

Em estudo publicado em 1969 sobre o tratamento cirúrgico da obesidade, o acúmulo de gordura em hepatócitos não associado ao uso de álcool foi descrito em pacientes obesos submetidos ao procedimento de “jejuno ileal by-pass” (PAYNE; DEWIND, 1969). Anos depois, a primeira descrição dos achados histológicos de pacientes com esteatose hepática na ausência de ingestão de álcool foi feita por Ludwig, que criou o termo “NASH”, sigla para *Nonalcoholic Steatohepatitis* ou Esteato hepatite não alcoólica (LUDWIG *et al.*, 1980).

O termo Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHNA) incorpora todo o conjunto de achados histológicos de dano hepático, desde esteatose assintomática, esteatohepatite não alcoólica (EHNA) e fibrose avançada, até cirrose e carcinoma hepatocelular. Caracteriza-se pela infiltração gordurosa macrovesicular de 5% ou mais dos hepatócitos, podendo ou não estar associada a alterações necroinflamatórias e fibrose, que ocorre em indivíduo sem história de ingestão significativa de álcool (MATTEONI *et al.*, 1999).

Histologicamente, as alterações da DHGNA são similares às aquelas encontradas na doença hepática alcoólica, que se apresenta também com esteatose macrovesicular de forma predominante. Portanto, durante a avaliação clínica é crucial ter uma definição confiável da quantidade de álcool considerada não significativa para resultar em dano hepático. Exposição ao álcool menor que 20g/dia para mulheres e 30g/dia para homens tem sido recomendada (AHMED *et al.*, 2015). Entretanto, o Guideline americano e o Consenso Brasileiro de DHGNA consideram como fator de exclusão o consumo de álcool maior que 140g/ semana para os homens (\pm 21 doses) e 70g/semana para mulheres (\pm 14 doses) (CHALASANI *et al.*, 2012).

3.2 HISTÓRIA NATURAL

A amplitude do espectro da DHGNA torna a progressão das lesões um importante objeto de estudo. Apesar de haver um consenso sobre a esteatose isolada ser uma lesão predominantemente benigna em sua evolução, há uma grande variação entre os casos. A DHGNA, particularmente seu fenótipo histológico EHNA, pode evoluir para doença hepática avançada, cirrose e carcinoma hepatocelular (ANSTEE; TARGHER; DAY, 2013). Os resultados da revisão sistemática realizada por Pais *et al.* (2013), confirmaram a

heterogeneidade da DHGNA, classificando os pacientes como progressores rápidos ou progressores lentos no processo de fibrose. Embora progressores lentos possam desenvolver EHNA, eles apresentam menor risco de desenvolver fibrose e menor mortalidade relacionada à doença hepática.

Por outro lado, os progressores rápidos podem avançar rapidamente para fibrose avançada, talvez sem desenvolver EHNA ou com episódios intermitentes de EHNA que não foram detectados. Singh *et al.* (2015), demonstraram que a progressão para um estágio mais avançado de fibrose leva em média 7,1 anos (95% IC, 4,8-14,3 anos) em pacientes com EHNA comparados com 14,3 anos (95% IC, 4,8-50 anos) naqueles com apenas esteatose simples e identificaram que a presença de hipertensão (OR, 1,94; 95% IC) e a baixa relação AST:ALT no momento da biópsia foram associadas ao desenvolvimento de fibrose progressiva.

Além disso, relatos recentes sugerem que a DHGNA pode ser menos benigna do que é atualmente conhecido. Um estudo realizado utilizando 108 biópsias seriadas descobriu que cerca de 22% dos pacientes que foram inicialmente diagnosticados com DHGNA desenvolveram fibrose avançada durante um período de seguimento relativamente curto, com média de 3,3 anos e mediana de 6,7 anos (MCPHERSON *et al.*, 2015).

Um estudo retrospectivo em pacientes com EHNA que desenvolveram carcinoma hepatocelular constatou que a neoplasia ocorreu sem cirrose em 43 de 87 pacientes (YASUI *et al.*, 2011). Corroborando com esses resultados, Reddy *et al.* (2012), encontraram em seu estudo que os pacientes com EHNA que progrediram para carcinoma hepatocelular eram menos propensos a ter fibrose em ponte ou cirrose do que os pacientes com hepatite C ou doença hepática alcoólica. Dessa forma, as evoluções mais severas da DHGNA, a saber a cirrose e o carcinoma hepatocelular, não estão necessariamente interligadas ao longo da progressão da doença e o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular não ocorre apenas em pacientes cirróticos ou com presença de fibrose.

Além disso, o carcinoma hepatocelular resultou em menor disfunção hepática para os pacientes e melhor taxa de sobrevivência quando comparado com pacientes portadores de hepatite C ou doença hepática alcoólica, cuja evolução culmina mais frequentemente com cirrose e consequente disfunção hepática pacientes (YASUI *et al.*, 2011).

Quanto ao prognóstico, a maioria dos estudos de longo prazo sugeriu que a presença de EHNA histologicamente determinada predispõe pacientes a um tipo de doença hepática potencialmente progressiva. De fato, em um estudo com mais de 10 anos de

acompanhamento, Hossain *et al.* (2009), determinaram que aproximadamente 20% dos pacientes podem desenvolver cirrose e 8% podem morrer de causas relacionadas ao fígado.

3.3 EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO

3.3.1 Prevalência da DHGNA

A DHGNA vem crescendo em prevalência em conjunto com o crescimento dos fatores da síndrome metabólica, ao acompanhar o estilo de vida e de alimentação atual. Os estágios brandos da DHGNA, como a esteatose assintomática, por vezes são sub diagnosticadas e possuem uma ótima resposta terapêutica e regressão com mudanças comportamentais e dietéticas. Ainda assim, a DHGNA é considerada a maior causa de alteração de enzimas hepáticas além de ser a causa mais comum de hepatopatia crônica em países desenvolvidos (SAYINER *et al.*, 2016). A EHNA, um dos fenótipos da DHGNA, é hoje considerada a segunda indicação mais comum de transplante de fígado nos EUA após hepatite C crônica, e seus números permanecem em crescimento (ANSTEE; TARGHER; DAY, 2013).

Atualmente, estima-se que a prevalência global de DHGNA seja de 24% e esse número está em constante aumento, sendo seu valor em 2005 de 15% enquanto que, em 2010, a prevalência atingiu 25%. Da mesma forma, a taxa de EHNA no mesmo período quase dobrou, sendo atualmente de 59,1% (YOUNOSSI *et al.*, 2016).

Utilizando dados de 20.050 participantes adultos da Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição III, realizada pelo Centro Nacional para Estatísticas de Saúde dos Estados Unidos dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças entre 1988 e 1994, foram encontrados 2492 casos que preenchem a definição de DHGNA apontando prevalência de 20%±0,76% na população americana e prevalência de 27% a 34% na população geral na América do Norte (YOUNOSSI *et al.*, 2012).

Como amostra da população europeia, uma revisão sistemática demonstrou prevalência média de 23,71 %, variando de 5% a 44% em diferentes países (YOUNOSSI *et al.*, 2016). Em estudo transversal multicêntrico da população da Espanha, DHGNA documentada por ultrassonografia foi relatada em 33,4% dos homens e 20,3% das mulheres, com prevalência geral de 25,8% (CABALLERIA *et al.*, 2010). Dados de um estudo de coorte de Saúde na Pomerânia (SHIP) no nordeste da Alemanha, por sua vez, estimam que a prevalência de DHGNA seja de aproximadamente 30% quando diagnosticada por ultrassonografia Zois *et al.* (2010); Haring *et al.* (2009), avaliaram 498 biópsias hepáticas

provenientes de autópsias na Grécia e relataram que 31,3% das amostras apresentavam esteatose hepática e que, dos casos, a EHNA esteve presente em 39,8%.

Na América do Sul e no Brasil há poucos estudos avaliando a prevalência da DHGNA, mas dados publicados após avaliação de 139 pacientes com idade igual ou superior a 55 anos através de dados clínicos e ultrassonográficos relataram prevalência de 35,2% entre os pacientes (KARNIKOWSKI *et al.*, 2007). Em outro estudo, dentre 5473 homens e mulheres assintomáticos avaliados com ultrassonografia hepática, a prevalência de DHGNA foi de 36% (ONI *et al.*, 2015).

Um terceiro estudo realizado com 62 pacientes já diagnosticados com DHGNA mostrou prevalência de EHNA em 61% da amostra. Desses pacientes, 76% eram mulheres, 73% caucasianos e 71% tinham entre 50 e 69 anos e não apresentavam sintomas. Além disso, 70% dos pacientes apresentavam critérios para síndrome metabólica, dos quais, 87% possuíam circunferência da cintura aumentada, 61% apresentavam hipertensão arterial sistêmica (HAS) e 28% eram portadores de Diabetes *Mellitus* (ANDRADE *et al.*, 2016). A alta prevalência de Diabetes *Mellitus* (DM), síndrome metabólica e outros acometimentos sistêmicos em pacientes com DHGNA já foi demonstrada também por outros estudos, ratificando a importância desses fatores de risco. A presença de Diabetes tipo II foi, inclusive, confirmada como fator que aumenta o risco de mortalidade relacionada ao fígado e mortalidade por todas as causas em pacientes com DHGNA (STEPANOVA *et al.*, 2013).

3.3.2 Fatores de risco associados à DHGNA

Estudo analítico observacional, multicêntrico e populacional de casos e controles, procurou estabelecer os fatores associados à presença de esteatose hepática não alcoólica e avaliar a influência de cada um dos componentes que compõem a síndrome metabólica na DHGNA. Com 327 casos e 377 controles incluídos, os fatores de risco associados à DHGNA foram obesidade (Odds Ratio [OR] 3,82, intervalo de confiança [IC] de 95%), síndrome metabólica (OR 1,73, IC 95%), resistência à insulina (OR 3,65, IC 95%), aumento da alanina aminotransferase (OR 4,72, IC 95%) e gama glutamiltransferase (OR 1,95, IC 95%). Os componentes da síndrome metabólica que melhor predizem a DHGNA, conforme o mesmo autor, foram hiperglicemia (OR 1,65, IC 95%) e nível sérico de triglicérides (OR 1,75, IC 95%) (CABALLERIA *et al.*, 2013).

3.3.3 Prevalência da DHGNA em população específica

Ao avaliar populações específicas, a prevalência da DHGNA apresenta alta variação. Em obesos mórbidos, ela ocorre em 75% a 92%, enquanto a prevalência em pacientes com Diabetes tipo 2 é estimado entre 60% a 70% (WILLIAMSON; SNYDER, 2013). Em estudo realizado por Oni *et al.* (2015), a prevalência chegou a 74% em pacientes com síndrome metabólica e 73% em obesos.

Além disso, diferenças étnicas na prevalência de DHGNA foram relatadas. Nesse contexto, os hispano-americanos têm a maior prevalência, com 45%, enquanto os afro-americanos têm a menor prevalência, com 24%, e os norte-americanos uma prevalência de 33% (PAN; FALLON, 2014).

3.3.4 Distribuição da DHGNA por gênero

Distribuição por gênero apresenta resultados conflitantes e Stepanova *et al.* (2013), afirmaram em seu estudo não haver diferença significativa na distribuição entre gêneros na população estudada. Enquanto alguns dados publicados demonstraram que pacientes do sexo masculino apresentaram taxas de 58,9% de DHGNA e 65% de NASH (ATTAR; VAN THIEL, 2013), outros estudos apresentaram o sexo feminino como o gênero mais afetado (AYONRINDE *et al.*, 2011). O gênero masculino foi reconhecido também como fator de risco para o desenvolvimento de EHNA, fibrose hepática, câncer hepático, e pelo aumento geral da mortalidade (ONG; PITTS; YOUNOSSI, 2008; PAPTAEODORIDIS *et al.*, 2007).

3.4 APRESENTAÇÃO E PERFIL CLÍNICO DOS PORTADORES DE DHGNA

A apresentação clínica da DHGNA varia conforme o espectro da doença apresentado pelo paciente, porém costuma ser praticamente assintomática ou apresentar queixas vagas e inespecíficas, como fraqueza e mal-estar, de forma que sua detecção, especialmente em sua forma branda, costuma ocorrer por exames de imagem realizados por outras indicações. As apresentações clínicas podem estar relacionadas com outros fatores metabólicos como obesidade, resistência à insulina e perfil lipídico alterado. Em geral, estes pacientes não apresentam uma clínica muito rica, mas, é importante diferenciar os dois principais fenótipos da DHGNA, que são a esteatose isolada e a esteatohepatite (MILIĆ; LULIC; STIMAC, 2014).

A primeira, caracterizada apenas pela infiltração de gordura nos hepatócitos sem, ainda, resultar em consequências necroinflamatórias, não acarreta manifestações específicas,

mas pode ser detectada como aumento do volume hepático mediante exame físico cuidadoso em alguns casos. A esteatohepatite, por sua vez, já apresenta lesão de hepatócitos, componente inflamatório e áreas de necrose, gerando consequências funcionais, podendo, conforme sua história natural, evoluir para cirrose Hepática (CH) e Carcinoma Hepato Celular (CHC). Portanto, nesse fenótipo alguns pacientes têm estigmas sutis de doença hepática crônica, como aranhas vasculares, eritema palmar ou esplenomegalia. (MILIĆ; LULIC; STIMAC, 2014).

Alguns estudos buscaram definir o perfil clínico de pacientes com DHGNA. Um estudo observacional de pacientes diagnosticados com a doença buscou determinar o perfil clínico da população e confirmar a relação entre DHGNA e síndrome metabólica. Os dados mostraram que 51,4% dos pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica apresentavam síndrome metabólica e significância estatística foi encontrada em relação à doença e nível AST, Diabetes *Mellitus* e perfil lipídico (GAHARWAR *et al.*, 2015). Uchil *et al.* (2009), encontraram resultados semelhantes, com prevalência da síndrome metabólica em 47,1% dos pacientes com DHGNA. No mesmo estudo, 77,6% da amostra apresentava sobrepeso ou era obesa. No Brasil, um estudo epidemiológico multicêntrico envolvendo 1280 pacientes com DHGNA descreveu obesidade como prevalente em 44,7% da amostra (COTRIM *et al.*, 2016).

Apesar da alta prevalência de sobrepeso e obesidade entre os pacientes com DHGNA, outros fatores metabólicos influenciam a progressão para a fibrose. Foi o que mostrou o estudo realizado por Gutiérrez-Grobe *et al.* (2017), após avaliarem 428 pacientes, estratificados em dois subgrupos de acordo com critérios diagnósticos de saúde metabólica. Pacientes obesos definidos como saudáveis mostraram prevalência significativamente menor de fibrose hepática avançada (F3-F4), na elastografia transitória do que os obesos definidos como não-saudáveis (16,5% *versus* 28%, respectivamente, com $p < 0,05$ %).

É importante salientar que, embora a síndrome metabólica seja um relevante fator de risco para DHGNA, há uma subpopulação não-obesa e sem fatores de risco óbvios que também desenvolve DHGNA. Nesses pacientes, que representam minoria da amostra, os mecanismos de desenvolvimento e progressão da esteatose pode ocorrer por outras vias, diferentes das vias já consagradas e ligadas à síndrome metabólica e ao acúmulo de triglicerídeos. É sugerida que nesses casos haja uma indução direta pelo colesterol, com forte componente inflamatório e aumento de peso visceral limitado ao fígado conforme demonstrado por estudo experimental em ratos (TU *et al.*, 2017).

3.5 FISIOPATOLOGIA E FATORES PREDISPOONENTES À DHGNA

Através de revisão de literatura, o estudo de Souza *et al.* (2012), concluiu que obesidade central, Diabetes tipo 2 (*Mellitus*), Dislipidemia e Hipertensão arterial são fatores de risco para o desenvolvimento da DHGNA e representam mais do que um diagnóstico clínico, sendo uma condição pré-mórbida com alta taxa de riscos para doença cardiovascular, renal e hepática. Dessa forma, sabe-se que a DHGNA é uma doença não limitada ao fígado, como sugere seu nome, mas sim uma manifestação sistêmica cuja principal consequência ocorre no fígado uma vez que os hepatócitos funcionam como a chave reguladora do metabolismo lipídico global.

No contexto da obesidade e da resistência à insulina, perfil mais comum dos pacientes que desenvolvem a DHGNA, a patogênese é marcada pelo acúmulo de triglicerídeos formados pela esterificação de ácidos graxos nos hepatócitos (PURI *et al.*, 2007). A eliminação de lipídios pode ser aumentada, mas é incapaz de neutralizar a deposição de gordura intra-hepática. A exportação de lipídios, que é alta nos estágios iniciais da doença, diminui ou se estabiliza com a gravidade da doença uma vez que o metabolismo dos hepatócitos se torna cada vez mais comprometido. Nessa fase, esforços para reduzir os níveis lipídicos podem até promover progressão da doença, pois a oxidação de ácidos graxos pode induzir estresse oxidativo, esgotando as competências antioxidantes e promovendo danos para organelas celulares e DNA (IPSEN *et al.*, 2018).

O acúmulo de triglicerídeos por si só, porém, não é sempre patológico e há modelos animais descritos com fígado gordo saudável (HARLEY *et al.*, 2014; MONETTI *et al.*, 2007). Ademais, aumento da inflamação hepática e balonização foram visualizadas a despeito da redução dos triglicerídeos hepáticos durante inativação hepática de DGAT2, uma enzima que catalisa a síntese de triglicerídeos (YAMAGUCHI *et al.*, 2007).

Este aparente paradoxo destaca a importância do correto funcionamento do metabolismo de gotículas lipídicas hepáticas, que são constituídas por um núcleo contendo principalmente triacilglicerol e ésteres de esterol circundados por uma monocamada de fosfolipídeos, e são responsáveis, dentre outras funções, por fornecer ácidos graxos para a oxidação e substrato para a síntese de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) (MASHEK *et al.*, 2015).

Através de estudo proteômico das gotículas lipídicas foi revelado que a maioria das proteínas presentes nessa estrutura possuem funções como sinalização celular, tráfico de membrana e metabolismo de esteróides, proteínas e carboidratos. Apesar de não estar claro

como essas proteínas estão envolvidas no desenvolvimento da DHGNA, sabe-se que a 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase, uma enzima identificada em gotículas lipídicas, promove o acúmulo de triglicerídeos por meio do aumento da lipogênese de novo quando superexpressa nos hepatócitos, o que é sugestivo como um possível papel etiológico na DHGNA (SU *et al.*, 2014).

Há evidências em estudos humanos que o aumento no tamanho das gotículas lipídicas hepáticas pode ser impulsionado pela redução do conteúdo de fosfatidilcolina, o que pode ser atribuído à má absorção de colina em fígados com EHNA, ao invés de deficiência de colina na dieta (FUJITA *et al.*, 2009), ou por alterações nas proteínas de revestimento de gotículas lipídicas. Wilfling *et al.* (2013) e Puri *et al.* (2007), corroboraram com a informação ao demonstrarem que o conteúdo total de fosfatidilcolina hepática é reduzido tanto na esteatose isolada quanto na EHNA.

Os ácidos graxos encontram-se em constante fluxo pelo plasma em direção ao fígado devido a lipólise estimulada pela resistência à insulina de forma que cerca de 60% dos ácidos graxos hepáticos são originários do tecido adiposo, 25% na lipogênese e 15% da dieta (DONNELLY *et al.*, 2005). Os níveis séricos de VLDL e a hipertrigliceridemia refletem a produção excessiva de triglicerídeos (TU *et al.*, 2017).

As principais rotas metabólicas dos ácidos graxos no fígado, incluindo β -oxidação e montagem e secreção de VLDL estão aumentadas na esteatose não alcoólica. Entretanto, quando estes aumentos compensatórios são insuficientes para acompanhar o influxo de lipídios, a esteatose simples pode progredir para EHNA (FUJITA *et al.*, 2009).

3.6 FATORES GENÉTICOS

Liu *et al.* (2014), confirmaram que o TM6SF2 é associado à DHGNA histologicamente definida, e é a primeira demonstração de que este gene serve como um poderoso modificador de fibrogênese hepática. O estudo demonstrou, ainda, que o gene também está associado a perturbações metabólicas incluindo infarto do miocárdio, sugerindo que TM6SF2 é um importante determinante do resultado clínico de dano ao órgão-alvo relacionado à síndrome metabólica.

Estudo publicado no mesmo ano indicou que a atividade do TM6SF2 é necessária para a produção normal de VLDL e que sua função contribui causalmente para a DHGNA ao identificar três variantes genéticas associadas com maiores níveis de gordura hepática: duas

em PNPLA3, um lócus estabelecido para DHGNA, e um em TM6SF2, gene cuja função exata até o momento é desconhecida (KOZLITINA *et al.*, 2014).

Em uma revisão sobre os mecanismos envolvidos na DHGNA, Haas; Francque; Staels (2016), resumiram as mutações identificadas em avaliações de peças histológicas ou da gordura hepática, conforme mostra o quadro 1.

Quadro 1: Mutações identificadas em avaliações de peças histológicas ou da gordura hepática.

GENE E POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO	RASTREIO	DESFECHO	REFERÊNCIA
<i>PNPLA3</i> , rs738409, I148M	Associado ao conteúdo de gordura hepática pela RM.	Associado com a gravidade da EHNA fibrose e CHC.	Romeo <i>et al.</i> (2008).
<i>GCKR</i> , rs780094	Associado com NHGNA definida por análise histológica.	níveis mais elevados de colesterol LDL e triglicerídeos plasmáticos, glicemia de jejum mais baixa, insulina de jejum mais baixa, menor HOMA-IR.	Speliotes <i>et al.</i> (2011).
<i>FDFT1</i> , rs2645424	Associado com EHNA na análise histológica.	Associada ao escore de atividade histológicas NAS.	Chalasani <i>et al.</i> (2010).
<i>LYPLALI</i> , rs12137855	Associado com NHGNA definida por análise histológica.	Associada a obesidade abdominal	Speliotes <i>et al.</i> (2011).
<i>NCAN</i> , rs2228603, P91S	Associado com esteatose através de TC e NHGNA definida por análise histológica.	Associado com níveis mais baixos de triglicérides e colesterol LDL no plasma.	Speliotes <i>et al.</i> (2011).
<i>PPP1R3B</i> , rs4240624	Associado com esteatose através de TC.	Associado com aumento dos níveis de colesterol HDL e LDL e diminuição da glicemia de jejum.	Speliotes <i>et al.</i> (2011).
<i>TM6SF2</i> , rs58542926, E167K	Associado ao conteúdo de gordura hepática pela RM e identificado por seqüenciamento de exoma.	A mutação de TM6SF2 está associada a menor taxa de doenças cardiovasculares e secreção reduzida de VLDL.	Kozlitina <i>et al.</i> (2014).

Fonte: Haas; Fancque; Staels(2016).

Em nível molecular, os avanços na compreensão do desenvolvimento da DHGNA continuam a progredir. C/EBP α e C/EBP β são dois membros da família de proteínas C/EBP α , que dimerizam e controlam múltiplas funções em diferentes tecidos. Dessas, a proteína

C/EBP α é necessária para a diferenciação hepática, onde atua como um forte inibidor da proliferação celular e está envolvida na fisiopatologia do acúmulo patológico de gordura em hepatócitos. Um recente estudo experimental descobriu que a ativação de ciclina D3 é um evento chave no desenvolvimento da DHGNA, pois esta ciclina é responsável pela ativação da quinase dependente de ciclina 4 que, ao fosforilar a proteína C/EBP α permite a associação desta com a proteína de remodelação da cromatina p300 (JIN *et al.*, 2016).

A formação do complexo C/EBP α -p300 resulta em alterações da estrutura da cromatina que culminam com o desenvolvimento da DHGNA. Portanto, dois possíveis alvos terapêuticos moleculares foram identificados: O rompimento desta via por mutação genética da proteína C/EBP α e pela inibição da quinase dependente de ciclina 4, que poderia inibir significativamente o desenvolvimento da DHGNA (JIN *et al.*, 2016).

3.7 PROGRESSÃO PARA EHNA

Koliaki *et al.* (2015) relataram evidências diretas de uma regulação positiva compensatória da respiração mitocondrial hepática em humanos obesos resistentes à insulina com e sem esteatose hepática, sugerindo o funcionamento de um mecanismo de "flexibilidade metabólica hepática", pelo qual as mitocôndrias hepáticas se adequam às exigências bioenergéticas alteradas que precedem a DHGNA avançada. A produção elevada de espécies reativas de oxigênio foi associada a um aumento na capacidade de desintoxicação e capacidade antioxidante na esteatose isolada, mas essa adaptação é abolida em humanos obesos com EHNA, indicando que os mecanismos para lidar com a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio se tornam insuficientes na esteatohepatite. Em humanos com EHNA, a respiração celular pode ser desacoplada da produção de ATP, causando aumento significativo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e consequente ativação de células de Kupffer.

Além das EROS, há outros vários estímulos associados à ativação das células de Kupffer incluindo o aumento da captação das partículas de colesterol LDL, ácidos graxos saturados, lipídios peroxidados e material da microbiota (GANZ; SZABO, 2013).

Os estudos que investigaram o papel das células imunes no fígado têm se concentrado na ativação de células de Kupffer como um passo fundamental no desenvolvimento de EHNA, uma vez que elas são as células mais bem estudadas no contexto da DHGNA. A depleção de células de Kupffer com clodronato resultaram na atenuação da gravidade da EHNA em modelos animais. Isso ocorre porque as células de Kupffer estimulam vias de sinalização que reprimem o PPAR- α , como a IL-1 β e CCR2 (MIURA *et al.*, 2012).

A expressão do PPAR- α hepático foi correlacionada negativamente com a presença de EHNA ($p = 0,001$) e com gravidade da esteatose ($p = 0,003$), balonismo ($p = 0,001$), escore de atividade EHNA ($p = 0,008$) e fibrose ($p = 0,003$). A melhora histológica está associada a um aumento na expressão de PPAR- α e seus genes-alvo sugerindo, portanto, que o PPAR- α apresenta efeito protetor e é um potencial alvo terapêutico na EHNA (FRANCQUE *et al.*, 2015).

Entretanto, na complexidade do envolvimento imune, muitas outras células desempenham papéis cruciais na iniciação e progressão da DHGNA e dados recentes sugerem que a EHNA é caracterizada pelo aparecimento de populações de células imunes especializadas, residentes e infiltrantes (SEKI; SCHWABE, 2015; VONGUIA; MICHELSEN; FRANCQUE, 2013).

Uma das hipóteses sobre a fisiopatologia da DHGNA e sua progressão considera um processo de “dois golpes” ou estímulos. O primeiro é o desenvolvimento de esteatose hepática via acúmulo de triglicérides nos hepatócitos, enquanto o segundo inclui uma variedade de tensões celulares, tais como estresse oxidativo, apoptose, alteração lipídica e estimulação derivada do intestino como hiperinsulinemia, hiperleptinemia e baixos níveis de adiponectina. De todos esses fatores, dois mecanismos são considerados fundamentais: aporte aumentado de triglicérides aos hepatócitos e estresse oxidativo com presença de citocinas inflamatórias (DAY; JAMES, 1998).

3.8 ESTRESSE OXIDATIVO

Há uma forte associação entre o grau de estresse oxidativo e a gravidade da EHNA (PETTA; MURATORE; CRAXI, 2009) e uma das principais fontes de estresse oxidativo na EHNA é a carga excessiva de ácidos graxos resultante da obesidade e da resistência a insulina. Sob estresse oxidativo contínuo, ocorre um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante da célula levando, em última instância, ao dano celular (PESSAYRE *et al.*, 2001). O dano celular pelas espécies reativas de oxigênio ocorre por 3 formas: a) necrose celular e fibrose hepática por peroxidação lipídica, b) indução das citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF α), fator de crescimento semelhante à insulina beta e a interleucinas 8, que resultam em morte dos hepatócitos, formação de corpúsculos de Mallory, ativação da síntese de colágeno e infiltração de neutrófilos e, por fim, c) indução do FAS ligante nos hepatócitos induzindo uma via apoptótica (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016).

3.9 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

A inflamação hepática crônica e a produção anormal de citocinas são fatores fortemente associados a EHNA e a diferenciação da esteatose isolada. Esse aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e interleucina-6, foi confirmado na avaliação de pacientes com EHNA em um estudo publicado por (TILG, 2010).

A teoria de desenvolvimento da EHNA inicialmente considerava apenas dois golpes ou estímulos (DAY; JAMES, 1998) para o desenvolvimento da EHNA. No entanto, um recente estudo de associação genômica ampla identificou a fosfolipase 3 (PNPLA3) como um gene chave no desenvolvimento de EHNA. O envolvimento do PNPLA3 na patogênese da EHNA e os conhecimentos da genética envolvida nessa doença indicou que um simples processo de “dois golpes”, como era chamada a antiga teoria acerca da fisiopatologia da DHGNA, era insuficiente para explicar essa heterogeneidade da doença. Baseado nisso, a teoria do "múltiplos golpes" foi recentemente promovida para acomodar o conhecimento de que, além dos mecanismos inflamatórios e metabólicos, o background genético também está correlacionado com a progressão da doença (TAKAKI; KAWAI; YAMAMOTO, 2014).

3.10 CLASSIFICAÇÃO DA DHGNA

3.10.1 Classificação de Brunt

Uma das mais populares classificações histológicas é a proposta por Brunt *et al.* (1999). As lesões histológicas consideradas significativas foram: esteatose, balonismo e inflamação intra-acinar e portal. Um escore de estadiamento foi desenvolvido para refletir localização e extensão da fibrose. A pontuação da fibrose foi derivada da sua extensão e classificadas em estágios. Estágio 1: fibrose perisinusoidal da zona 3; Estágio 2: como acima, com fibrose portal; Estágio 3: como a anterior, além de fibrose em ponte; e estágio 4: cirrose.

A Esteato-Hepatite Não-Alcoólica (EHNA) foi classificada em 3 estágios: leve, moderada e grave. A seguinte proposta para atribuição do grau de atividade da esteatohepatite baseia-se no fato de que nenhuma característica única pode ser usada para determinar a atividade, mas é a combinação de características de esteatose, balonização e inflamação (acinar e portal) que determinam o grau da doença. O quadro 2 explica essas classificações.

Quadro 2: Classificação da Esteato-Hepatite Não-Alcoólica (EHNA).

CLASSIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO
GRAU 1 (LEVE)	Esteatose predominantemente macrovesicular que envolve geralmente até 33% da amostra, mas pode atingir até 66%; balonização de hepatócitos é ocasional na zona 3; há polimorfonucleares intra-acinares dispersos e pode haver a presença de linfócitos; inflamação crônica portal pode estar ausente ou se apresentar de forma leve.
GRAU 2 (MODERADO)	Esteatose de qualquer grau; presença clara de balonismo de hepatócitos predominantemente na zona 3; polimorfonucleares intra-acinares, podendo estar associado com fibrose na zona 3 pericelular; inflamação portal e intra-acinar crônica pode ser observada em grau leve ou moderado.
GRAU 3 (SEVERO)	Esteatose pan-acinar que pode envolver todo o nódulo regenerativo no parênquima cirrótico; balonismo e desordem são óbvias predominantemente na zona 3 e é possível ver polimorfonucleares associados aos hepatócitos com balonismo; inflamação intra-acinar com polimorfonucleares dispersos; inflamação portal crônico leve ou moderada, inflamação lobular mais intensa em relação ao grau 2.

Fonte: adaptação do texto de Brunt *et al.* (1999).

A classificação criada por Brunt *et al.* (1999), foi validada por estudos posteriores e visa um melhor estadiamento da progressão da doença, permitindo avaliar melhoras ou piores em um mesmo paciente em determinado período de tempo e, dessa forma, acompanhar a eficácia de uma terapêutica.

3.10.2 Classificação de Matteoni

No mesmo ano, Matteoni *et al.* (1999), estratificaram as amostras histológicas de seu estudo em 4 diagnósticos: esteatose hepática simples (tipo 1), esteatohepatite (tipo 2), esteatonecrose (tipo 3) e esteatonecrose mais corpos hialinos Mallory ou fibrose (tipo 4). Os dois últimos estágios se referem, de fato, a EHNA e neles estão concentrados quase todos os casos de cirrose e mortalidade.

3.10.3 NAS

Para ajudar a caracterizar lesões e facilitar análises em ensaios clínicos, patologistas do Comitê NASH do Instituto Nacional de Saúde (NIH NASH CRN) elaboraram um sistema

de classificação chamado *NAFLD Activity Score* (NAS) traduzido como escore de atividade da DHGNA. O sistema NAS atribui nota numérica para cada item conforme se segue:

- Gravidade da esteatose é classificada de zero a três (0 a 3)
- Balonização hepatocelular é graduada de zero a dois (0 a 2)
- Inflamação lobular é graduada de zero a três (0 a 3)

A pontuação do NAS é a soma não ponderada destes três números com um intervalo entre (zero a oito), sendo que valor inferior a três indica muito provável exclusão de EHNA e valor igual ou superior a cinco, muito provável EHNA. Porém, o objetivo do escore não é diagnóstico, mas auxiliar o acompanhamento da gravidade histológica (KLEINER *et al.*, 2005). Ainda assim, escores nas mais elevadas não são necessariamente indicativos de pior prognóstico da doença (YOUNOSSI *et al.*, 2011).

3.10.4 SAF Score

Em 2012, o sistema de pontuação foi refinado por Bedossa *et al.* (2012), gerando o SAF (*Steatosis, Activity and Fibrosis*) Score, algoritmo também proposto para avaliação da gravidade histológica. O SAF Score separa o grau de esteatose (S), grau de atividade necroinflamatória (A) e fibrose (F). Nesse algoritmo, todos os casos com pelo menos grau 1 de esteatose foram diagnosticados como DHGNA independentemente de outros critérios, enquanto que, quando cada uma das três características (esteatose, balonismo, inflamação lobular) foi classificada como pelo menos grau 1, então a lesão foi categorizada como EHNA, dessa forma, ao descrever separadamente as principais características histopatológicas, o SAF escore permite fácil comparação entre alterações observadas em biópsias pareadas durante os ensaios clínicos (BEDOSSA *et al.*, 2014; BEDOSSA *et al.*, 2012).

Younossi *et al.* (2018), buscaram fornecer os valores de concordância e previsibilidade inter protocolo para mortalidade de quatro conjuntos de critérios patológicos da EHNA. Em um estudo de coorte de pacientes com DHGNA, com dados clínicos, lâminas de biópsia hepática e dados de mortalidade em longo prazo, disponível, o estudo demonstrou que, independentemente dos critérios patológicos específicos para EHNA, pacientes com diagnóstico histológico de EHNA apresentam maior mortalidade relacionada ao fígado em longo prazo.

Além disso, associação independente de fibrose avançada com mortalidade relacionada ao fígado em longo prazo foi confirmada para ambos os sistemas de graduação de

fibrose existentes. Portanto, embora a esteatohepatite não alcoólica seja considerada o tipo potencialmente progressivo de DHGNA, os pacientes com esteatohepatite não alcoólica e com fibrose estão em maior risco para mortalidade por qualquer causa quando comparados com pacientes sem evidências de fibrose (YOUNOSSI *et al.*, 2018).

3.11 ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DA DHGNA

Na maioria dos casos, as características histológicas da DHGNA são indistinguíveis da doença hepática induzida pelo álcool e, portanto, o patologista deve contar com o clínico para excluir uso de álcool como etiologia. Para fins de diagnóstico, os patologistas dividem a DHGNA em esteatose não alcoólica (predominantemente esteatose macrovesicular com ou sem inflamação inespecífica) e EHNA.

Nos estágios iniciais da doença, as alterações histológicas têm uma distribuição distinta com alterações severas na zona acinar 3, normalmente poupando a zona acinar 1 (BROWN; KLEINER, 2016). Com a evolução do quadro e desenvolvimento de EHNA, as características histológicas encontradas incluem o acúmulo de gordura predominantemente macrovesicular (caracterizada pela presença de grande vacúolo de gordura que desloca o núcleo para a periferia), degeneração dos hepatócitos, inflamação disseminada, corpos apoptóticos, e corpos de Mallory-Denk. Em casos mais graves, pode haver esteatose microvesicular, onde numerosos e pequenos vacúolos citoplasmáticos provocam endentações no núcleo centralmente localizado (BRUNT, 2004). Quando ocorre progressão para cirrose, a esteatose pode diminuir e até mesmo desaparecer (LIOU; KOWDLEY, 2006).

A inflamação presente na EHNA é marcadamente lobular, com infiltrados celulares compostos por mononucleares e neutrófilos, podendo apresentar infiltrado inflamatório discreto em região portal composto por mononucleares. O diagnóstico diferencial com hepatite crônica viral, autoimune ou induzida por drogas, por exemplo, é sugerida por inflamação portal intensa (BRUNT, *et al.*, 2011).

A balonização, caracterizada por citoplasmas edemaciados com aspecto finamente granular, é uma alteração morfológica indicativa de dano celular que resulta da disfunção de micro túbulos, redução da secreção de proteínas e retenção de fluido dentro do hepatócito.

Os corpos hialinos de Mallory são formados por proteínas agregadas do citoesqueleto com aspecto homogêneo, eosinofílico e localização perinuclear. Os hepatócitos que o contem apresentam acúmulo de neutrófilos ao redor, fenômeno chamado de “satelitose”, promovido pela natureza quimiotática dessa estrutura (BURT; MUTTON; DAY, 1998).

A fibrose, ainda que muitas vezes presente em algum grau, não é necessária para o diagnóstico. Ao contrário da esteatose isolada, a EHNA é um padrão de lesão hepática que pode ser reconhecido mesmo se presente com outras doenças do fígado. Isso ocorre devido o padrão da fibrose na EHNA marcado por deposição de colágeno que inicia na região perivenular/perisinusoidal da zona 3. As células podem estar isoladamente envolvidas pelo colágeno formando a fibrose pericelular ou em “cerca de galinheiro”. Essas características permitem diferenciar a fibrose das esteatohepatite alcoólica e não alcoólica da fibrose portal que ocorre em outras formas de doenças crônicas do fígado. Entretanto, com a progressão, ocorre formação de septos, fibrose portal e, por fim, a cirrose é estabelecida como estágio final de disfunção do órgão. Atualmente, o balonização e a inflamação são considerados os marcadores mais relevantes relacionados à doença (BRUNT *et al.*, 2011). Ainda assim, há discussão sobre quais seriam os critérios mínimos ou considerados necessários para o diagnóstico.

A fim de medir a variabilidade das lesões usadas para avaliar EHNA, Brunt *et al.* (2011) pesquisaram quais critérios eram usados por dez hepatologistas internacionais que dividiram as lesões histopatológicas em 5 categorias: 1) necessárias; 2) comuns, mas não necessárias ou suficientes; 3) ajudam, mas não são suficientes ou necessárias; 4) incomuns, mas podem ocorrer e 5) pouco usuais. A esteatose e balonismo foram considerados “características necessárias” enquanto a fibrose, apesar de considerada comum e achado histológico que ajuda na identificação não foi considerada necessária para o diagnóstico por 80% dos respondentes (BRUNT, 2004).

3.12 CARÁTER SISTÊMICO

A doença hepática gordurosa não alcoólica é uma doença complexa resultante da interação sistêmica entre o fígado e vários outros órgãos e a correlação entre ela e outras doenças sistêmicas, suscitando estudos pelas comunidades científicas.

Lin, *et al.* (2005), demonstraram através de um estudo de coorte, composto por 2088 trabalhadores do sexo masculino, que a presença de doença hepática gordurosa não alcoólica com diagnóstico ultrassonográfico estava associada a um aumento da prevalência de doença cardíaca isquêmica. Um estudo mais atual conduzido por Perera *et al.* (2016), concluiu que os pacientes com DHGNA têm uma maior mortalidade prevista por síndrome coronariana aguda. Com 120 pacientes participando, foi detectado que o aumento da idade e a presença de DHGNA conferem maior risco de mortalidade por síndrome coronariana aguda, conforme

predito pelo escore GRACE (Global Registry of Acute Coronary Events), portanto, sugeriu tratamento agressivo a esses pacientes. Doenças cardiovasculares já haviam sido apontadas como causa de morte em pacientes com DHGNA (PERAZZO; OLIVEIRA; DUFOUR, 2014).

A doença renal crônica também ocorre em maior incidência em portadores de doença hepática gordurosa não alcoólica, independentemente de fatores de risco convencionais para doença renal como duração e controle do Diabetes mellitus, fatores cardiometabólicos e medicações em uso (TARGHER *et al.*, 2008).

El Azeem *et al.* (2013) confirmaram esses dados ao realizarem um estudo de coorte multicêntrico que acompanhou 747 pacientes por três anos. Todos os pacientes foram submetidos à avaliação clínica e laboratorial incluindo estimativa da taxa de filtração glomerular, avaliação de proteinúria e ultrassonografia abdominal para o diagnóstico de DHGNA. Além disso, os participantes foram avaliados periodicamente para a incidência de eventos cardiovasculares e insuficiência renal. Dentre os 35,8% que receberam diagnóstico ultrassonográfico da DHGNA, a frequência de acidentes cardiovasculares e comprometimento renal foi significativamente maior.

A incidência de eventos cardiovasculares foi de 50,7% nos portadores de DHGNA versus 23% nos demais pacientes. A microalbuminúria teve incidência de 32,8% nos portadores de DHGNA *versus* 18,4% nos demais pacientes, enquanto a macroalbuminúria teve 8,9% de incidência nos portadores de DHGNA vs. 2,9% do grupo controle. Somado a isso, pacientes com DHGNA apresentaram taxa de filtração glomerular média estimada significativamente menor em relação ao grupo controle, com valor de $p < 0,001$. A análise de regressão logística revelou que a DHGNA foi o melhor preditor de insuficiência renal, confirmando-a como um bom preditor de doenças cardiovasculares e renais (El AZEEM *et al.*, 2013).

Conforme De La Monte *et al.* (2010), o cérebro também é alvo das alterações sistêmicas que compõem a doença hepática gordurosa não alcoólica. O eixo fígado-cérebro pode sofrer neurodegeneração mediada por lipídios tóxicos que podem atravessar a barreira hematoencefálica, como as ceramidas, levando a degeneração cerebral progressiva e comprometimento cognitivo na presença de obesidade, resistência à insulina e DHGNA.

As repercussões neurológicas já haviam sido sugeridas anos antes por um estudo que demonstrou que pacientes com EHNA tiveram taxas significativamente maiores de desordem depressiva e desordem de ansiedade ao longo da vida, chegando a representar 63,8% entre portadores de EHNA contra 33,6% no grupo controle, concluindo que pacientes com EHNA

têm taxas aumentadas de transtornos neuropsiquiátricos e estão em risco de comprometimento cognitivo (ELWING *et al.*, 2006).

3.13 DIAGNÓSTICO DA DHGNA

Após revisar diversos trabalhos, Younossi *et al.* (2018), concluíram que nos últimos quarenta anos, a DHGNA evoluiu de uma entidade não reconhecida para uma heterogênea coleção de doenças hepáticas sobrepostas com um fenótipo comum da esteatose hepática.

Apesar do crescente reconhecimento da importância da DHGNA, há desafios significativos para diagnosticar de forma precisa e não invasiva a forma progressiva da doença. Há vários marcadores séricos, modalidades radiográficas e métodos preditivos não invasivos que foram ou estão atualmente sendo investigados. Até hoje, a maioria das modalidades apresentam desempenho abaixo do ideal.

3.14 EXAMES SÉRICOS

O aumento da Alanina Aminotransferase (ALT) anteriormente denominada transaminase glutamicopirúvica (TGP) é uma alteração comum e geralmente está acompanhada de um aumento da Aspartato Aminotransferase (AST), anteriormente denominada transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), ainda que em menor valor. Ao avaliar o valor preditivo da ALT, dados publicados em 2013 mostraram que 11% dos casos de EHNA eram indivíduos com ALT normal (<35 U/L), enquanto a frequência foi de 29% naqueles com níveis elevados de ALT (≥ 35 U/L). Ademais, casos em que a ALT foi duas vezes o limite normal (>70 U/L) apresentaram sensibilidade de 50% e especificidade de 61% para a EHNA. Verma *et al.* (2013), concluíram com esses resultados que altos valores de ALT se correlacionaram com maior especificidade para EHNA e fibrose avançada, porém apresentaram baixa sensibilidade e, portanto, não há níveis ótimos de ALT para prever esses fenótipos de DHGNA.

A fibrose hepática em graus avançados gera disfunção hepatocelular e hipertensão portal que se manifestam com alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Esses testes, sozinhos ou combinados, são ferramentas clínicas potencialmente atraentes, especialmente pelo baixo custo, e auxiliam na primeira fase diagnóstica, de rastreamento (DYSON; MCPHERSON; ANSTEE, 2013). Ao passo que os exames sorológicos tendem a se alterar com a perda de função, os níveis AST permanecem estáveis ou aumentam, levando a um aumento da relação AST/ALT. Esse fenômeno é explorado durante a investigação

diagnóstica inicial e auxilia, juntamente com a história clínica, a estabelecer hipóteses diagnósticas.

A fosfatase alcalina e a gama-glutamiltransferase podem estar elevadas de duas a três vezes o limite superior, porém a elevação é menor do que a visto na hepatite alcoólica auxiliando na diferenciação dessa entidade. Na vigência de DHGNA e cirrose, hipoalbuminemia, tempo de protrombina prolongado e hiperbilirrubinemia podem ser encontrados (ANGULO, 2002).

O emprego desses exames baseia-se no fato de que esses marcadores bioquímicos são mais pronunciados na presença de um distúrbio metabólico causado por doença hepática pois são fatores intimamente relacionados à fisiopatologia de EHNA, conforme confirmado por estudos como o de Leghi *et al.* (2015), onde pacientes com esteatohepatite não alcoólica apresentaram maior nível de glicose, enzimas hepáticas (AST e ALT, Gama Glutamil Transferase {GGT}, Fosfatase Alcalina {FA}), triglicerídeos e superóxido dismutase e valores menores de Glutaciona peroxidase do que os indivíduos do grupo controle, sem a doença.

Um estudo de coorte com pacientes com DHGNA confirmada por biópsia demonstrou que a vantagem de utilizar os exames de rastreio é o valor preditivo negativo relativamente estável para que possam, de forma confiável, excluir fibrose avançada. Entretanto, no geral, o valor preditivo positivo é pobre para diagnóstico da DHGNA (MCPHERSON *et al.*, 2010).

3.15 EXAME DE IMAGEM

3.15.1 Ultrassonografia

A identificação da DHGNA através da ultrassonografia baseia-se no aumento do reflexo das ondas sonoras em relação ao parênquima hepático normal devido a alteração das propriedades do fígado pelos vacúolos intracelulares de gordura presentes na esteatose hepática 2 produzindo um fígado ecogênico. Normalmente a deposição de gordura é difusa, criando uma imagem homogeneamente ecogênica (ATTAR; VAN THIEL, 2013). Na ausência de DHGNA, o fígado é semelhante ou um pouco mais ecogênico que o córtex renal enquanto ecogenicidade mais acentuada entre fígado e córtex renal é sugestivo de esteatose hepática. Outras alterações que podem ser visualizadas são o aumento da reflexão das ondas sonoras pelo fígado infiltrado, menor profundidade de penetração pelo feixe de ultrassom e não visualização de hemidiafragma direito e tríade porta, estruturas normalmente aparentes na

ultrassonografia em pacientes saudáveis (HERTZBERG; MIDDLETON, 2015; LEE; PARK, 2014).

A otimização do método ultrassonográfico tem sido buscada através de métodos que tornem o exame mais quantitativo e menos dependente do operador. O índice hepatorenal, que compara a ecogenicidade do fígado com o rim usando um programa de software, é o mais promissor até o momento. Webb *et al.* (2009), descobriram que um índice hepatorenal de pelo menos 1,49 era 100% sensível e 91% específico para diagnosticar até mesmo esteatose leve enquanto Marshall *et al.* (2012), concluíram que um índice hepatorenal de 1,28 era 100% sensível e 54% específico, utilizando um software diferente.

Ainda que haja largo uso da ultrassonografia para rastrear esteatose hepática, suas limitações por sensibilidade e especificidade subótimas para a detecção de esteatose leve e dependência do operador não a tornam ideal para detectar os estágios iniciais da doença ou para a avaliação longitudinal de pacientes portadores do diagnóstico de DHGNA (ESTERSON; GRIMALDI, 2018).

Em contrapartida, a fração gorda de densidade de prótons derivada da Ressonância magnética (imagens de fração gorda de densidade de prótons a partir de dados brutos do tecido, são criadas através do software *Liver MultiScan Discover*) parece ser a modalidade mais precisa para detectar a gordura hepática, enquanto a Espectroscopia por Ressonância magnética parece ser o teste mais preciso para estadiamento da doença hepática. O resultado de ambas é muito próximo ao resultado histopatológico e não foi observada superioridade entre esses dois exames de imagem (IDILMAN *et al.*, 2016). Portanto, dentre as modalidades de imagem e não invasiva, a Ressonância magnética é considerada padrão-ouro para quantificação da gordura hepática. Embora a disponibilidade e custo destas modalidades apresentem um grande desafio para a prática clínica, a RM é uma maneira não invasiva e precisa de avaliar quantitativamente o conteúdo de gordura hepática.

Na Tomografia computadorizada, a infiltração de gordura hipodensa no fígado diminui sua atenuação, resultando em uma aparência mais escura. O baço serve como um controle interno útil ao avaliar o fígado para esteatose e a diminuição da atenuação hepática em relação à atenuação esplênica demonstrou boa sensibilidade (88% a 95%) e especificidade (90% a 99%) para o diagnóstico de esteatose hepática (MA *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2007).

3.16 EXAMES INVASIVOS

A biopsia hepática ainda é considerada o exame padrão “ouro” para o diagnóstico de EHNA e sua acurácia aumenta, quando é realizada, guiada por Ultrassonografia, permitindo

aquisição robusta de tecido hepático selecionado, diminuindo o risco de punção de estruturas vasculo-biliares e conseqüentemente, de suas complicações (MOK; DIEHL. 2019). É um procedimento invasivo com alguma variabilidade na avaliação das principais características da EHNA, além de uma margem de erro inerente uma vez que biópsia avalia apenas 1:50.000 partes do fígado (RINELLA; SANYAL, 2016).

Conforme o Consenso Brasileiro de DHGNA, as indicações de biópsia hepática são: suspeita de esteatohepatite, diagnóstico diferencial com outras doenças crônicas do fígado, portadores de DHGNA com risco elevado de esteatohepatite ou fibrose avançada sugerida pelos marcadores sorológicos e/ou elastografia hepática, enzimas hepáticas (ALT/AST) elevadas por mais de três meses, portadores de Síndrome Metabólica não controlada com medidas comportamentais depois de seis meses.

NAFLD Fibrosis Score (NFS), APRI, FIB-4 e elastografia transitória são ferramentas que podem colaborar no diagnóstico da fibrose hepática nos pacientes com DHGNA. O NAFLD Fibrosis Score (NFS) é calculado usando seis parâmetros medidos rotineiramente que estão independentemente associados à fibrose avançada e que são, a saber: Idade, hiperglicemia, índice de massa corpórea, contagem de plaquetas, albumina e relação AST/ALT. Ao aplicar um ponto de corte baixo, a fibrose avançada pode ser excluída com valor preditivo negativo de 93%. Um alto limiar de corte ($>0,676$), por sua vez, oferece detecção precisa de fibrose avançada, com valor preditivo positivo de 90% (ÂNGULO *et al.*, 2007).

O FIB4 Score é um teste simples e não invasivos que também apresenta bom desempenho na detecção de fibrose avançada na DHGNA. Uma pontuação $<1,3$ tem um valor preditivo positivo de 90% para a fibrose no estágio 3-4, enquanto uma pontuação $>2,67$ tem um valor preditivo positivo de 80% (SHAH *et al.*, 2009).

3.17 TRATAMENTO

Sendo a DHGNA uma doença metabólica sistêmica, seu tratamento é baseado em mudanças alimentares e de estilo de vida, induzindo perda peso, diminuindo a resistência à insulina, melhorando o perfil glicêmico e lipídico e evitando desnutrição, que agrava o quadro de EHNA e fibrose. Há recomendação que a perda de peso seja de pelo menos 7-10% do peso inicial em 6 meses (BRUNNER *et al.*, 2019).

Uma revisão sistemática envolvendo 8 estudos foi realizada por Golabi *et al.* (2016), para investigar a eficácia de intervenções de exercícios na regressão da gordura hepática em

pacientes com doença hepática gordurosa não-alcoólica. Totalizando 433 participantes adultos, as intervenções de treinamento variaram entre uma frequência de exercício de 3 a 7 dias por semana, com intensidades entre 45% e 75% do pico de volume de oxigênio. O efeito da intervenção na mobilização de gordura foi de 30,2% no grupo cuja intervenção foi somente exercício e 49,8% no grupo de dieta e exercício. Não houve diferença entre exercícios aeróbicos e resistência. Além disso, combinando um programa de exercícios com intervenções dietéticas houve também melhora nas medidas de controle glicêmico e/ou sensibilidade à insulina.

Ensaio clínico randomizado com biópsias consecutivas demonstraram que a regressão da fibrose em pacientes com EHNA é possível quando há diminuição de mais de 10% da massa corporal. A perda ponderal de no mínimo de 7 a 9% da massa corporal é capaz de reduzir o processo necro-inflamatório e a melhora da resistência à insulina é possível com perda de mais de 7% do peso corporal (COTRIM *et al.*, 2016; LASSAILLY *et al.*, 2016).

O manejo da DHGNA é multidisciplinar e a dieta empregada no tratamento deve ser definida com um profissional capacitado. Muitos estudos demonstraram uma associação entre poli-fenóis naturais em frutas e vegetais com uma diminuição do risco de desenvolver doenças crônicas (DEL RIO *et al.*, 2013).

Um estudo observacional propôs uma intervenção de seis meses para o tratamento de pacientes com DHGNA através de intervenção dietética com dieta do mediterrâneo. A porcentagem de pacientes com grau de esteatose igual ou superior a 2 foi reduzido de 93% para 48% e esteatose regrediu em nove pacientes (20%). No fim do tratamento a redução de 7% do peso foi alcançada por 25 dos 46 pacientes, ou seja, 54,3%. No que diz respeito às enzimas hepáticas, todas diminuíram significativamente durante o tratamento e a normalização foi particularmente evidente para a enzima ALT. Além disso, melhora do perfil lipídico de vários pacientes também foi observada (GELLI *et al.*, 2017).

Os efeitos da dieta mediterrânea também foram explorados por um estudo randomizado que demonstrou melhora do IMC, circunferência do quadril e cintura, nível de triglicérides, colesterol total e nível sérico de LDL-C em todos os pacientes que seguiram a dieta mediterrânea por um período de seis meses. A dieta também levou à diminuição do acúmulo de gordura intra-hepática (ABENAVOLI *et al.*, 2007).

Além das modificações de estilo de vida, pacientes com evidência de fibrose em estágio 2 ou mais devem ser avaliados para tratamento farmacológico (RINELLA; SANYAL, 2016). Por não haver terapia farmacológica específica para DHGNA aprovada, o tratamento farmacológico baseia-se no controle dos fatores de risco presentes no paciente, mediante

avaliação individual, e busca alcançar um benefício que suplante os riscos. Dentre as classes passíveis de uso em pacientes com DHGNA estão inclusas medicações antiobesidade, metformina, tiazolidinedionas, agonistas do PPAR e antioxidantes, como a vitamina E, que está sendo alvo de estudos.

Além da vitamina E, outros componentes têm sido estudados como auxiliares na terapia da DHGNA, podendo ser encontrados em alimentos da dieta. De acordo com os resultados publicados por Shin; Jung, (2017), a ingestão de flavonoides não representa o método ideal para o tratamento de NAFLD, mas é uma medida preventiva adequada. Assim, Shin; Jung, (2017) propuseram que a ingestão diária de alimentos ricos em flavonoides é um bom método para prevenir a DHGNA. Dessa forma, estes autores, propuseram que dietas ricas em flavonoides seriam boas para reduzir DHGNA em modelos animais. Antocianinas são flavonoides utilizados em estudos *in vitro*, os quais relatam sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo de hepatócitos, promovendo resposta antioxidante, e também representam um potencial uso terapêutico no futuro (GROSSO *et al.*, 2013).

A quercetina foi caracterizada pela sua potente atividade antioxidante em hepatócitos e em lesão hepática experimental (CUEVAS *et al.*, 2011) e foi capaz de reduzir o acúmulo de gordura no fígado estimulando a ômega-oxidação de ácidos graxos (HOEK-VAN DEN HIL *et al.*, 2013). A rutina, um glicosídeo da quercetina, está contida em vários alimentos, incluindo cebolas, maçãs e vinho tinto. Panchal *et al.* (2011), demonstraram que ratos alimentados com alto teor de gordura e alta dieta de carboidratos e tratados com administração rutina apresentaram diminuição da adiposidade, melhor sensibilidade à insulina e redução do dano hepático e remodelação cardíaca.

3.18 PROGNÓSTICO

O prognóstico da DHGNA varia conforme o fenótipo e o polimorfismo genético da doença nos genes *PNPLA3* e *TM6SF2* e também se agrava conforme o espectro da doença se afasta da esteatose simples e se aproxima dos estágios finais da EHNA, o que torna o acompanhamento da progressão da doença um fator essencial ao manejo desses pacientes a fim de identificar e intervir em lesões preditivas de pior prognóstico (BERTOT; ADAMS, 2012; EKSTEDT *et al.*, 2015).

A DHGNA, independente de sua apresentação, já afeta a mortalidade dos pacientes. Em um estudo de coorte que seguiu 229 pacientes com DHGNA comprovada por biópsia por 26,4 anos, foi concluído que pacientes com DHGNA têm risco aumentado de morte, com alto

risco de morte por doença cardiovascular e doença relacionada ao fígado (EKSTEDT *et al.*, 2015). A associação de DHGNA e diabetes mellitus tipo 2 apresenta ainda pior prognóstico, acelerando a progressão da doença hepática até cirrose, com aumento do risco de carcinoma hepatocelular (BILLETER *et al.*, 2016).

Ekstedt *et al.* (2015), demonstraram ainda que o NAS não foi capaz de prever mortalidade geral, enquanto o estágio de fibrose (3 e 4) predisse mortalidade global e específica da doença. Ainda que o prognóstico de pacientes com EHNA nos estágios 1 a 2 de fibrose permaneça excelente em curto prazo, estes são pacientes de risco para progressão para cirrose.

Portanto, a fibrose é uma lesão que afeta de forma significativa o prognóstico dos pacientes. Dulai *et al.* (2017) demonstraram que, em comparação com doentes com DHGNA sem fibrose, os doentes com DHGNA com fibrose apresentaram aumento do risco de mortalidade por todas as causas e este risco aumentou com o aumento da fase de fibrose. Ademais, o risco de mortalidade relacionada ao fígado aumenta em uma escala exponencial e não em uma escala linear com aumento no estágio de fibrose.

Le *et al.* (2017) conduziram um estudo com 6.000 pessoas e apontaram prevalência de doença hepática gordurosa não alcoólica em 30,0%, sendo que 10,3% destes tinham fibrose avançada. A mortalidade global em indivíduos com DHGNA com fibrose avançada foi significativamente maior do que os indivíduos sem DHGNA. A mortalidade, porém, não foi alterada em sujeitos com DHGNA sem fibrose avançada (1,1% e 2,8%, respectivamente). Portanto, a doença hepática gordurosa não alcoólica com fibrose avançada é um preditor independente de mortalidade na análise multivariada.

3.18.1 Esteatose hepática experimental

A utilização de modelos animais com EHNA é muito importante no estudo desta doença, pois pode permitir melhor entendimento de sua fisiopatologia, ajudar a esclarecer os mecanismos envolvidos na transição da esteatose para a EHNA, bem como testar o resultado das várias drogas disponíveis para o seu tratamento. A indução de EHNA tem sido realizada de diferentes maneiras: indução medicamentosa (tetraciclina, amiodarona, corticosteróides, entre outros); indução em animais manipulados geneticamente para o desenvolvimento de obesidade e com a utilização de dietas que promovem a sua ocorrência, seja por serem ricas em gordura, seja por restrição de aminoácidos (BUETTNER, *et al.*, 2006).

3.19 *ENDOPLEURA UCHI*: CARACTERIZAÇÃO E USO POPULAR

As plantas medicinais, definidas como espécies vegetais, cultivadas ou não, utilizadas com propósitos terapêuticos (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017), têm seu uso difundido desde as antigas civilizações baseado em conhecimentos empíricos. Cerca de 25% dos medicamentos prescritos mundialmente são derivados de plantas e cerca de 80% das pessoas que vivem nos países em desenvolvimento ainda dependem de plantas tradicionais como medicamentos (FARNSWORTH *et al.*, 1985).

Atualmente, a prática ainda é mantida especialmente em países em desenvolvimento e seu uso é pautado por conhecimento e crenças populares, de forma que a ampla utilização dos produtos naturais sugere uma relação risco-benefício favorável. Na Amazônia, muitas comunidades encontram-se isoladas dos centros urbanos e sem acesso a um serviço público de saúde, levando-os a utilizarem as plantas medicinais nas terapias alternativas como principais formas de tratamento de doenças (BORRÁS, 2003).

A *Endopleura uchi* é considerada pelo conhecimento popular como anti-inflamatória, sendo empregada no tratamento de artrite, da hipercolesterolemia, do diabetes, no controle de diarreias além de seu emprego mais usual, em infecções uterinas e miomas (REVILLA, 2001; CORRÊA, 1984).

A espécie *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec, pertencente ao gênero *Endopleura*, é conhecida popularmente como uxi-amarelo, uxi-liso, uxi, uxi-ordinário, uxi-verdadeiro, axuá, cumatê ou pururu (PRANCE; SILVA, 1975; LORENZI, *et al.*, 2006). Faz parte da família Humiriaceae, pertencente à ordem *Malpighiales*, que engloba 50 espécies de plantas classificadas em 8 gêneros: *Duckesia*, *Endopleura*, *Humiria*, *Humirastrum*, *Hylocarpa*, *Sacoglottis*, *Schistostemon* e *Vantanea* (GIORDANO; BOVE, 2008; CUATRECASAS, 1961).

A planta é encontrada em estado silvestre em mata de terra firme, dispersa por toda a Bacia Amazônica. O fruto é uma dupla oblongo-elipsoide de 5 a 7 cm de comprimento, 3 a 4 cm de diâmetro, com peso entre 50 e 70g e apresenta coloração verde-amarelada ou parda escura quando maduro (ALEXIADES; SHANLEY, 2004). A elucidação estrutural dos constituintes químicos de *Endopleura Uchi*, a indicaram como fonte de ácidos graxos, fibras, esteroides, sais minerais, vitaminas C e E. Os principais ácidos graxos identificados foram o ácido oleico (7,38%) e ácido palmítico (3,78%) através da análise de polpa de frutos de uchi (MARX *et al.*, 2002).

3.20 ANÁLISES FITOQUÍMICAS E PROPRIEDADES DO UCHI AMARELO

Estudos fotoquímicos realizados por Muniz (2013); Luna *et al.* (2000); Lagos (2006), isolaram as substâncias friedelina, bergenina e seu derivado 8,10- dimetilbergenina, ácido maslínico, éster masilinato de metila, β -sitosterol e estigmasterol, e triterpeno pentacíclicos pseudotaraxasterol.

A friedelina, um triterpeno pentacíclicos, possui atividade anti-inflamatória testada na dosagem de 40 mg/kg, através do teste de edema de orelha e edema de pata, além de apresentar efeito analgésico (ANTONISAMY; DURAIANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2011).

A Bergenina, um derivado do ácido gálico, indicada como componente majoritário da *Endopleura uchi*, foi encontrada em maior concentração no extrato metanólico e pode estar relacionada às atividades biológicas indicadas popularmente para a espécie (MUNIZ, 2013). Os análogos da bergenina acetilbergenina, norbergenina e desmetilbergenina também já foram descritos na literatura (BORGES, 2010).

Por sua vez, ácido maslínico e éster masilinato de metila são triterpenóides pentacíclicos enquanto β -sitosterol e estigmasterol são fito esteróis.

Na quantificação de compostos fenólicos nos extratos de *Endopleura uchi*, foram encontrados níveis consideráveis de ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbestenos, taninos condensados e hidrolisáveis entre outras estruturas (NACZK; SHAHIDI, 2004), presentes em todas as partes da espécie estudada. Os valores de taninos totais encontrados nos extratos de cascas em pó de *Endopleura uchi* foram todos em torno de 21% (POLITI *et al.*, 2011).

Os flavonoides e os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante por diferentes vias: componentes fenólicos agem neutralizando a reatividade de radicais livres e bloqueando as reações em cadeia enquanto os flavonoides promovem deslocamento de elétrons da nuvem eletrônica e tornam as moléculas de radicais mais estáveis (BILIERI *et al.*, 2011).

Estudo de Silva & Teixeira, (2015) demonstraram efeito antioxidante da *Endopleura uchi* mediante sua ação contra o radical superóxido, óxido de nitrogênio e radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. Além disso, as concentrações de extrato de infusão testadas revelaram não haver toxicidade para a linha de células intestinais (Caco-2). Politi *et al.* (2011), confirmaram em seu estudo a alta atividade antioxidante aliada à baixa cito toxicidade dos extratos de *Endopleura uchi*.

Para avaliação dos efeitos da *Endopleura uchi* na DHGNA, um estudo experimental demonstrou que os grupos que consumiram extrato seco da *E. uchi* alcançaram redução significativa no ganho de massa corporal, bem como redução da esteatose macro e microvesicular, sendo observada diminuição de até 50% do grau da esteatose no grupo que recebeu a intervenção. Os pesquisadores observaram ainda redução da balonização hepatocelular, do infiltrado inflamatório e do grau de fibrose, presente em alguns casos. O extrato seco de *Endopleura uchi* não alterou significativamente as concentrações das aminotransferases, mas reduziu de forma notável os níveis séricos de colesterol total (BRANCO *et al.*, 2018).

3.21 TOXICIDADE DA *Endopleura uchi*

O uso popular orientado pelo conhecimento empírico e observacional das plantas consideradas tóxicas ou não, aliado às poucas pesquisas desenvolvidas na área de toxicidade de plantas medicinais, contribuiu para que a toxicidade, reações adversas e interações medicamentosas representem parte importante das complicações relacionadas ao uso de produtos naturais. Apesar do uso disseminado por povos nativos sugerir ausência de toxicidade importante, a confirmação desse dado só foi possível mediante testes “*in vivo*” através da administração de doses agudas de extrato aquoso de *Endopleura uchi* em concentração de até 2000mg/kg de peso via oral, que não mostrou sinais de toxicidade sistêmica, mortes e tampouco modificações comportamentais nos animais (POLITI *et al.*, 2010). Resultados semelhantes foram encontrados com a administração sub crônica, por 22 dias, de extrato de *Endopleura uchi* na dose de 500mg/kg de peso, que não resultou em morte, alteração na massa corporal ou na ingestão diária de água e alimentos por estes animais, nem alterações dos parâmetros bioquímicos e hematológicos (SÁ *et al.*, 2015).

3.22 BERGENINA: CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES

O estudo de Magalhães *et al.* (2007), constitui o primeiro registro da presença de Bergenina e carotenoides nos frutos de *uchi*. Anos depois, a Bergenina foi identificada e isolada como possível agente ativo da *Endopleura uchi* e, dessa forma, como possível agente da ação anti-inflamatória da planta. Esta ação, por sua vez, foi comprovada mediante demonstração de inibição das enzimas Cox 2, principal isoforma envolvida no processo inflamatório (NUNOMURA *et al.*, 2009).

Estudo realizado por Silva *et al.* (2009), para verificar a atividade antimicrobiana da Bergenina, demonstrou sua capacidade de inibir o crescimento das leveduras *C. Albicans*, *C. Tropicalis* e *C. Guilliermondii*, explicando seu popular uso em afecções ginecológicas na medicina tradicional.

Propriedades metabólicas também têm sido demonstradas. A administração oral de Bergenina a ratos hiperlipidêmicos por 14 dias diminuiu significativamente os lipídios séricos totais, mas não gerou mudança significativa nos níveis de triglicerídeos. No entanto, após 21 dias de administração, o colesterol sérico, triglicerídeos e níveis de lipoproteína de baixa densidade foram significativamente reduzidos, enquanto o nível sérico do colesterol de alta densidade foi elevado (JAHROMI; CHANSOURIA; RAY, 1992).

Além disso, verificou-se que atividades enzimáticas da alanina/aspartato aminotransferase, sorbitol desidrogenase, γ -glutamilttransferase, Glutathione S transferase e Glutathione reductase foram restauradas para normalização em modelos experimentais após administração oral de Bergenina. Ratos pré-tratados com Bergenina tiveram a peroxidação lipídica induzida pela 2,4-dinitrofenil-hidrazina reduzida de forma significativa no fígado, cérebro e glóbulos vermelhos (MADUKA; OKOYE; EJE, 2002).

A administração de Bergenina a 10 mg/kg em modelo experimental de Diabetes Mellitus tipo 2 reduziu significativamente o nível de glicose no sangue em ratos diabéticos, apresentou efeito regenerativo da Bergenina nas células β pancreáticas, demonstrado por estudo histopatológico, e reverteu o perfil lipídico, gerando redução do nível de colesterol total, colesterol LDL e aumento do colesterol HDL. No entanto, a Bergenina não apresentou efeito significativo sobre os níveis séricos de triglicerídeos (KUMAR *et al.*, 2012).

Oliveira; Ramalho; Dantas (2011) relataram propriedades antinociceptivas e antiinflamatórias da Bergenina devido à inibição da liberação de IL-1 β e TNF- α . No mesmo estudo, a citometria de fluxo revelou que a Bergenina inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- α) e promove a produção de citocinas Th2 (IL-4 e IL-5).

Seu potencial terapêutico em hepatopatias também foi explorado por Lim *et al.* (2000), que demonstraram o efeito hepatoprotetor da Bergenina em estudo experimental de lesão hepática induzida, de forma que os grupos tratados com 50, 100 e 200 mg /kg de Bergenina apresentaram significativa diminuição dos níveis elevados de AST, ALT, SDH e γ -GT quando comparados com o grupo controle.

Os resultados de um estudo in vivo indicaram que a lesão hepática alterou o comportamento farmacocinético de Bergenina e aumentou sua absorção após uma dosagem, o

que pode promover sua eficácia terapêutica. Esses resultados ratificam o uso potencial da Bergenina como agente hepatoprotetor (RONG-HUA *et al.*, 2016).

3.23 PANORAMA DOS TRABALHOS DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL NO CONTEXTO DA DHGNA.

A patogênese e progressão da DHGNA humana podem ser melhor compreendidas através de modelos animais que espelham a histopatologia e a fisiopatologia de cada estágio da doença (LAU; ZHANG; YU, 2017). Os ratos desenvolvem-se rapidamente durante a infância e, na idade adulta, cada mês do animal é aproximadamente equivalente para 2,5 anos humanos (QUIIN, 2005). Estudos experimentais estimaram que cada dia de vida do animal corresponde a 30 dias da vida humana (ANDREOLLO *et al.*, 2012).

Dentre os modelos animais, os que utilizam dietas modificadas se aproximam mais fielmente do mecanismo ocorrido em humanos. Conduzido por Lieber *et al.* (2004), o modelo de doença hepática gordurosa não alcoólica induzida por dieta usou ratos alimentados com uma dieta composta por 71% de gordura, 11% de carboidratos e 18% de proteína por 3 semanas, em comparação aos ratos alimentados com uma dieta padrão e demonstrou o desenvolvimento de esteatose hepática, além de concentrações lipídicas quase duas vezes maiores em comparação ao grupo controle.

Similarmente aos pacientes humanos com DHGNA, os ratos desenvolveram resistência a insulina. Outro modelo animal dietético que se mostrou promissor quanto aos resultados alcançados é o modelo de dieta deficitária em colina e metionina. Rinella; Green (2004), demonstraram que camundongos alimentados com uma dieta lipogênica com quantidades consideráveis níveis de sacarose (40%), moderadamente enriquecido com gordura (10%) e deficiente em metionina e colina permitiu a progressão rápida para EHNA além de reproduzir os mecanismos implicados na sua patogênese.

Entretanto, o modelo se mostrou limitado por apresentar disparidades com o perfil metabólico encontrado em pacientes: em vez de serem obesos, os camundongos alimentados com a dieta deficiente em colina e metionina tiveram perda de peso significativa, caquexia, ausência de resistência à insulina além de baixa glicemia de jejum, baixos níveis de leptina e triglicérides (RINELLA; GREEN, 2004).

Para avaliação dos perfis bioquímicos em experimentação animal, a análise comparativa entre os grupos é de importante validade uma vez que valores de referência propostos por estudos anteriores apresentaram resultados discrepantes para as mesmas linhagens de animais (JACKSON LABORATORY, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2008; BRANCO

et al., 2011; RESTELL *et al.*, 2014). Existem vários fatores que podem influenciar os resultados dessas investigações, como sexo, idade, variação genética, dieta e condições ambientais.

A tabela 1 apresenta a avaliação bioquímica realizada por Santo *et al.* (2016), resultou nos seguintes valores.

Tabela 1: Avaliação bioquímica realizada por Santo *et al.*, (2016).

Parâmetros	Swiss Webster	C57Bl/6
Triglicerídeos (mg/dL)	130 ± 7	100 ± 10
Colesterol (mg/dL)	73 ± 10	89 ± 9
Glicose (mg/dL)	158 ± 4	185 ± 15
Albumina (g/dL)	2.8 ± 0.1	2.5 ± 0.3

Fonte: Santo *et al.* (2016).

Quando submetidos a uma dieta hipercalórica e rica em gorduras, camundongos C57BL/6J apresentam significativo aumento do peso corporal e modificações bioquímicas, como resistência a insulina, aumento dos níveis de triglicerídeos, colesterol e enzimas hepáticas, além de aumento do nível de citocinas inflamatórias apontando um perfil metabólico compatível com o perfil encontrado em humanos. O fígado desses animais também apresenta modificações compatíveis com DHGNA em diferentes graus, porém a interrupção do estímulo calórico resulta em recuperação quase total da arquitetura hepática desses animais em médio prazo (NAKAMURA; TERAUCHI, 2013).

Uma dieta enriquecida em frutose e colesterol, além da gordura, induziu o desenvolvimento de EHNA em camundongos C57BL/6J no estudo conduzido por Clapper *et al.* (2013). A administração a longo prazo da dieta induziu obesidade, resistência à insulina e aumento dos fígados que exibiram características típicas da EHNA como inflamação portal, tecido fibrótico e tumores de vários diâmetros na superfície hepática. Estas lesões nodulares foram observadas na superfície do fígado em 10% dos animais após 30 semanas e em 54% dos animais após 60 semanas de administração da dieta alterada (NAKAMURA *et al.*, 2012).

Dentre os trabalhos experimentais para tratamento da DHGNA, alguns merecem destaque pela metodologia aplicada. Apesar da escassez de estudos com *Endopleura uchi* e bergenina em caráter experimental, Hsu & Yen (2007), utilizaram o ácido gálico como intervenção em ratos alimentados com ração hipercalórica que desenvolveram DHGNA.

Através de coloração com hematoxilina e eosina, foi demonstrada arquitetura hepática normal no grupo alimentado com uma ração balanceada, enquanto o grupo da dieta hipercalórica apresentou esteatose macrovesicular acentuada. Ao comparar com o grupo que recebeu o ácido gálico, foi notado que o número de gotículas lipídicas e os níveis de triglicerídeos hepáticos eram menores que no grupo que não recebeu intervenção. Outro estudo utilizou a planta *Alisma orientalis*, rica em triterpenóides, e notou que o tratamento com extrato metanólico do *Alisma orientalis* atenuou a esteatose hepática e a deposição de colágeno no fígado, melhorou a resistência à insulina nos ratos com DHGNA e preveniu notavelmente a elevação dos níveis séricos de aminotransferases sugerindo efeito protetor desse ativo (HONG *et al.*, 2006).

Ratificando esses dados, foi demonstrada que a administração de ácido gálico diminuiu notavelmente as alterações causadas pela esteatose hepática grave, além dos níveis séricos de AST e ALT em camundongos com DHGNA induzida por dieta. Além de reverter o excesso de gordura acumulada no vacúolo intracelular hepático, a administração de ácido gálico reduziu o nível de triglicerídeos, colesterol e ácidos graxos no fígado, indicando que o mesmo melhora a esteatose hepática e possui um potencial efeito hepatoprotetor (CHAO *et al.*, 2014).

Tendo em vista o papel crucial do estresse oxidativo no desenvolvimento e evolução da esteatose e da esteatohepatite, os antioxidantes são compostos também explorados como potencial terapêutico adjuvante. Após extensa revisão, Ferramosca; Di Giacomo; Zara (2017) demonstraram evidências de que de antioxidantes de várias classes são capazes de reverter a esteatose por um mecanismo pouco entendido, um efeito possivelmente envolvendo a função mitocondrial.

Amato *et al.* (2017), *verificaram* o impacto de uma dieta contendo vários produtos naturais com propriedades antioxidantes, como cúrcuma, silimarina, guggul e inulina em camundongos C57BL/J6 com DHGNA e aterosclerose. Nos animais com DHGNA, o fígado estava aumentado, com coloração amarelo pálido, friável e com textura gordurosa atribuível ao acúmulo de gordura no parênquima hepático. Histologicamente, apresentavam esteatose micro e macrovesicular. Nos animais tratados, por sua vez, a anatomia macroscópica do fígado não foi afetada e a análise histológica não revelou a presença de esteatose, além de apresentarem triglicérides e colesterol LDL diminuídos, e aumento do colesterol HDL em comparação com animais não tratados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AQUISIÇÃO DA *ENDOUPLEURA UCHI*

As cascas de *Endopleura uchi*, foram adquiridas no Instituto de Medicina Tradicional, estabelecimento comercial do botânico Juan Revilla Cardenas, localizado na Avenida Castelo Branco n° 1071-B, bairro Cachoeirinha, Manaus-Amazonas. As informações são que as cascas foram colhidas de espécies previamente catalogadas no herbário do INPA sob o número 177673 e 177660. Estas cascas passaram pelo processo de secagem e trituração, a fim de diminuir seu volume, em seguida pesadas e separadas em porções de 60 gramas.

4.1.1 Preparação do extrato seco

A preparação da solução aquosa das cascas da *Endopleura uchi*, foi realizada conforme prescrito na medicina tradicional da Amazônia. Utilizou-se 1000 ml de água destilada e 60g de casca da *E. uchi* devidamente processada, posteriormente este conjunto foi fervido por 10 minutos e após o processo de fervura, o chá foi levado ao equipamento Spray Dry, para proceder a desidratação, permanecendo apenas a massa sólida do extrato seco.



Fonte: O pesquisador

Figuras: 1-A. Árvore de *Endopleura uchi*. 1-B. Coleta da casca da *Endopleura uchi*.

1-C. Preparação do chá popular de *Endopleura uchi*.

- Quantificação da Bergenina nos extratos

Preparação do extrato aquoso. O extrato da casca foi preparado na concentração de 200mg/mL em MeOH:TFA 0,1% (2:8) e em seguida foram filtradas em membrana de 0,2 μ m PTFE e submetido à análise por Ultra Fast Liquid Chromatography (UFLC) com detector de UV, tipo DAD. As análises foram realizadas em triplicata.

- Condições de Análise UFLC

Para o sistema de separação foi utilizado um equipamento da Shimadzu Prominence UFLC consistindo de bomba binária (LC-20AD), injetor automático (SIL-20A HT), forno para coluna (CTO-20AC) e detector DAD (SPD-M20A). Utilizou-se uma coluna analítica LiChrospher 100 RP-18e (250 x 4 mm, 5 mm de partícula) mantida em 30°C. O método cromatográfico utilizou como fase móvel uma solução de ácido trifluoroacético 0,1% (eluyente A) e metanol (eluyente B). O sistema de eluição foi isocrático em 20% de B por 30 minutos. O volume de injeção foi de 50 µL e o fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min. Para processamento foi realizado o programa LC-Solution.

4.2 AQUISIÇÃO DA BERGENINA

A Bergenina usada para tratamento da esteatose foi adquirida no CN Lab. Nutrition Asia Group, 802 Suite, Tower A, ShijiYiyuan 4th GaoXin rd. High-Tech Economic zone Xian, Shaanxi P. R. China Tel. + 86 029-8730073688443022. www.cnlab.ca. (Anexo B).

PRODUTO: Bergenina 98%, HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Este, depois de adquirido foi enviado ao Laboratório de Química Analítica da Faculdade de Química da UFAM, onde foi confirmada sua composição química com pureza de 98% HPLC.

4.2.1 Preparação da solução aquosa da Bergenina

A preparação foi obtida pela diluição do pó de Bergenina 98% HPLC, em solução fisiológica 0.9 % e ofertado diariamente por gavagem, nas doses de 50 e 25 mg/Kg/dia, num volume de 0,3 a 0,5ml.

4.3. RAÇÃO

Foram utilizadas dois tipos de ração na dieta destes animais; uma ração comercial para camundongos TEKLAD[®], GLOBAL DIETS, contendo 18% de proteínas, 5% de gordura e 5% de fibras. A segunda foi a ração hipercalórica e hiperlipídica (RH), composta de 25% de caseína (9,750 kg), 36% de banha de porco (9,750 kg) e 39% de ração comercial TEKLAD, GLOBAL DIETS utilizada para indução da esteatose nos animais. A RH foi elaborada no Laboratório de Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFAM.

4.3.1 Preparação da ração

A ração comercial TEKLAD, GLOBAL DIETS (Figura 2-A) foi triturada a pó, misturada à caseína com banha de porco por 30 min. até alcançar uma consistência de massa

mais endurecida. Moldada em formato de rolha (Figuras 2-B) e assada em estufa a 150⁰C, por 6h. Posteriormente foi enviada ao Laboratório de Nutrição do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), para verificação de sua composição nutricional. A RH produzida no Laboratório de Fisiologia do ICB-UFAM, encontra-se em análise para patente.

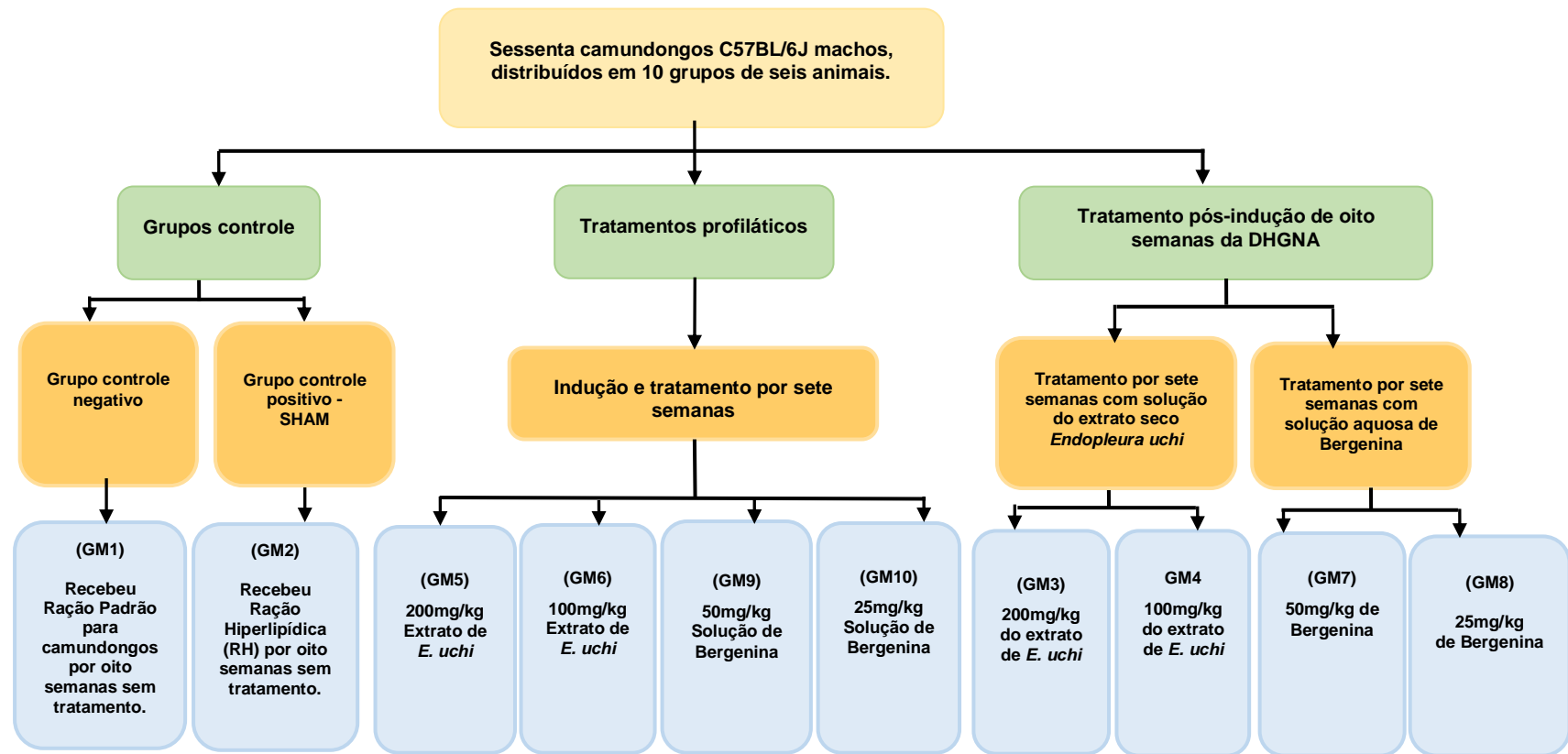


Figura 2 (A-B): A - Ração comercial; B - Ração Hiperlipídica.

Todos os grupos de animais foram pesados semanalmente, para acompanhamento do ganho de massa corporal, assim como, para controle de consumo de ração por cada grupo.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo é do tipo experimental, pré-clínico, randomizado e controlado. Foram utilizados 60 camundongos machos C57BL/6J, distribuídos em 10 grupos e, cada grupo formado por seis animais. O delineamento foi inteiramente ao acaso para cada ensaio experimental. Os grupos (GM1 e GM2) são os grupos controles negativo e positivo respectivamente. Um ensaio denominado tratamento profilático (indução e tratamento por sete semanas ao mesmo tempo) constituído pelos grupos (GM5, GM6, GM9 e GM10), tratados com solução reidratada de extrato seco de *Endopleura uchi* e solução aquosa de Bergenina, respectivamente, em duas doses diferentes. O outro ensaio, denominado de tratamento pós-indução, constituído pelos grupos (GM3, GM4, GM7e GM8), iniciou o tratamento por sete semanas, somente após oito semanas de indução do ganho de massa corporal e da esteatose com (RH) aos mesmos moldes dos grupos tratados profilaticamente, (Figura 2).



Fonte: O pesquisador

Figura 3: Delineamento do estudo.

4.5 CARACTERIZACAO DOS GRUPOS DE ANIMAIS

O quadro 3 apresenta as características dos 10 grupos de modo individual. Cada grupo formado por seis camundongos C57BL/6J, machos, pesando 25-40g.

Quadro 3: Características dos grupos de camundongos estudados.

GRUPOS	CARACTERÍSTICAS
GM1	<u>Controle Negativo</u> , alimentados com ração comercial TEKLAB [®] , GLOBAL DIETS, contendo 18% de proteínas, 5% de gordura e 5% de fibras, por oito semanas.
GM2	Grupo Controle Sham: <u>Controle Positivo</u> , alimentados com Ração Hiperlipídica (RH) por 8 semanas para induzir a esteatose e a obesidade.
GM3	Alimentados com RH por oito semanas. Após este período de indução da esteatose, foram tratados com extrato seco reidratado de <i>Endopleura uchi</i> , por gavagem diária, na dose de 200mg/kg/dia, por sete semanas.
GM4	Alimentados com RH por oito semanas dias. Após este período de indução da esteatose, foram tratados com extrato seco reidratado de <i>Endopleura uchi</i> , por gavagem diária, na dose de 100mg/kg/dia, por sete semanas.
GM5	Alimentados com RH por sete semanas dias e, tratado concomitantemente com 200mg/kg/peso de extrato seco reidratado de <i>Endopleura uchi</i> a fim de verificar um potencial efeito profilático.
GM6	Alimentados com RH por sete semanas e, tratados concomitantemente com 100mg/kg/peso de extrato seco reidratado de <i>Endopleura uchi</i> para verificar um potencial efeito profilático do mesmo.
GM7	Alimentados com RH por oito semanas, e tratado em seguida com solução de Bergenina 98% HPLC, na dose de 50mg/kg/dia, por mais sete semanas.
GM8	Alimentados com RH por oito semanas, e tratado em seguida com solução de Bergenina 98% HPLC, na dose de 25mg/kg/dia, por mais sete semanas.
GM9	Alimentados com RH por sete semanas e, tratado concomitantemente com 50mg/kg/dia de solução de Bergenina 98% HPLC, a fim de verificar um potencial efeito profilático.
GM10	Alimentados com RH por sete semanas e, tratado concomitantemente com 25mg/kg/dia de solução de Bergenina 98% HPLC, a fim de verificar um potencial efeito profilático.

Fonte: O pesquisador

Todos os animais foram adquiridos no Biotério da Universidade Federal do Amazonas e foram mantidos durante o experimento, no setor de experimentos do próprio biotério da UFAM. Cada grupo foi acomodado em gaiola individual de plástico translúcido medindo 40x33x17 cm, com tampa de grade metálica, com temperatura ambiental controlada em 22⁰ C e ciclos de 12 horas dia e 12 horas noite, recebendo água “*ad libitum*”. Ao final dos procedimentos cirúrgicos, todos os grupos de animais, foram eutanasiados por técnica de exanguinação, ainda sob efeito de anestesia geral, devidamente embalado em papel alumínio e descartado pelo próprio biotério da UFAM.

4.6 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Todos os animais foram anestesiados com solução composta (1:1) de Cloridrato de Xilazina (20mg/ml), Cloridrato de Quetamina (50mg/mL). A dose utilizada foi de 1 ml/kg de peso intraperitoneal (i.p). Foi ofertado oxigênio num fluxo de 1 litro/min, em campana plástica semiaberta, cobrindo parcialmente a cabeça do animal, permitindo uma livre troca gasosa com o meio ambiente.

Após a indução anestésica, com o animal em posição supina, foi feita a tricotomia dos pelos do animal, nas áreas da incisão e mantidos com isolamento térmico.

Foi realizada a coleta de sangue (0,7 a 1mL) por punção intracardíaca, em seguida foram devidamente armazenados, heparinizados e enviados ao laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFAM.

Todos os grupos foram submetidos à toracolaparotomia nos seus devidos tempos, conforme exposto no quadro 4.

Quadro 4: Procedimentos de tóracolaparotomia dos grupos de camundongos estudados.

GRUPOS	TEMPOS DE TÓRACOLAPAROTOMIA
Controle Negativo (GM1)	Após oito semanas alimentando-se de ração comercial TEKLAD [®] , GLOBAL DIETS, sob anestesia geral foi submetido a tóracolaparotomia, fotografado seus órgãos maciços (coração, fígado, rins e gordura visceral) a fim de utilizar como controle e registro macroscópico dos órgãos “normais”, não prejudicados pela esteatose e obesidade induzida nos demais grupos. Submetido a hepatectomia e estas peças foram devidamente armazenadas em formol tamponado a 10% e enviado ao laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) UFAM.
Controle Positivo/Sham (GM2)	Após o período de indução da esteatose por oito semanas com RH, foi submetido aos mesmos procedimentos do grupo controle negativo. Nestes, com o propósito de confirmar os danos causados pela esteatose e obesidade induzida e não tratada.
Grupos de Tratamento Profilático (GM5, GM6, GM9 e GM10)	Após sete semanas de indução e tratamento concomitantes, foram submetidos aos mesmos procedimentos dos grupos anteriores.
Grupos de Tratamento Pós-Indução (GM3, GM4, GM7 e GM8)	Após oito semanas de indução mais sete semanas de tratamento com solução aquosa de Bergenina foram submetidos aos mesmos procedimentos dos grupos anteriores.

Fonte: O pesquisador

4.7 ANÁLISES BIOQUÍMICA

No sangue enviado ao Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFAM foram analisados os níveis de colesterol total (mg/dL), triglicerídeos (mg/dL), glicose,

(mg/dL) hemoglobina glicosilada (HbA1c/%), Aspartato Aminotransferase (TGP/UI/L) e Alanina Aminotransferase (TGO/UI/L).

Os testes bioquímicos foram realizados com o plasma no analisador automático *Chem WellWarenessTechnology*, INC. Os kits usados foram os seguintes: para triglicerídeos, AST e ALT foi utilizado o kit do laboratório LaborLab[®], para glicose o kit do laboratório Wiener[®] e para o colesterol total, o kit do laboratório Kavalet[®]. A HbA1c foi realizada com o sangue total e mensurada pela ligação da fração glicada da hemoglobina com o ácido borônico. Para a realização da leitura foi usado Nycocard Reader[®] II. Todos os testes foram calibrados pelos padrões e calibradores fornecidos por cada laboratório.

4.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

As peças cirúrgicas dos fígados foram fixados em formol tamponado a 10%, enviados ao laboratório de morfologia do ICB-UFAM, onde foram confeccionadas as lâminas, submetidas à coloração por hematoxilina-eosina (HE), seguindo a rotina adotada no laboratório de histologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFAM. A leitura das lâminas foi realizada pelo mesmo histologista.

Para identificação das lesões, foram utilizados critérios mínimos para o diagnóstico de DHGNA e teve como base a classificação de Brunt (1999) com um protocolo de avaliação histológica para determinar DGHNA e EHNA, (Apêndice A).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As estatísticas foram fundamentadas nas análises dos dados coletados e seu uso serviu para organizar, analisar, descrever e interpretar os dados da pesquisa.

O efeito da dieta foi verificado pela avaliação da massa (g) dos animais em função das pesagens (semanais) a fim de verificar a relação de peso versus as semanas, sendo realizadas por análise de regressão da ANOVA a fim de verificar o impacto da dieta em cada grupo de animais semanalmente ($p < 0,05$). Em caso de relação significativa, o grupo de animais foi ajustado aos modelos linear, ou quadrático. Tendo como base o coeficiente de determinação (R^2), que representa uma medida de qualidade do ajuste do modelo e mede a proporção do efeito da alimentação nos grupos de animais (variável dependente) na adequação do modelo adotado. Portanto, o coeficiente de determinação varia no intervalo de ($0 \leq R^2 \leq 100\%$). Quanto mais próximo de 100%, melhor será o modelo para explicar a relação das variáveis no estudo (COSTA *et al.*, 2012).

Em cada parâmetro das análises bioquímicas, foram avaliados todos os grupos de

camundongos de controles, profiláticos e de tratamentos pós-indução por estatísticas descritiva e inferencial. Na estatística descritiva foram analisadas as medidas de tendência central (média e mediana) e as medidas de dispersão ou de variabilidades dos dados (erro padrão da média, primeiro quartil e terceiro quartil, mínimo e máximo). Na inferência estatística foi utilizado intervalo de confiança da média ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t de *Student* dos parâmetros ou variáveis envolvidas no estudo, (Apêndice B).

As análises bioquímicas experimentais dos grupos profiláticos e dos grupos de tratamentos foram analisadas em conjunto com os grupos controles (negativo - GM1) e (positivo - GM2). Os dois experimentos foram analisados pelo teste F na Análise de Variância (ANOVA) e as comparações de médias pelo teste de Tukey, sendo testados ao nível de ($p < 0,05$). Em caso da ausência da distribuição de normalidade dos dados da variável dependente, foi realizada análise não paramétrica, teste *Kruskal Wallis* (substituto do teste F no campo paramétrico) e o teste de comparação foi realizada pelo teste da mediana, sendo todos os testes realizados ($p < 0,05$).

Os softwares utilizados foram: a planilha Microsoft Excel 2010 para a organização dos dados, e as análises estatísticas foram realizadas pelo MINITAB 14 e ASSISTAT versão 7.7.

4.10 ASPECTOS ÉTICOS

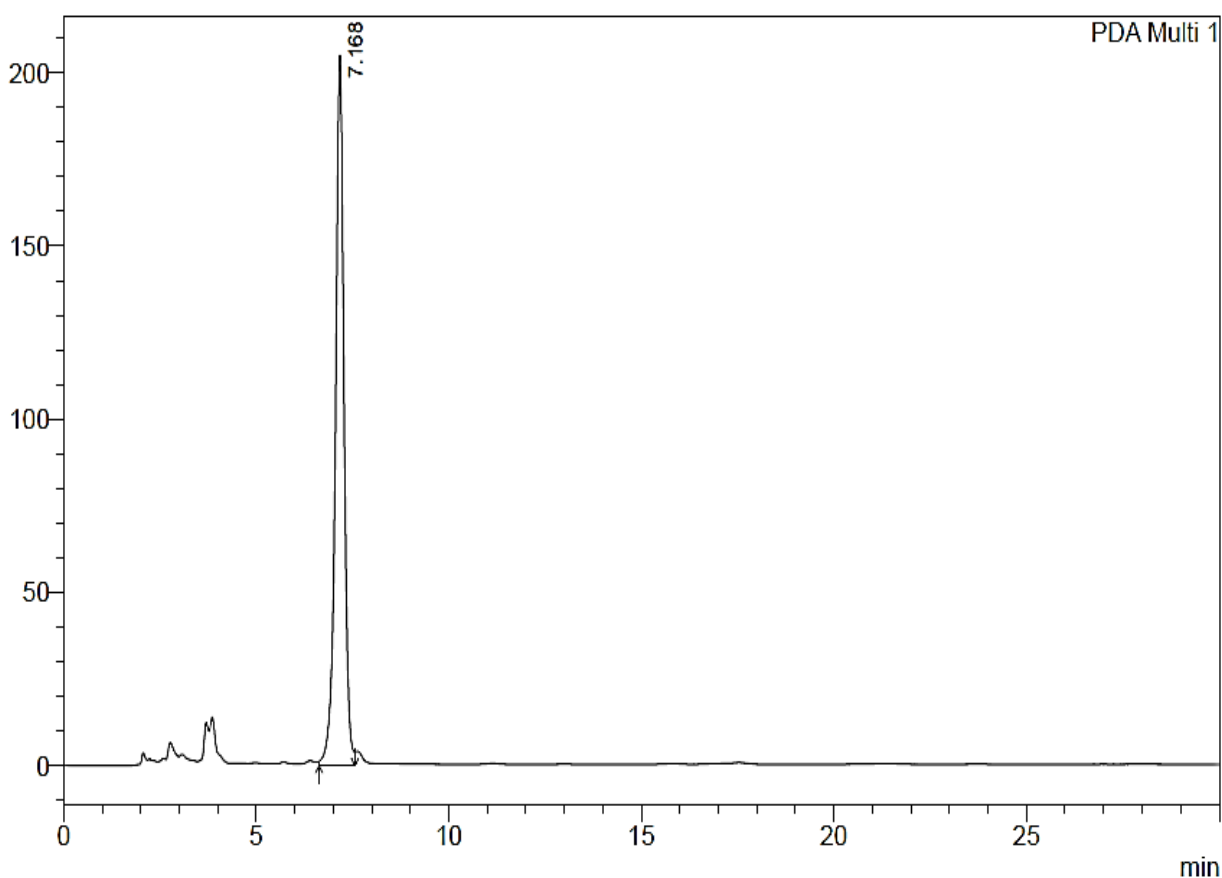
Esta pesquisa foi inicialmente avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e após a aprovação foi iniciado o estudo. A pesquisa está registrada sob o número 025/2017-CEUA/UFAM, (Anexo A).

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DO EXTRATO SECO DE *ENDOPLEURA UCHIVERSUS* CONCENTRAÇÃO DE BERGENINA NOS EXTRATOS

5.1.1 Cromatograma do extrato seco e da Bergenina

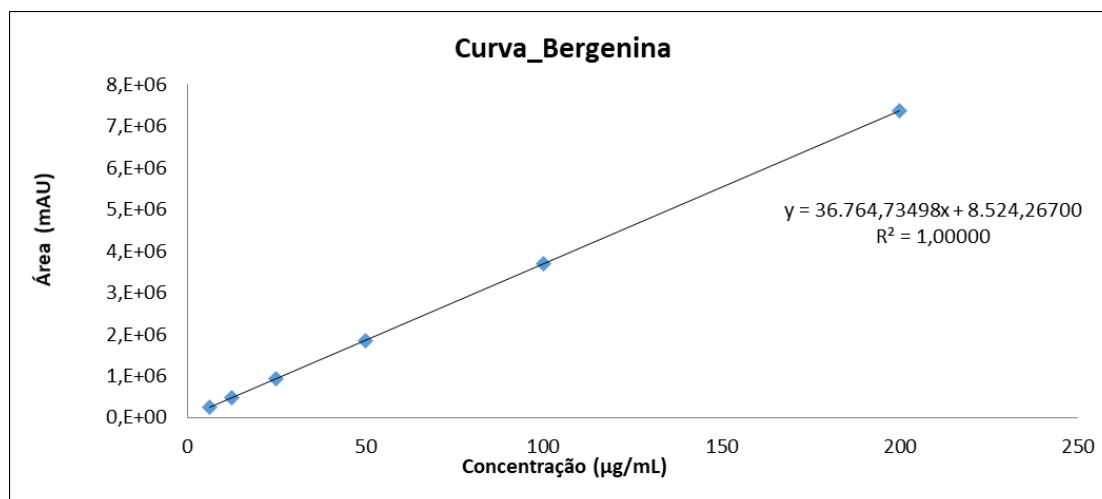
Foram realizadas as análises cromatográficas do extrato seco da *E. uchi* evidenciando a Bergenina como princípio ativo do extrato conforme verificado na figura 4.



Fonte: O pesquisador

Figura 4: Análise cromatográfica do extrato seco das cascas de *E. uchi* na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$.

A Figura 4 mostra os extratos aquosos a partir da mesma matriz vegetal. Foram preparados em dias diferentes e após desidratados em liofilizador apresentaram teor de extrativos de 6,4 % (*E. uchi*-A) e 5,9% (*E. uchi*-B). Estes foram então submetidos à análise por UFLC, com auxílio da curva de calibração obtida a partir das diferentes concentrações de Bergenina, por regressão linear, com ótimo valor de $R^2=1$.



Fonte: O pesquisador

Figura 5: Curva de calibração da Bergenina obtida após análises em triplicata intra-day e inter-day.

Os extratos apresentaram o valor de 84,18 e 87,73 µg/mL em 200 µg/mL de solução dos extratos (*E. uchi-A*) e 5,9% (*E. uchi-B*), respectivamente. Os dados observados na tabela 2 apresentam pequena variação que podem ser resultado de efeitos na pesagem do material vegetal seco. A concentração de Bergenina por extrato seco foi de 0,42 e 0,43 g/g de extrato seco para *E. uchi-A* e *E. uchi-B* respectivamente bem como a concentração em peso seco de casca variando entre 2,71 e 2,58%. Os dados estão apresentados na Tabela 2.

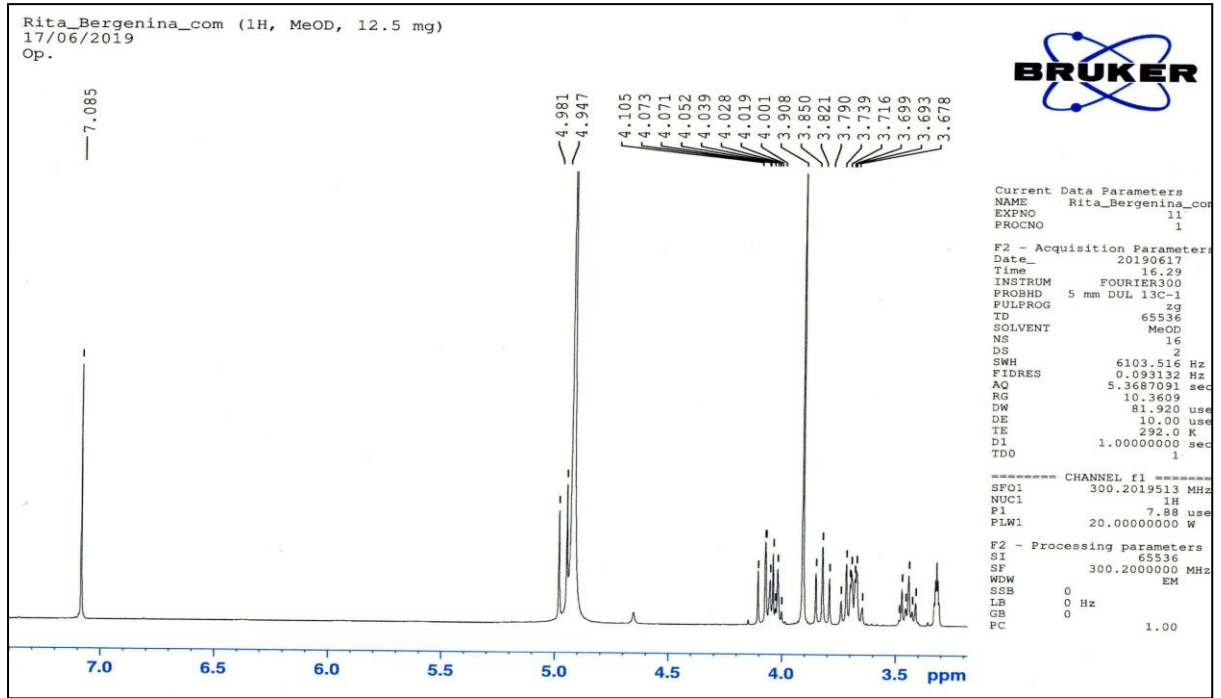
Tabela 2: Dados da concentração de Bergenina, nos extratos aquosos das cascas de *Endopleura uchi*.

EQUAÇÃO DA RETA	$y = 36.764,73498x + 8.524,26700$	
AMOSTRAS	<i>E. uchi-A</i>	<i>E. uchi-B</i>
Concentração (µg g/mL)	200	200
ABS1	3164087	3176845
ABS2	3106144	3217351
ABS3	3039862	3307351
MÉDIA TOTAL	3103364	3233849
Desvio padrão	62159	66799
CV%	2,0	2,1
Concentração da Bergenina no extrato (µg g/mL)	84,18	87,73
Teor de Extrativo (%)	6,4	5,9
Teor de Bergenina nas cascas (%)	2,71	2,58

Fonte: Laboratório de Química Analítica da UFAM.

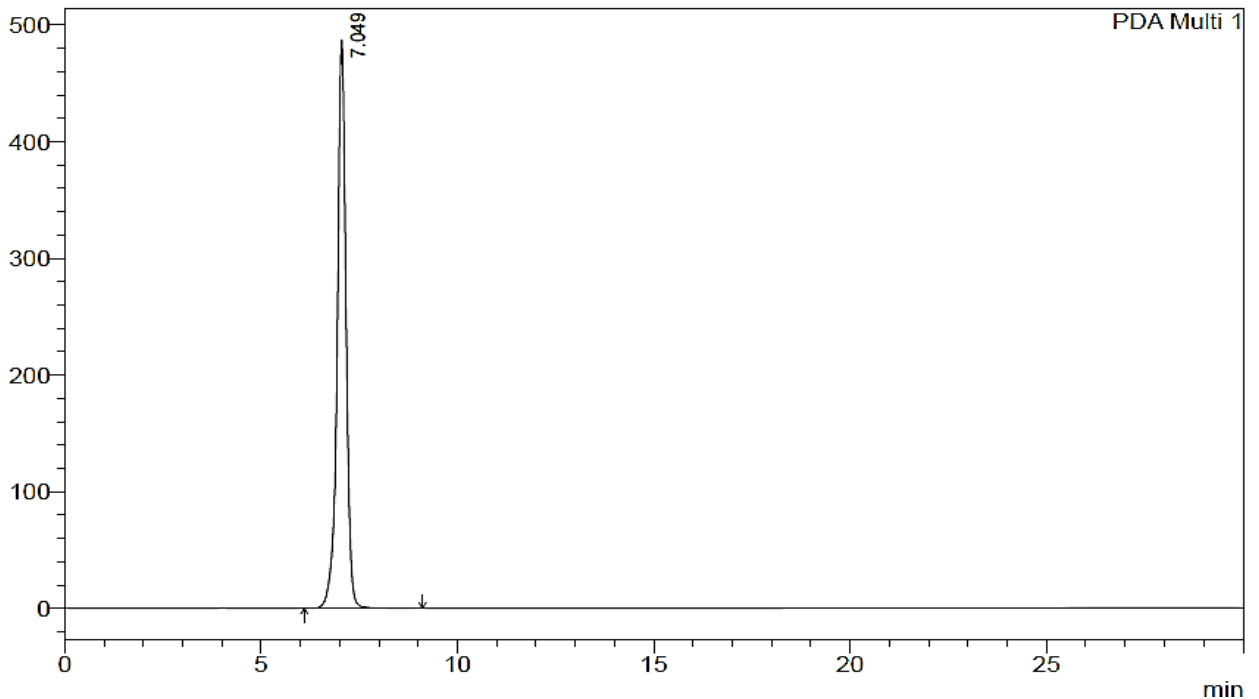
5.2 ANÁLISE DA PUREZA DA BERGENINA COMERCIAL

No Laboratório de Química Analítica da Faculdade de Química da UFAM, foram realizados exames de pureza da Bergenina, que constataram um grau de pureza de 98% no produto, conforme as figuras 6-A e 6-B.



Fonte: Laboratório de Química Analítica da UFAM.

Figura 6-A: Cromatografia dos exames de pureza da Bergenina.



Fonte: Laboratório de Química Analítica da UFAM.

Figura 6-B: Análise cromatográfica do padrão de Bergenina na concentração de 200 µg/mL.

5.3 DIETA DOS ANIMAIS (RAÇÃO HIPERLIPÍDICA-RH)

Após a preparação da ração hiperlipídica RH) no laboratório de fisiologia do ICB/UFAM, estas foram encaminhadas ao laboratório de nutrição do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA para análise de sua composição nutricional, conforme verificado na tabela 3.

Tabela 3: Análise da composição da RH no laboratório de nutrição do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA.

Composição	Ração Hiperlipídica (%)	Ração comercial (%)
Proteínas	37,98	18,60
Carboidratos	28,78	44,20
Lipídeos	26,43	5
Umidade	3,64	NI
Cinzas	0,44	5,30
Fibras	2,73	5
Valor energético total (kcal)	504,91 kcal	307

Fonte: Laboratorio de Nutrição do INPA

NI= Não informado

5.4 EFEITO DO TRATAMENTO PROFILÁTICO SOBRE A MASSA CORPORAL

O grupo de animais alimentados pela ração comercial (GM1) em função do período de avaliação de oito semanas se ajusta em um modelo quadrático ($p < 0,003$). O modelo quadrático estimado é $Y_i = 22,96 + 1,701 X_i - 0,1812 X_i^2$, que explica ($R^2 = 23\%$). Observa-se que os animais alimentados pela ração comercial apresentaram uma redução do ganho de massa corporal (g) a partir da sétima semana com peso inicial de 24,92g e peso final de 25,17g, com um ganho de 0,25g (Figura 7-A).

O grupo de animais (GM2-Grupo Sham) [Controle Positivo] alimentado com Ração Hiperlipídica (RH). O ganho de peso (g) em função da avaliação de oito semanas é linear positiva ($p < 0,0001$). O modelo é $Y_i = 22,80 + 1,483 X_i$, pela inclinação da reta, o peso aumenta 1,48g a cada semana, figura6-B. O peso inicial dos animais foi de 24,28g na primeira semana e na última semana 34,64g aproximadamente, com ganho de 10,35g. O modelo é explicado

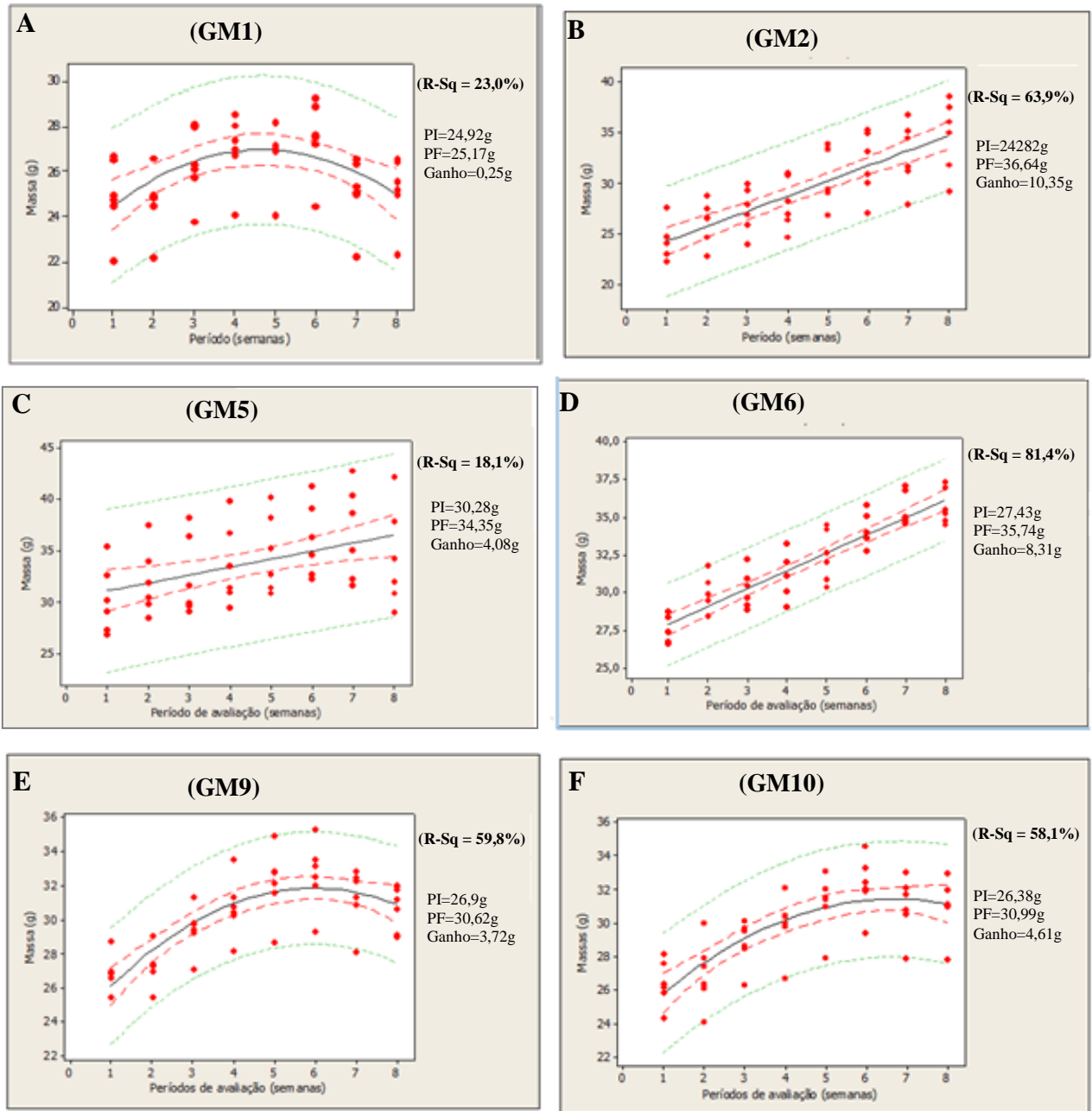
por 63,9% dos dados, pelo coeficiente de determinação (R^2). Todos os pesos dos animais encontram-se dentro de (95%) do intervalo de predição, (Figura 7-B).

Os grupos (GM5 e GM6), tratados profilaticamente (RH+tratamento concomitante) com 200 e 100mg/kg por dia respectivamente, com Extrato seco de *Endopleura uchi* por sete semanas. Tendo o grupo (GM5) uma relação linear ($p < 0,003$). O modelo linear é $Y_i = 30,38 + 0,7617 X_i$, com peso inicial 30,28g e peso final de 34,35g e ganho de 4,08g. diferentemente do controle (GM2) que apresentou maior inclinação do que o grupo (GM5) que explica fracamente a reta ($R^2 = 18,1\%$). Entretanto, com uma confiança de (95%) os pesos dos animais encontram-se dentro do Intervalo de predição, conforme apresentado na figura 7-C.

O grupo de animais (GM6), Figura 7-D apresentou uma relação linear positiva ($p < 0,0001$). A estimativa do modelo linear estimado é $Y_i = 26,71 + 1,18 X_i$. Baseando-se na reta estimada, o peso aumentou em 1,18g a cada semana, portanto, não diferindo do ajuste dos grupos (GM5) e do controle (GM2). O peso dos animais do (GM6) na primeira semana é 27,43g e 35,74g, ganho de 8,31g na última semana. O modelo é explicado por 81,4% dos dados ajustados ($R^2 = 81,4\%$). Deste modo, observa-se que na dose mais baixa da solução, não ocorre ação profilática na contenção do peso dos animais com 95% de confiança do intervalo de predição.

Nos grupos (GM9 e GM10), tratados profilaticamente (RH+tratamento concomitante) com 50 e 25mg/kg/dia de solução aquosa de Bergenina respectivamente, por sete semanas. Observa-se que no grupo (GM9), em função do período de tratamento pode-se ajustar tanto por modelo linear, como quadrático, ambos ajustados ($p < 0,0001$). Optou-se por descrever pela forma quadrática $Y_i = 23,52 + 2,81X_i - 0,24X_i^2$, pois neste modelo, observa-se melhor as mudanças dos pesos dos animais em função da RH e do tratamento em questão com um coeficiente de determinação ($R^2 = 59,8\%$). Na primeira semana os animais pesavam 26,8g e apresentaram um aumento de massa corporal até a sexta semana, para então apresentar diminuição da massa corporal e peso final de 30,62g, com ganho de apenas 3,72g, diferindo do grupo GM2 e do grupo GM, (Figura7-E).

No grupo GM 10, verifica-se o mesmo comportamento do grupo GM9 com um peso inicial de 26,38g e um peso final de 30,99g com um ganho de massa corporal, igual a 4,61g. Portanto com diferença significativa do grupo GM2, controle positivo. Figura 7-F.



Fonte: O pesquisador

Figuras 7 A-(Grupo GM1), alimentados com dieta padrão para camundongos; B-(Grupo GM2/Controle positivo-Sham): alimentados com RH; **(Grupo Profilático):** C-(Grupo GM5), alimentado por sete semanas e tratado concomitantemente com 200mg/kg/dia com extrato seco de *E. uchi*; D-(Grupo GM6), alimentado por sete semanas e tratados concomitantemente com 100mg/kg/dia com extrato seco de *E. uchi*; E-(Grupo GM9), alimentado por sete semanas e tratados concomitantemente com 50mg/kg/dia com Bergenina; F-(Grupo GM10), alimentado por sete semanas e tratados concomitantemente com 25mg/kg/dia com Bergenina.

5.5 EFEITO DO TRATAMENTO PÓS-INDUÇÃO SOBRE A MASSA CORPORAL

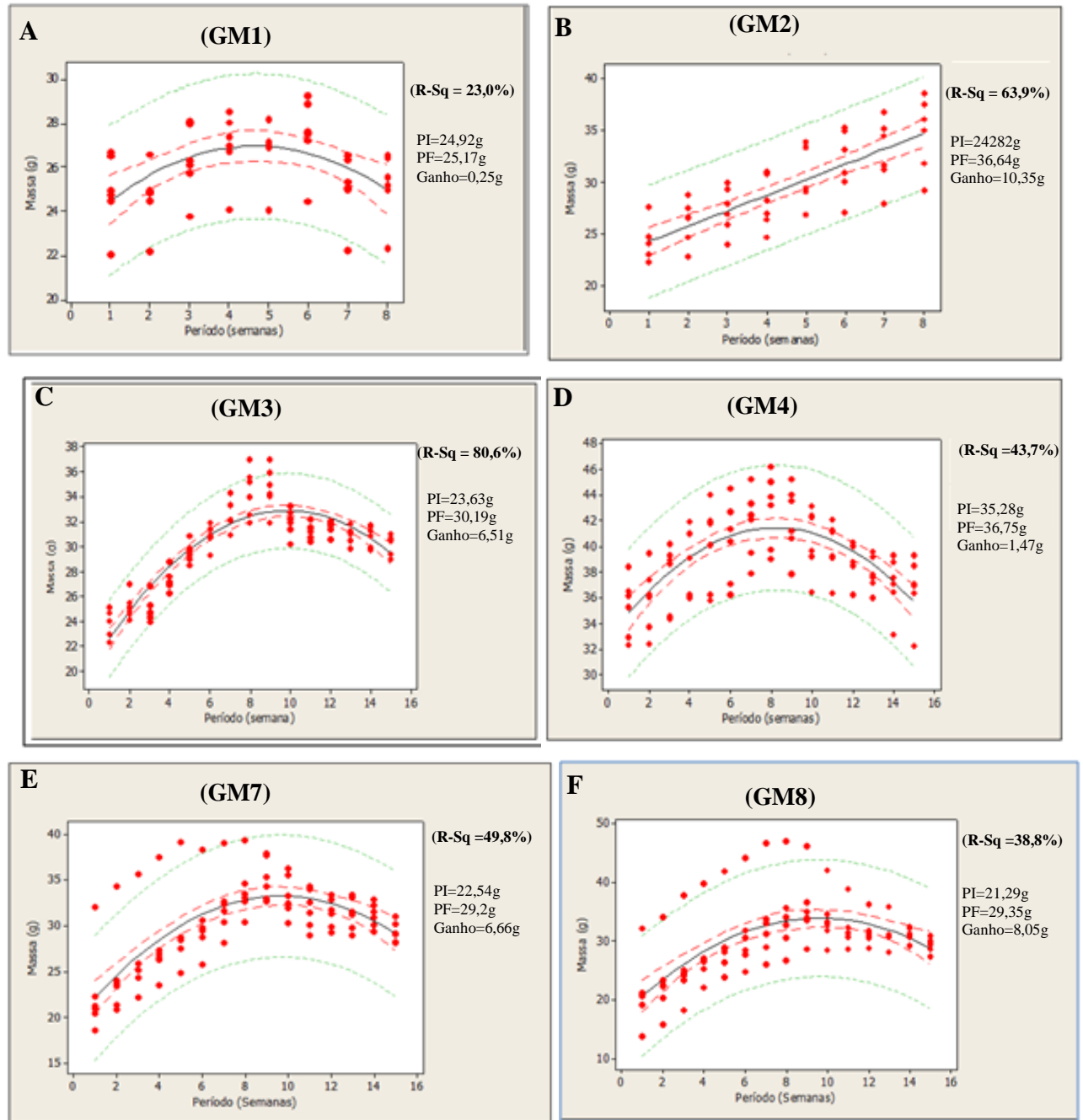
Nos grupos (GM3 e GM4), que tiveram um período de oito semanas de indução da esteatose e mais sete semanas de tratamento propriamente dito com 200 e 100mg/kg/dia, de extrato seco de *E. uchi*, respectivamente, verificou-se que, o grupo (GM3) permitiu um ajuste

tanto pelo modelo linear como quadrático, ambos ($p < 0,0001$). Com um coeficiente de determinação ($R^2 = 80,6\%$) optou-se pelo ajuste quadrático $Y_i = 20,20 + 2,576X_i - 0,131X_i^2$, permitindo ressaltar melhor as mudanças dos pesos dos animais. Os animais apresentaram um aumento de peso linear até a nona semana, seguido da perda altamente significativa de massa (g) a partir da décima semana, com um peso inicial de 23,63g, peso final de 30,19g e um ganho de 6,51g, constatado, na figura 8.

O grupo (GM4) tratado da mesma forma que o grupo (GM3), com dose 50% menor (100mg/kg/dia) de extrato seco de *Endopleura uchi*, foram ajustados pelo modelo quadrático ($p < 0,0001$), o que permitiu ressaltar melhor as mudanças dos pesos dos animais ao longo das avaliações, pelo ajuste $Y_i = 32,87 + 2,082 X_i - 0,1263X_i^2$, com um coeficiente de determinação ($R^2 = 43,7\%$). Verifica-se na figura 7-B, dentro do intervalo de predição (95%), que houve um aumento de pesos até a oitava semana e a partir da nona semana houve perda significativa de massa corporal (g) no grupo. Peso inicial do grupo GM4 foi de 35,28g e peso final de 36,75g, com ganho de 1,47g.

Nos grupos (GM7 e GM8), que tiveram um período de oito semanas de indução da esteatose e mais sete semanas de tratamento pós-indução, com 50 e 25mg/kg/dia, de solução aquosa de Bergenina, respectivamente. Verificou-se que, o grupo (GM7) permitiu um ajuste tanto pelo modelo linear como quadrático, ambos ($p < 0,0001$). No entanto, optou-se pelo ajuste quadrático $Y_i = 19,45 - 2,2847X_i - 0,1469 X_i^2$, com um coeficiente de determinação ($R^2 = 80,6\%$), que por ressaltar melhor as mudanças dos pesos dos animais. Os animais apresentaram um aumento de peso linear até a nona semana com peso inicial de 22,54g seguido da perda altamente significativa de massa corporal (g) a partir da décima semana e peso final de 29,2g e ganho final de 6,66g, como pode ser constatado na figura 8-C.

O grupo (GM8) tratado da mesma forma que o grupo (GM7), com dose 50% menor (25mg/kg/dia) de extrato de solução aquosa de Bergenina, foram ajustados pelo modelo quadrático ($p < 0,0001$), por permitir ressaltar melhor as mudanças dos pesos dos animais ao longo das avaliações, pelo ajuste $Y_i = 17,32 + 3,449 X_i - 0,1791 X_i^2$, com um coeficiente de determinação ($R^2 = 43,7\%$). Verifica-se na figura 8-D, dentro do intervalo de predição (95%), com peso inicial de 21,29g, aumento de pesos até a oitava semana e a partir da nona semana houve perda significativa de massa corporal (g) ficando com um peso final de 29,35g e ganho total de 8,05g.



Fonte: O pesquisador

Figura 8: A-Grupo (GM1-Controle Negativo). B-Grupo (GM2-Controle Positivo). Grupos de Tratamento Pós-indução. C-(Grupo GM3), alimentado com RH por oito semanas e tratados por mais sete semanas com 200mg/kg/dia com extrato seco de *E. uchi*; D-(Grupo GM4), alimentado com RH por oito semanas e tratados por mais sete semanas com 100mg/kg/dia com extrato seco de *E. uchi*; E-(Grupo GM7), alimentado com RH por oito semanas e tratados por mais sete semanas com 50mg/kg/dia com Bergenina; F-(Grupo GM8) alimentado com RH por oito semanas e tratados por mais sete semanas com 25mg/kg/dia com Bergenina.

5.6 EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

A tabela 4 indica as análises bioquímicas dos grupos controles Negativo (GM1) e Positivo (GM2) *versus* grupos tratados profilaticamente (Grupos GM5, GM6, GM9 e GM10), com duas doses diferentes de ambas as soluções, *Endopleura uchi* ou solução aquosa de Bergenina, verificou-se que:

- GLICOSE: o grupo controle negativo (GM1) diferiu estatisticamente dos demais grupos (GM2; GM5; GM6; GM9 e GM10), $p < 0,05$.
- O grupo controle positivo (GM2) difere estatisticamente dos grupos (GM1 e GM6), $p < 0,005$ e não difere dos grupos dos grupos (GM5, GM9 e GM10), $p > 0,05$.
- HbA1c: a hemoglobina glicosilada do grupo controle negativo (GM1), difere estatisticamente dos grupos (GM5 e GM6), $p < 0,05$. No entanto o (GM1) não difere estatisticamente dos grupos (GM2, GM9 e GM10), $p > 0,05$.
- O grupo GM2, difere estatisticamente do GM5 ($p < 0,05$) e não difere dos demais grupos (GM1, GM6, GM9 e GM10), ($p > 0,05$).
- COLESTEROL: o grupo (GM2) difere estatisticamente dos demais grupos (GM1, GM5, GM6, GM9 e GM10).
- TRIGLICERÍDEOS: o grupo (GM1) não difere estatisticamente dos grupos (GM2, GM5, GM6, GM9 e GM10), $p > 0,05$. No entanto o grupo (GM2) diferiu estatisticamente dos grupos (GM9 e GM10), $p < 0,05$.
- TGP: Os grupos não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$).
- TGO: (GM1) não diferiu estatisticamente dos demais grupos ($p > 0,05$). No entanto (GM2) difere estatisticamente do grupo (GM9).

Tabela 4: Análise dos resultados bioquímicos (EPM) dos animais tratados profilaticamente *versus* grupos controles, onde: ST (Sem Tratamento); EU (Solução reidratada do extrato seco de *Endopleura uchi*); GM1 (Controle Negativo alimentado com dieta comercial padrão); GM2, Controle Positivo, alimentado com Ração Hiperlipídica Sem Tratamento (RH, ST).

Parâmetros	Glicose ² Mg/dL	HbA1c ¹ (%)	Colesterol ¹ Mg/dL	Triglicerídeos ² Mg/dL	TGP ¹ UI/L	TGO ¹ UI/L
GM1 (ST)	118,1 ^c (1,16)	4,5 ^c (0,06)	61,2 ^b (3,89)	50,0 ^{ab} (4,73)	38,8 ^a (7,08)	27,2 ^{ab} (3,37)
GM2 (ST)	222,4 ^b (17,51)	4,8 ^{bc} (0,27)	145,6 ^a (10,63)	39,7 ^b (3,57)	47,0 ^a (7,02)	11,6 ^b (2,42)
GM5 (200mg/kg <i>E. uchi</i>)	280,6 ^{ab} (13,09)	5,8 ^a (0,15)	140,7 ^a (11,90)	46,5 ^{ab} (4,89)	39,0 ^a (7,27)	12,2 ^b (2,87)
GM6 (100mg/kg <i>E uchi</i>)	286,0 ^a (19,94)	5,2 ^{ab} (0,10)	151,2 ^a (4,64)	49,0 ^{ab} (1,05)	44,0 ^a (12,26)	22,2 ^{ab} (4,13)
GM9 (50mg/kg/Ber.)	274,9 ^{ab} (13,91)	4,6 ^c (0,12)	117,3 ^a (7,73)	83,4 ^a (7,44)	32,4 ^a (11,76)	29,8 ^a (5,44)
GM10 (25mg/kg- Berg.)	247,3 ^{ab} (9,38)	5,0 ^{bc} (0,06)	121,0 ^a (4,22)	85,3 ^a (18,70)	32,5 ^a (7,43)	20,2 ^{ab} (4,98)

Fonte: O pesquisador

(1) Médias seguidas de mesma letra (na vertical), não diferem entre si, pelo teste Tukey, ($p > 0,05$).

(2) Média seguidas de mesma letra (na vertical), não diferem entre si, pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis ($p > 0,05$).

(3) (EPM) Erro padrão da média

Na Tabela 5 estão relatadas as análises comparativas entre os grupos controles negativos (GM1) e controle positivo (GM2) *versus* grupos de tratamento pós-indução (GM3, GM4, GM7 e GM8), com as soluções de extrato seco reidratado de *Endopleura uchi* ou com solução aquosa de Bergenina, em duas doses diferentes, conforme o grupo específico, por 7 semanas após o período de indução da esteatose, verificou-se que:

- : O grupo (GM1) difere estatisticamente dos demais grupos (GM2; GLICOSE GM3; GM4; GM7 e GM8), $p < 0,05$.
- O GRUPO (GM2): Não difere estatisticamente dos demais grupos (GM3; GM4; GM7 e GM8), $p > 0,05$. Observa-se que o Grupo (GM7) difere dos grupos (GM3 e GM4).
- HbA1c: Não houve diferença estatística entre si nos grupos ($p > 0,05$).

- **COLESTEROL:** O grupo (GM1) difere estatisticamente entre os grupos (GM2 e GM4), $p < 0,05$. O grupo (GM2) difere estatisticamente dos grupos (GM1; GM3; GM7 e GM8), $p < 0,05$. Por outro lado o grupo (GM2) não difere dos grupos (GM4), $p > 0,05$. “Observa-se-se que (GM7, GM8 e GM3) foram efetivos”.
- **TRIGLICERÍDEOS:** Os grupos não diferiram entre si ($p > 0,05$).
- **TGP:** O grupo (GM1) não diferiram estatisticamente dos demais ($p > 0,05$). O (GM2) difere estatisticamente dos grupos (GM3), $p > 0,05$.
- **TGO:** Não houve diferença estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Tabela 5: Análise bioquímica, (EPM) dos animais submetidos a tratamento pós-indução *versus* grupos controles onde: ST (Sem Tratamento); EU (Solução reidratada do extrato seco de *Endopleura uchi*); GM1 (Controle Negativo alimentado com dieta comercial padrão); GM2, Controle Positivo, alimentado com Ração Hiperlipídica Sem Tratamento (RH, ST).

Parâmetros	Glicose Mg/dL	HbA1c (%)	Colesterol Mg/dL	Triglicerídeos Mg/dL	TGP UI/L	TGO UI/L
GM1 (ST)	118,1 ^c (1,16)	4,5 ^a (0,06)	61,2 ^b (3,89)	50,0 ^a (3,89)	38,8 ^{ab} (7,08)	27,2 ^a (3,33)
GM2 (ST)	222,4 ^{ab} (17,51)	4,8 ^a (0,27)	145,6 ^a (10,63)	39,7 ^a (10,63)	47,0 ^a (7,02)	11,5 ^a (2,43)
GM3 (200mg/kg EU)	243,6 ^a (14,33)	4,7 ^a (0,06)	69,9 ^b (8,38)	59,3 ^a (8,38)	12,3 ^b (6,43)	19,5 ^a (3,92)
GM4 (100mg/kg EU)	245,8 ^a (13,96)	4,8 ^a (0,12)	124,8 ^a (6,52)	59,8 ^a (6,52)	43,9 ^a (4,14)	9,7 ^a (0,56)
GM7 (50mg/kg/B)	181,2 ^b (12,87)	4,9 ^a (0,06)	93,0 ^b (5,97)	57,5 ^a (5,97)	22,5 ^{ab} (5,69)	22,0 ^a (7,74)
GM8 (25mg/kg-B)	211,8 ^{ab} (10,92)	4,9 ^a (0,03)	88,7 ^b (4,61)	57,2 ^a (4,61)	30,0 ^{ab} (5,42)	25,9 ^a (7,01)

Fonte: O pesquisador

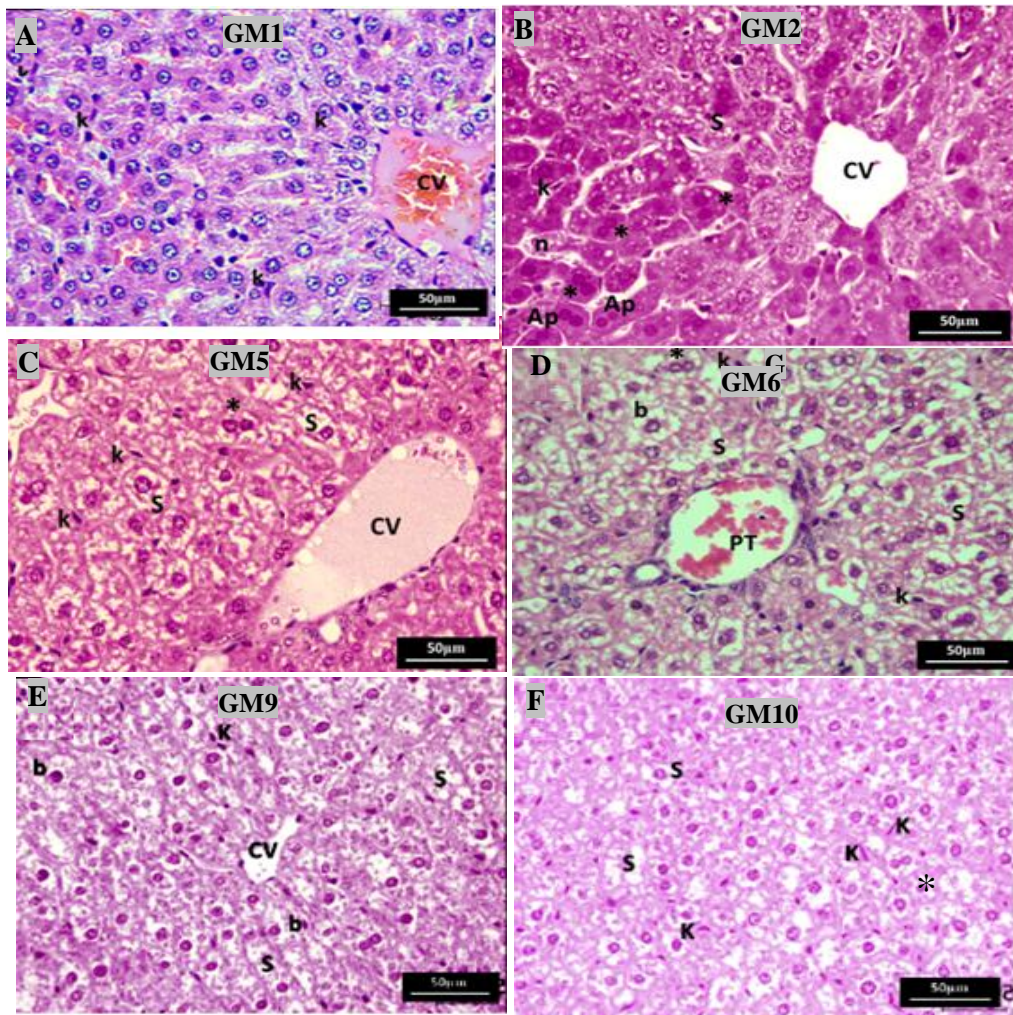
(1) Médias seguidas de mesma letra (na vertical) não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

(2) EPM) Erro padrão da média

5.7 ANÁLISE ANATOMO-PATOLÓGICA DOS FÍGADOS DOS CAMUNDONGOS

5.7.1 Tratamento profilático

Nas Figuras 9 verifica-se: **A**, os aspectos histológicos de um fígado normal; **B**, fígado com DHGNA induzida com RH; **C** e **D**, alterações histológicas nos grupos tratados profilaticamente com extrato seco de *Endopleura uchi* nas doses de 200 e 100 mg/kg/dia. Nas figuras **E** e **F**, as alterações observadas nos grupos tratados profilaticamente com solução aquosa de Bergenina nas doses de 50 e 25mg/Kg/dia respectivamente.



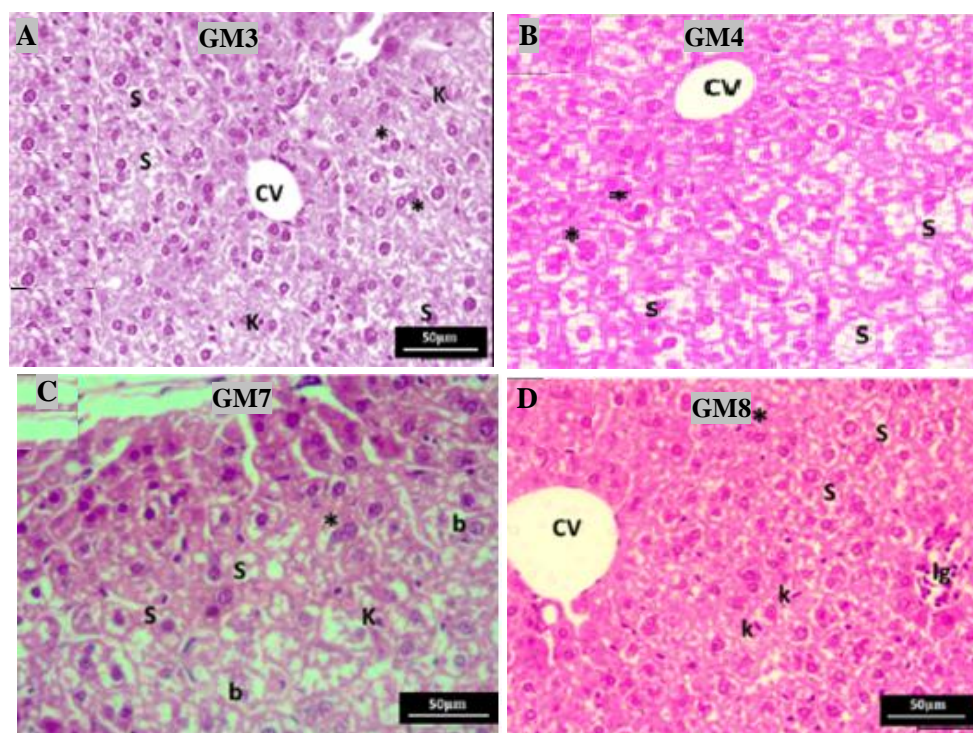
Fonte: O pesquisador/ Departamento de Morfologia-UFAM.

Figura 9: **A**-controle negativo (GM1), verificou-se veia centro lobular (cv), esteatose < 5% em 50 % dos animais e esteatose grau 2 em 16,7% dos animais. Células de Kupffer (k). **B**-Grupo (GM2), Grupo Sham, Presença de veia centrolobular (CV), **esteatose grau 2 >** em mais de **66%** dos animais (S), células de Kupffer (K), hepatócitos binucleados (*), área de necrose (n), apoptose (ap). Balonização (b). **Grupos de tratamento Profiláticos:** **C**-grupo (GM5), verifica-se **esteatose grau 2 em 33 %** dos animais (s), presença de veia centrolobular com gotículas de gordura (CV), células de Kupffer (K), hepatócitos binucleados (*). **D**- Grupo (GM6), verifica-se **esteatose grau 2 em 83,3 %** dos animais (s), presença de células de Kupffer (k), Triáde Portal (pt), balonização (b). **E**-Grupo (GM9), verifica-se, presença de células de Kupffer (k), Veia centrolobular (cv), esteatose grau 2 em 66,6 % dos animais (s) e balonização (b). **F**- Grupo (GM10), verifica-se, presença de esteatose grau 2 em 100% dos animais (s), células de Kupffer (K), hepatócitos binucleados (*).

5.7.2 Tratamentos curativos

Nas Figuras 10 (A e B), alterações histológicas nos grupos de animais tratados com intenção curativa com extrato seco de *Endopleura uchi* nas doses de 200 e 100 mg/kg/dia por 45 dias respectivamente, após indução de DHGNA.

Nas figuras (C e D), alterações histológicas nos grupos de animais tratados com intenção curativa com Bergenina nas doses de 50 e 25 mg/kg/dia por 45 dias respectivamente, após indução de DHGNA.



Fonte: O pesquisador/ Departamento de Morfologia-UFAM

Figuras 10 (Grupos de tratamentos pós-indução), nos grupos **GM3** e **GM4** que foram alimentados com RH por oito semanas e tratado por sete semanas com 200mg e 100mg/kg/dia de extrato seco de *Endopleura uchi* respectivamente. **A**-(Grupo **GM3**), verifica-se **esteatose Grau 2 em 33,3%** dos animais (s), presença de veia centrolobular (cv), hepatócitos binucleados (*) e células de Kupffer(K). **B**-(Grupo **GM4**), verifica-se veia centro lobular (vc), esteatose grau 2 em 40 % dos animais(s), hepatócitos binucleados (*). Grupos (**7** e **8**) alimentados com RH 60 dias e tratado por 45 dias com 50mg e 25mg/kg/dia de Bergenina respectivamente. **C**-(Grupo **GM7**), verifica-se presença de células de Kupffer (k), Esteatose grau 2 em 20% dos animais (s), balonização (b). **D**-(Grupo **GM8**), verifica-se, presença de veia centrolobular (cv), esteatose grau 2 em 100% dos animais (s), células de Kupffer (K), hepatócitos binucleados (*).

5.7.3 Grau de esteatose

Será apresentado um estudo descritivo dos dados com relação ao grau de esteatose nos grupos, visto que o número de animais por grupo é pequeno (seis) comprometendo os testes estatísticos.

Utilizando-se de um método semi-quantitativo para graduar a esteatose, atividade inflamatória e estadiar a fibrose na DHGNA proposto por Brunt *et al.* (1999), verificou-se que

neste experimento, todos os animais desenvolveram esteatose com a ração hiperlipídica experimental proposta, exceto os animais do grupo 1 (Controle), que foram alimentados com ração comercial para camundongos. Neste grupo, 50% não desenvolveram esteatose; 33,3% desenvolveram esteatose grau 1 e apenas 16,7% desenvolveram esteatose grau 2, isto por características próprias destes animais. Constatou-se também que o grau máximo de esteatose foi grau 2/3 sem nenhuma fibrose entre os animais.

No grupo Sham, controle positivo (GM2) alimentados com RH, 100% dos animais desenvolveram esteatose, sendo 33,3% de esteatose grau 1 e 66,7% esteatose grau 2, conforme a tabela 6.

Tabela 6: Distribuição do percentual dos animais alimentados com dieta padrão (GM1) e animais com RH (GM2) *versus* grau de esteatose.

Grupos	Grau de Esteatose (%)		
	0	1	2
GM1	50,0	33,3	16,7
GM2	0,0	33,3	66,7

Fonte: O pesquisador

Analisando os tratamentos profiláticos com extrato seco de *Endopleurauchi*, nos grupos (GM5) 200mg/kg/dia e grupo (GM6) 100mg/kg/dia, e com solução aquosa de Bergenina nos grupos (GM9) 50mg/kg/dia e (GM10) 25mg/kg/dia, conjuntamente com a indução da esteatose com Ração Hiperlipídica (RH) por 7 semanas, verificou-se que:

O grupo (GM5), apresentaram uma regressão de 50% de esteatose grau 2 em comparação ao grupo (GM2-Sham), referência de esteatose neste estudo. A maioria dos animais desenvolveram esteatose grau 1. O mesmo não foi verificado no grupo GM6, que mesmo recebendo tratamento em dose 50% menor, evoluíram com esteatose grau 2 na maioria dos animais.

Da mesma forma, no grupo (GM9) verificou-se uma regressão da esteatose, chegando a evitar o desenvolvimento da esteatose em 16,7 % dos animais deste grupo, que receberam 50mg/kg/dia, de Bergenina de forma profilática (Tabela 7). A mesma resposta não foi verificada no grupo GM10, com dose 50% menor de solução de Bergenina.

Tabela 7: Distribuição do percentual de esteatose no grupo GM2 e nos animais com tratamento profilático (GM5, GM6, GM9 e GM10) *versus* graus de esteatose.

Grupos	Grau de Esteatose (%)		
	0	1	2
Grupo GM2	0,0	33,3	66,7
Grupo GM5	0,0	66,7	33,3
Grupo GM6	0,0	16,7	83,3
Grupo GM9	16,7	19,7	66,6
Grupo GM10	0,0	0,0	100,0

Fonte: O pesquisador

Analisando os tratamentos pós-indução com extrato seco de *Endopleurauchi*, nos grupos (GM3) 200mg/kg/dia e grupo (GM4) 100mg/kg/dia, e da solução aquosa de Bergenina nos grupos (GM7) 50mg/kg/dia e (GM8) 25mg/kg/dia, com duração de sete semanas após as oito semanas de indução da DHGNA com RH. Constatou-se que 100% dos animais do grupo 2 desenvolveram esteatose e destes, 66,7% desenvolveram esteatose Grau 2 (moderada), enquanto que no grupo três, tratados com 200mg/kg/dia por sete semanas com extrato seco de *Endopleurauchi*, apenas 83,3 % desenvolveram esteatose e destes apenas 33,3 % apresentavam-se com grau 2 de esteatose, portanto 50% a menos que o grupo 2, além de uma nítida regressão do grau de esteatose em direção a resolução do quadro, quando 50 % deste grupo apresentou esteatose grau 1 e 16,7 % já sem esteatose. O mesmo não foi verificado com o grupo quatro, tratados apenas com 100 mg/kg/dia com mesma solução.

Sendo o grupo 2 o referencial desta indução de DHGNA nesta pesquisa, verificou-se que após o tratamento do grupo (GM7) com 50mg/kg/dia de solução aquosa de Bergenina o percentual de animais que desenvolveu esteatose grau 2 neste grupo, baixou para 20% e que a sua grande maioria encontra-se com grau 1 da esteatose demonstrando regressão dos graus de esteatose em comparação ao grupo de referência. O mesmo não foi verificado no grupo oito (Tabela 8), tratado com 25mg/kg/dia de Bergenina.

Tabela 8: Distribuição do percentual de esteatose no grupo GM2 e nos animais tratamento pós-indução (GM3, GM4, GM7, GM8) *versus* grau de esteatose.

Grupos	<u>Grau de Esteatose (%)</u>		
	0	1	2
Grupo GM2	0,0	33,3	66,7
Grupo GM3	16,7	50,0	33,3
Grupo GM4	0,0	60,0	40,0
Grupo GM7	0,0	80,0	20,0
Grupo GM8	0,0	0,0	100,0

Fonte: O pesquisador

6 DISCUSSÃO

A Esteatose hepática, para ser definida como DHGNA necessita de comprovação, seja por imagem ultrassonográfica e/ou histopatológica, em indivíduos que não consomem álcool ou o fazem de forma social (<20g/dia), sem desordens hereditárias que possam cursar com esteatose (ex. Doença de Wilson, hepatite C, Abeta lipoproteinemia, lipodistrofia, etc.) e não estejam fazendo uso de nenhuma medicação esteatogênica (ex: Amiodarona, metotrexato, corticosteroides), nutrição Parenteral (CHALASANI *et al.*, 2012).

Alguns fatores de risco, estão associados a DHGNA e entre eles, o Diabetes *Mellitus* (DM), Obesidade, Dislipidemias que associados à Hipertensão Arterial (HA) e Resistência Insulínica (RI) compõe a chamada Síndrome Metabólica (SM). Esta situação num contexto mundial, encontra-se como a principal causa de doença hepática crônica (SOUZA *et al.*, 2012), podendo evoluir para EHNA e finalmente para cirrose com risco de desenvolver carcinoma hepatocelular (CHC) (ASCHA *et al.*, 2010).

Nesta pesquisa foi desenvolvido um modelo com animal de experimentação, (camundongo C57BL/6J), que procurou mimetizar ao máximo, a situação encontrada em seres humanos, tais como obesidade e DHGNA, com suas alterações metabólicas e histológicas. Foram também realizados dois tratamentos tanto para obesidade como para DHGNA, através de um fitoterápico (*Endopleura uchi*) e de seu princípio ativo (Bergenia), a fim de analisar a proteção destas substâncias contra a obesidade e a DHGNA.

Com a Ração Hiperlipídica (RH), preparada no Laboratório de Fisiologia do ICB/UFAM, o propósito do desenvolvimento da obesidade, assim como das alterações metabólicas e histológicas da esteatose hepática foram alcançados conforme veremos a seguir.

Analisando os resultados observados quanto ao ganho de massa corporal dos animais do grupo controle negativo (GM1), alimentados com ração comercial para camundongos *versus* grupo controle positivo Sham (GM2) alimentados com RH, verificou-se que o grupo controle negativo (GM1) encontrava-se com 24,92g no início do experimento e 25,17g no final das oito semanas. O grupo Sham controle positivo (GM2) teve aumento da massa corporal de forma linear e exponencial, e, portanto significativa com $p < 0,0001$, com o peso inicial médio de 24,28g e com peso ao final da indução de 34,64g (Fig.7A e B). Dados estes que confirmaram a eficiência da ração experimental. Resultados semelhante foram verificados por Buettner *et al.* (2006), quando definia o melhor tipo de dieta rica em gordura para provocar obesidade e alterações metabólicas que pudessem mimetizar as alterações verificadas em seres humanos vítimas da obesidade. Tschop; Helman (2001), em revisão da

literatura sobre modelos de obesidade em roedores, também concluíram que as dietas ricas em gordura animal são as mais efetivas para desenvolverem obesidade com suas alterações metabólicas, similares à aquelas encontradas nos seres humanos.

Analisando-se os efeitos dos tratamentos profiláticos, foi verificado que os animais do grupo (GM5) que receberam 200mg/kg/dia de extrato seco de *E. uchi* aumentaram o peso corporal em 0,762g/semana, (Fig. 7C), com um peso inicial de 30,28g e peso de 34,35g ao final de 7 semanas de indução e tratamento, diferentemente do grupo (GM2) controle positivo que tiveram um aumento 1,48g/semana, (Fig. 7B), um peso inicial de 24,28g e um peso final de 34,64, demonstrando que o extrato diminuiu o ganho de massa corporal dos animais grupo (GM5) em torno de 50%. Fato mais significativo, foi verificado no grupo de animais tratados profilaticamente com 50mg/kg/dia de solução aquosa de Bergenina, evitando um ganho significativo de massa pela ação profilática da solução. (Fig. 7E). Nos grupos (GM6) tratados com 100mg/kg/dia de extrato seco de *E. uchi* e o grupo (GM10) tratados com 25mg/kg/dia de solução aquosa de Bergenina, não foi verificado efeito profilático significativo em relação ao grupo controle, denotando um efeito dose dependente desta substancias.

Os efeitos dos tratamentos pós-indução, com extrato seco de *E. uchi*, nos grupos (GM3 e GM4) e com solução aquosa de Bergenina nos grupos (GM7 e GM8), foi verificado efeito favorável de ambas as substâncias com resultados mais significativos, nas maiores doses de ambas, no que diz respeito a redução da massa corporal, quando comparados ao grupo (GM2), controle positivo.

Não encontramos na literatura, pesquisa, utilizando, Extrato seco de *E. uchi* e /ou Bergenina, no apoio ao tratamento da obesidade em animais de experimentação para compararmos com os resultados desta pesquisa, porém trabalho semelhante realizado por Cao *et al.* (2011), utilizando um chá tradicional da China (pu-erh) em 3 doses diferentes, alcançou resultados favoráveis no controle de massa corporal de ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Kuo *et al.* (2005) analisaram 4 dos principais chás comerciais na China (“oolong”, “preto”, “pu-erh” e “verde”) e verificaram que o chá “pu-erh” e “preto fermentados” foram eficazes em suprimir a obesidade dos animais.

O impacto dos tratamentos sobre as variáveis bioquímicas propostos neste experimento demonstraram que os animais dos grupos controles (GM1 e GM2) desenvolveram valores de glicemia com diferenças significativas, confirmando que o grupo controle negativo, não desenvolveu diabetes, ao contrário do grupo (GM2). Tendo estes parâmetros iniciais com padrão para os demais grupos, pode-se verificar que o tratamento

profilático de ambas as substâncias nas respectivas doses, não demonstraram resultados favoráveis para controlar a hiperglicemia na vigência do tratamento junto com a RH.

Utilizando-se da hemoglobina glicada (HbA1c) para verificação do nível plasmático médio da glicemia nas 6 a 12 semanas precedentes, (WILLIAMSON *et al.*, 2011), verificou-se que apesar da hiperglicemia encontrada no dia da coleta, os níveis de HbA1c permaneceram dentro de parâmetros de normalidade

Analisando o impacto do tratamento pós-indução de 8 semanas com RH, verificou-se redução dos níveis de glicemia, apenas no grupo (GM7) tratado com 50mg/kg/dia de Bergenina. Porém, nestes grupos de tratamento, todos os animais mantiveram valores da HbA1c dentro da normalidade.

Resultados mais significativos são encontrados na literatura. Silva & Teixeira (2015) analisando as propriedades biológicas da *E. uchi*, constataram efeito inibitório de seu princípio ativo (Bergenina) e derivados sobre a alpha-glucosidase. Kumaret *al* (2012) estudando uma leguminosa (*Caesalpinia digyna*) que tem como princípio ativo a Bergenina, constataram redução nos níveis de glicose sanguínea, em todos os animais, inclusive de animais previamente diabéticos, assim como efeito regenerativo das células beta do pâncreas.

Burcelin *et al.* (2002), investigando efeitos de dieta rica em lipídeos, em camundongos C57BL/6J, constataram um processo de adaptação metabólica em que 50% dos animais ficaram obesos e diabético, 10% magros diabéticos, 10% magros e não diabéticos, e 30% apresentaram um fenótipo intermediário, diferente deste experimento, onde 100% dos animais, desenvolveram diabetes não insulino dependente. Os resultados podem ser justificados em um provável fundo genético que os tornam mais suscetíveis a fatores ambientais não identificados combinados que os induz à uma obesidade e Diabetes de gravidade variável.

Além das alterações na homeostase da glicose nos grupos de animais alimentados com RH desta pesquisa, verificaram-se, alterações nos níveis de colesterol e triglicerídeos. Houve diferença significativa no nível de colesterol nos animais alimentados com RH (GM2) e os alimentados com ração comercial padrão (GM1). O mesmo comportamento não foi verificado nos níveis de triglicerídeos.

Verificando-se o impacto dos tratamentos pós-indução de ambas as substâncias (*E. uchi* e Bergenina) nas suas respectivas doses, constatou-se que os animais dos grupos (GM3, GM7 e GM8) apresentaram redução significativa dos níveis de colesterol, quando

comparados ao Grupo controle positivo. Os níveis de triglicerídeos não sofreram variações significativo, mesmo no grupo controle positivo.

Kumar *et al.* (2012), constataram em sua pesquisa que a Bergenina reverteu o perfil lipídico aumentado, nos animais alimentados com dieta rica em gordura, incluindo os triglicerídeos, utilizando doses 2,5, 5 e 10mg/kg, inferiores as doses utilizadas neste experimento. Ambika & Saravanan (2013) reforçam em sua pesquisa, a ação antilipêmica da Bergenina.

Tanto em modelos animais de DHGNA como em seres humanos portadores desta patologia, o perfil bioquímico desta doença, costuma, além de alterações no perfil lipídico e glicêmico, manifestar-se, dependendo do grau das doenças, alterações dos níveis das transaminases, expressando de certa forma, a agressão ao hepatócito.

Neste experimento, não verificamos diferenças estatísticas significativa nos níveis de TGO e TGP, talvez por estes animais terem desenvolvido apenas esteatose grau II, com pouca inflamação, conforme verificado nos exames histológicos.

No entanto, a literatura está repleta de trabalhos científicos confirmando a ação hepatoprotetora da Bergenina. Hikino *et al.* (1985) analisaram ação anti-hepatotóxicas dos taninos em cultura de células hepáticas intoxicadas por tetracloreto de carbono e galactosamina e constataram que os taninos hidrossolúveis apresentaram intensa ação inibitória das transaminases. Lim *et al.* (2000), em um modelo animal de intoxicação por tetracloreto de carbono (CCl₄), constataram ação hepatoprotetora, tratando os animais com *Mallotus japonicus*, o qual possui a Bergenina como seu principal constituinte.

A DHGNA comumente está associada à obesidade, Diabetes Mellitus, Hipertensão Arterial, Resistência Insulínica e Hiperlipidemia. Por fim, a DHGNA é considerada a expressão hepática da síndrome metabólica.

Sendo a DHGNA uma doença metabólica sistêmica, seu tratamento está baseado em mudanças de hábitos e de estilo de vida, incluindo perda de peso, diminuição da resistência insulínica, melhora do perfil lipídico, evitando-se a desnutrição que pode agravar o quadro de EHNA (BRUNNER *et al.*, 2019)

No presente estudo, objetivou-se um tratamento que possibilitasse melhora das características patológicas da DHGNA associada a alterações do peso corporal, da gordura visceral e subcutânea, alcançando os componentes associados à DHGNA.

A capacidade hepatoprotetora de uma droga pode ser avaliada pelo grau de redução dos efeitos lesivos ou manutenção dos mecanismos fisiológicos hepáticos normais. Para essa avaliação, TGO, TGP, FA e GGT são utilizadas como mecanismos indiretos para avaliar a

condição hepática Kumar *et al.* (2012), enquanto, a Histopatologia representa uma avaliação direta.

Analisando os aspectos histopatológicos dos tratamentos no presente trabalho foi observada regressão significativa do grau de esteatose com dose de Bergenina de 50mg/kg e do extrato seco de *Endopleura uchi* na dose de 200mg/kg. Hsu & Yen (2007) demonstraram que ratos submetidos a dieta hipercalórica apresentaram esteatose macrovesicular acentuada, e regressão do grau de esteatose no grupo que recebeu intervenção com ácido gálico, também presente na estrutura da Bergenina, sendo ela, um C-Glucosídeo-4 metil ácido gálico. Os mesmos resultados não foram encontrados nas doses menores, indicando que seus resultados foram dose dependente.

Hong *et al.*, (2000) encontraram resultados semelhantes ao utilizarem a planta *Alisma orientali*, rica em triterpenóides. Notaram que o tratamento com extrato metanólico de *Alisma orientalis*, atenuou a esteatose hepática e a deposição de colágeno no fígado, de forma semelhante ao presente trabalho desenvolvido. Triterpenóides são substâncias também encontradas, em estudos fitoquímicos da *Endopleura uchi*. (MUNIZ, 2013; LAGOS, 2006; LUNA *et al.* 2000;)

Reforçando os resultados encontrados nesta pesquisa Hsu & Yen (2007), Chao *et al.*, (2014), demonstraram que a administração de ácido gálico diminuiu notavelmente as alterações causadas pela esteatose hepática grave, além dos níveis séricos de TGO e TGP em camundongos com DHGNA induzida por dieta. Além de reverter o excesso de gordura acumulada em forma de vacúolos no hepatócito, a administração de ácido gálico reduziu os níveis de triglicerídeos, colesterol e ácidos graxos no fígado, indicando que o ácido gálico melhora a esteatose hepática e possui um potencial efeito hepatoprotetor.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados encontrados na pesquisa, podemos concluir que:

- A ração hiperlipídica (RH), elaborada no Laboratório de Fisiologia do ICB-UFAM, foi eficiente no desenvolvimento de ganho de massa corporal assim como no desenvolvimento da esteatose, tendo como grau máximo o grau 2/3.
- Tanto o extrato seco de *Endopleura uchi* como a solução aquosa da Bergenina nas suas doses maiores foram eficientes em conter o avanço da obesidade dos animais tratados profilaticamente assim como em reduzir a massa corporal nos tratados pós-indução.
- Não se constatou ação hipoglicemiante em ambas as soluções (Extrato seco da *Endopleura uchi* e solução aquosa de Bergenina), porém, nenhum animal apresentou alterações na HbA1c, o que expressaria um Diabetes crônico descompensado.
- O Extrato seco da *Endopleura uchi* na dose de 200mg/kg/dia e a solução de Bergenina nas duas doses ofertadas, (50 e 25mg/kg) foram eficientes em suprimir a hipercolesterolemia nos grupos de tratamento pós-indução.
- Considerando um processo de adaptação metabólica sofrido pelos animais do grupo controle positivo, pode-se verificar que o Extrato seco de *Endopleura uchi* e a solução de Bergenina foram eficientes em controlar os níveis de triglicédeos tanto no tratamento profilático como no tratamento pós-indução.
- Não foi possível afirmar indiretamente a ação protetora da célula hepática pelo Extrato seco de *Endopleura uchi*, nem pela solução aquosa de Bergenina, tendo em vista, valores normais das transaminases, inclusive no grupo controle positivo, o que pode ser justificada, pela pouca inflamação e quase nenhuma necrose, no exame histológico.
- O extrato seco da *Endopleura uchi* e a solução aquosa de Bergenina reduziram o percentual de esteatose dos animais histologicamente.
 Nos grupos de tratamento profilático, foi constatado uma redução do grau 2 de esteatose em 50% dos animais do grupo tratado com 200mg/kg/dia de Extrato seco de *Endopleura uchi* e redução do grau de esteatose nos animais tratados com 50mg/kg/dia de solução de Bergenina, sendo que 16,7% destes animais do grupo GM9, não chegaram nem a desenvolver esteatose.
 Nos grupos de tratamento pós-indução com Extrato seco de *Endopleura uchi* foi constatado uma redução de 50% das esteatose grau 2, e 16,7%, não apresentara esteatose. No grupo tratado com 50mg/kg/dia, com Solução de Bergenina, apenas 20% dos animais apresentaram esteatose grau 2 e 80% encontravam-se com esteatose grau 1 (leve), se comparado ao grupo controle positivo (GM2), mostrando-se como potencial produto farmacológico no apoio ao tratamento da obesidade e demais fatores, envolvidos na síndrome metabólica, entre estes, o tratamento da DHGNA.

REFERÊNCIAS

ABENAVOLI, Ludovico *et al.* Effect of Mediterranean diet and antioxidant formulation in non-alcoholic fatty liver disease: a randomized study. **Nutrients**, 2007. Vol. 9, n^o. 8, p. 870.

AHMED, A.; WONG, R. J.; HARRISON, S. A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Review: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice. **Journal of the American Gastroenterological Association**, 2015. Vol. 13, n^o 12, p. 2062-70. DOI: 10.1016/j.cgh.2015.07.

ALEXIADES, M. N.; SHANLEY. P. Productos forestales, medios de subsistencia y conservación. Estudios de casos de manejo de produtos forestales no maderables. **América Latina**, 2004. Vol. 3, Shanley & Gaya, Cap. 11, p. 219.

ALMEIDA, Aline Silva *et al.* Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 2008. Vol.. 44, n^o. 6, p. 429-432.

AMATO, Antonella *et al.* NAFLD and atherosclerosis are prevented by a natural dietary supplement containing curcumin, silymarin, guggul, chlorogenic acid and inulin in mice fed a high-fat diet. **Nutrients**, 2017. Vol. 9, n^o 5, p. 492.

AMBIKA, Sagadevan; SARAVANAN, Ramalingam; THIRUMAVALAVAN, Kumarasamy. Antidiabetic and antihyperlipidemic effect of p-hydroxycinnamic acid on streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. **Biomedicine & Aging Pathology**, 2013. Vol. 3, n^o 4, p. 253-257. ISSN: 0974-6943.

ANDRADE, Gabriel Costa de *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in different populations: a clinical and epidemiological study-sample of São José do Rio Preto. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 2016. Vol. 62, n^o 3, p. 218-226. DOI: org/10.1590/1806-9282.62.03.218.

ANDREOLO, N. A.; SANTOS, E. F. dos; ARAÚJO, M. R.; PETRO, L. R. Idade dos ratos *versus* idade humana: qual a relação? **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.**, 2012. Vol. 25, n^o 1, p. 49-51.

ANGULO, Paul *et al.* The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. **Hepatology**, 2007. Vol. 45, n^o 4, p. 846-854.

ANGULO, Paul. Nonalcoholic fatty liver disease. **New England Journal of Medicine**, 2002. Vol. 346, n^o. 16, p. 1221-1231.

ANSTEE, Q. M.; TARGHER, G.; DAY, C. P. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 2013. Vol. 10(6), 330.

ANTONISAMY, P.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azimatetracantha* Lam. in mouse and rat model. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2011. Vol. 63, p. 1070-1077.

ASCHA, Mustafa S. *et al.* The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, 2010. Vol. 51, n° 6, p. 1972-1978.

ATTAR, B. M.; VAN THIEL, D. H. Current concepts and management approaches in nonalcoholic fatty liver disease. **The Scientific World Journal**, 2013. Vol. 2013.

AYONRINDE, Oyekoya T. *et al.* Gender-specific differences in adipose distribution and adipocytokines influence adolescent nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, 2011. Vol. 53, n°3, p. 800-809.

BACK, B. B. *et al.* The PHOBOS perspective on discoveries at RHIC. **Nuclear Physics A**, 2005. Vol. 757, n° 1-2, p. 28-101.

BEDOSSA, PIERRE; FLIP PATHOLOGY CONSORTIUM. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, 2014. Vol. 60, n° 2, p. 565-575.

BEDOSSA, Pierre *et al.* Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. **Hepatology**, 2012. Vol. 56, n° 5, p. 1751-1759.

BERTOT, C. B.; ADAMS, L. A. The natural course of non-alcoholic fatty liver disease. **International Journal of Molecular Science**, 2012. Vol. 17, n° 5, p. 774-785.

BILIERI, C. E.; KARSBRUG, I. V.; GOMES, C. M.; LAUTON, D. S.; NASCIMENTO, H. R. Genotoxicidade de Infusões de Casca de Uxi Amarelo (*Endopleura uchi*) Pelo Sistema Pisumsativum. In: **Congresso de Iniciação Científica**, 2011. 4ª edição. (JC), vol.7.

BILLETER, Adrian T. *et al.* Combined non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: sleeve gastrectomy or gastric bypass? - a controlled matched pair study of 34 patients. **Obesity Surgery**, 2016. Vol. 26, n° 8, p. 1867-1874.

BORGES, J. C. M. Acetilbergenina: obtenção e avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória. 122 f. Dissertação (Mestrado) - **Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde**. Belém, 2010. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

BORRÁS, M.R.L. Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas - Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa. **Editores Valer**/Governo do Estado do Amazonas, Manaus, 2003. 322 pp.

BRANCO, A. C. 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**, 2011. Vol. 15, n° 2, p. 209-14.

BRANCO, Natasha Valois Castelo *et al.* Efeito do chá de uxi (*Endopleura uchi*) na esteatose hepática. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, 2018. Vol. 16, n°1, p. 25-29.

BROWN, G. T.; KLEINER, D. E. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. **Metabolism Clinical and Experimental**, 2016. Vol. 65, n° 8, p. 1080-1086.gv

BROWNING, Jeffrey D. *et al.* Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. **Hepatology**, 2004. Vol. 40, n° 6, p. 1387-1395.

BRUNNER, K, T. *et al.* Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Obesity. **TreatmentCurrent Obesity Reports**. 2019, Apr 03.

BRUNNER, Katherine T. *et al.* Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Obesity **Treatment.Current Obesity Reports**, 2019. Apr 03, p. 1-9.

BRUNT, Elizabeth M. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. **Hepatology**, 2011. Vol. 53, n° 3, p. 810-820.

BRUNT, Elizabeth M. *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. **The American Journal of Gastroenterology**, 1999. Vol. 94, n° 9, p. 2467, 1999.

BRUNT, Elizabeth M. Nonalcoholic steatohepatitis. In: **Seminars in Liver Disease**. Copyright© 2004 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA, 2004. p. 3-20.

BUETTNER, R. *et al.* Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **Journal of Molecular endocrinology**, 2006. Vol. 36, n° 3, p. 485-501.

BUGIANESI, Elisabetta *et al.* Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, 2002. Vol. 123, n° 1, p. 134-140.

BURCELIN, Rémy *et al.* Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 2002. Vol. 282, n° 4, p. E834-E842.

BURT, A.D.; MUTTON, A.; DAY. C.P., **Seminars in Diagnostic Pathology**,1998. Vol.15, n°4, p. 246-258.

BUZZETTI, Elena; PINZANI, Massimo; TSOCHATZIS, Emmanuel A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).**Metabolism**, 2016. Vol. 65, n° 8, p. 1038-1048.

CABALLERÍA, Llorenç *et al.* Factores de riesgoasociados a la presencia de hígadograso no alcohólico: unestudio de casos y controles.**MedicinaClínica**, 2013. Vol. 141, n° 6, p. 233-239.

CABALLERÍA, Llorenç *et al.* Prevalence and factors associated with the presence of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population in Spain. **European Journal of Gastroenterology &Hepatology**, 2010. Vol. 22, n° 1, p. 24-32.

CAO, Shixiong *et al.* Greening China naturally.**Ambio**, 2011. Vol. 40, n° 7, p. 828-831.

CHALASANI, N. *et al.* American College of Gastroenterology; American Gastroenterological Association. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. **American Journal of Gastroenterol**, 2012. Vol. 107, n. 6, p. 811-26.

CHAO, Jung *et al.* Gallic acid ameliorated impaired glucose and lipid homeostasis in high fat diet-induced NAFLD mice. **PloS One**, 2014. Vol. 9, n° 6, p. e96969.

CLAPPER, Jason R. *et al.* Diet-induced mouse model of fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis reflecting clinical disease progression and methods of assessment. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, 2013. Vol. 305, n°. 7, p. G483-G495.

CORRÊA, M.P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Rio de Janeiro, **Imprensa Nacional**, 1984. Vol. 6.

COSTA, *et al.* **Estatística Básica**. Projeto Fronteiras: Alto Rio Negro Manaus: [s.n.]. p. 81-82, 2012.

COTRIM, *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease in Brazilian Society of Hepatology Consensus. Clinical and histological profile. **Annals of Hepatology**, 2016. Vol. 53, n°. 2, p. 33-37.

CUATRECASAS, J. "A Taxonomic Revision of the Humiriaceae." In **Systematic Plant Studies**, 25-214. Contributions from the United States National Herbarium. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1961.

CUEVAS, María J. *et al.* Suppression of Amphiregulin/Epidermal Growth Factor Receptor Signals Contributes to the Protective Effects of Quercetin in Cirrhotic Rats, 2. **The Journal of Nutrition**, 2011. Vol. 141, n° 7, p. 1299-1305.

DAY. C. P.; JAMES, O. F. W. Steatohepatitis: A tale of two hits"? **Gastroenterology**, Editorials, 1998. Vol. 114, n° 4, p. 842-845.

DE LA MONTE, Suzanne M. *et al.* Ceramide-mediated insulin resistance and impairment of cognitive-motor functions. **Journal of Alzheimer's Disease**, 2010. Vol. 21, n° 3, p. 967-984.

DEL RIO, Daniele *et al.* Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2013. Vol. 18, n°. 14, p. 1818-1892.

DINIZ, Margareth de Fátima Formiga de *et al.* Padronização do parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos *Swiss* e ratos *Wistar*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, 2006. Vol. 10, n° 2, p. 171-176.

DONNELLY, Kerry L. *et al.* Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of Clinical Investigation**, 2005. Vol, 115, n° 5, p. 1343-1351.

DULAI, Parambir S. *et al.* Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. **Hepatology**, 2017. Vol. 65, n° 5, p. 1557-1565.

DYSON, J. K.; MCPHERSON, S.; ANSTEE, Q. M. Non-alcoholic fatty liver disease: non-invasive investigation and risk stratification. **Journal of Clinical Pathology**, 2013. Vol. 66, n° 12, p. 1033-1045.

EKSTEDT, Mattias *et al.* Fibrosis stage is the strongest predictor for disease specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. **Hepatology**, 2015. Vol. 61, n° 5, p. 1547-1554.

EL AZEEM, Hamdy Abd *et al.* Association between nonalcoholic fatty liver disease and the incidence of cardiovascular and renal events. **Journal of the Saudi Heart Association**, 2013. Vol. 25, n° 4, p. 239-246.

ELWING, Jill E. *et al.* Depression, anxiety, and non-alcoholic steatohepatitis, **Psychosomatic Medicine**, 2006. Vol. 68, n° 4, p. 563-569.

ESTERSON, Yonah B.; GRIMALDI, Gregory M. Radiologic Imaging in Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. **Clinics in Liver Disease**, 2018. Vol. 22, n° 1, p. 93-108.

FARNSWORTH, Norman R. *et al.* Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, 1985. Vol. 63, n° 6, p. 965.

FERRAMOSCA, Alessandra; DI GIACOMO, Mariangela; ZARA, Vincenzo. Antioxidant dietary approach in treatment of fatty liver: New insights and updates. **World Journal of Gastroenterology**, 2017. Vol. 23, n° 23, p. 4146.

FONTELLES, Mauro José. **Bioestatística aplicada à pesquisa experimental**: Editora Livraria da Física, 2012. Vol. 2, São Paulo.

FRANCQUE, Sven *et al.* PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of Hepatology**, 2015. Vol. 63, n°1, p. 164-173.

FUJITA, Koji *et al.* Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. **Hepatology**, 2009. Vol. 50, n°3, p. 772-780.

GAHARWAR, R.; TRIKHA, S.; MARGEKAR, S.L.; JATAV, O. P.; GANGA, P. D. Study of clinical profile of patients of non-alcoholic fatty liver disease and its association with metabolic syndrome. **The Journal of the Association of Physicians of India**, 2015. Vol. 63, n° 1, p. 12-6.

GAHARWAR, Rakesh *et al.* Study of clinical profile of patients of nonalcoholic fatty liver disease and its association with metabolic syndrome. **The Journal of the Association of Physicians of India**, 2015. Vol. 63, n° 1, p. 12-6.

GANZ, Michal; SZABO, Gyongyi. Immune and inflammatory pathways in NASH. **Hepatology International**, 2013. Vol. 7, n° 2, p. 771-781.

GELLI, Chiara *et al.* Effect of a counseling-supported treatment with the Mediterranean diet and physical activity on the severity of the non-alcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, 2017. Vol. 23, n° 17, p. 3150.

GIORDANO, L. C. S &; BOVE, C. P. Taxonomic considerations and amended description of *Humiriastrum spiritu-sancti*, Humiriaceae. **Rodriguesia**, 2008. Vol. 59, n° 1, p. 151-154.

GOLABI, P, *et al.* Effectiveness of exercise in hepatic fat mobilization in non-alcoholic fatty liver disease: Systematic review. **World Journal Gastroenterology**, 2016. Vol. 22, n° 27, p. 6318-6327.

GRANGER, Christopher B. *et al.* Predictors of hospital mortality in the global registry of acute coronary events. **Archives of Internal Medicine**, 2003. Vol. 163, n° 19, p. 2345-2353.

GROSSO, Giuseppe *et al.* Red orange: experimental models and epidemiological evidence of its benefits on human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2013, vol. 2013.

GUTIÉRREZ-GROBE, Y. *et al.* Less liver fibrosis in metabolically healthy compared with metabolically unhealthy obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Diabetes & Metabolism**, 2017. Vol. 43, n° 4, p. 332-337.

HAAS, Joel T.; FRANQUE, Sven; STAELS, Bart. Pathophysiology and mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. **Annual Review of Physiology**, 2016. Vol. 78, p. 181-205.

HARING, Robin *et al.* Ultrasonographic hepatic steatosis increases prediction of mortality risk from elevated serum gamma-glutamyltranspeptidase levels. **Hepatology**, 2009. Vol. 50, n°5, p. 1403-1411.

HARLEY, Isaac *et al.* IL-17 signaling accelerates the progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. **Hepatology**, 2014. Vol. 59, n° 5, p. 1830-1839.

HERTZBERG, Barbara S.; MIDDLETON, William D. **Ultrasound: the requisites**, 2015. Elsevier Health Sciences.

HIKINO, Hiroshi *et al.* Antihepatotoxic actions of tannins. **Journal of Ethnopharmacology**, 1985. Vol. 14(1), 19-29.

HOEK-VAN DEN HIL, Elise F. *et al.* Quercetin induces hepatic lipid omega-oxidation and lowers serum lipid levels in mice. **PloS One**, 2013. Vol. 8, no. 1, p. e51588.

HONG, Xuezhi *et al.* Protective effects of the *Alisma orientalis* extract on the experimental nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2006. Vol. 58, n°10, p. 1391-1398.

HOSSAIN, Noreen *et al.* Independent predictors of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, 2009. Vol. 7, n° 11, p. 1224-1229.

HSU, C. L.; YEN, G.C. Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. **British Journal of Nutrition**, 2007. Vol. 98, n^o 4, p.727-735.

IDILMAN, Ilkay S. *et al.* A comparison of liver fat content as determined by magnetic resonance imaging-proton density fat fraction and MRS versus liver histology in non-alcoholic fatty liver disease. **ActaRadiologica**, 2016. Vol. 57, n. 3, p. 271-278.

IPSEN, David Højland; LYKKESFELDT, Jens; TVEDEN-NYBORG, Pernille. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2018. Vol. 75(18) 3313-3327, p. 1-15.

JACKSON LABORATORY, 2007. **Physiological Data Summary-C57BL/6J** (000664).

JAHROMI, M. A Farboodniay; CHANSOURIA, J. P. N.; RAY, Anil B. Hypolipidaemic activity in rats of bergenin, the major constituent of *Flueggeamicrocarpa*. **Phytotherapy Research**, 1992. Vol. 6, n^o 4, p. 180-183.

JIN, Jingling *et al.* Activation of CDK4 triggers development of non-alcoholic fatty liver disease. **Cell Reports**, 2016. Vol. 16, n^o3, p. 744-756.

JIN, Jingling *et al.* Epigenetic changes play critical role in age-associated dysfunctions of the liver. **Aging Cell**, 2010. Vol. 9, n^o 5, p. 895-910.

KARNIKOWSKI, Mauro *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in Brazilian middle-aged and older adults. **São Paulo Medical Journal**, 2007. Vol. 125, n^o 6, p. 333-337.

KLEINER, David E. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, 2005. Vol. 41, n^o 6, p. 1313-1321.

KOLIAKI, Chrysi *et al.* Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. **Cell Metabolism**, 2015. Vol. 21, n^o 5, p. 739-746.

KOZLITINA, Julia *et al.* Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. **Nature Genetics**, 2014. Vol. 46, n^o 4, p. 352.

KUMAR, R.; PATEL, D. K.;PRASAD, S. K.; SAIRAM, K.; HEMALACHA, S. Antidiabetic of alcoholic root extract of *Caesalpinidiagnyna* in streptozotocin-nicotinamide induced diabetes rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 2012, p. S934-S940.

KUMAR, R. *et al.*Antidiabetic activity of alcoholic root extract of *Caesalpinidiagnyna* in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 2012. Vol. 2, n^o 2, p. S934-S940.

KUO, K. L.,*et al.* Estudos comparativos sobre os efeitos hipolipidêmicos e supressores de crescimento de folhas de chá oolong, preto, pu-erh e verde em raros. **J. Agric Food Chem**, 2005. Vol. 53(2), p. 480-9.

LABRECQUE, Douglas R. *et al.* World Gastroenterology Organization global guidelines: Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, 2012. Vol. 48(6), 467-473.

LAGOS, I. A. Estudo químico de fitoconstituintes isolados de *Sacoglottis uchi* Huber (Humiriaceae). **Dissertação (Mestrado em Química)**, Universidade Federal do Amazonas-UFAM, 2006.

LASSAILLY, Guillaume *et al.* Perspectives on treatment for nonalcoholic steatohepatitis. **Gastroenterology**, 2016. Vol. 150, n° 8, p. 1835-1848.

LAU, J. K. C.; ZHANG, X.; YU, J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. **The Journal of Pathology**, 2017. Vol. 241, n° 1, p. 36-44.

LE, Michael H. *et al.* Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and risk factors for advanced fibrosis and mortality in the United States. **PloS One**, 2017. Vol.12, n°. 3, p. 0173499.

LEE, SeungSoo; PARK, Seong Ho. Radiologic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, 2014. Vol.20, n°. 23, p. 7392.

LEE, Sang Won *et al.* Unenhanced CT for assessment of macrovesicular hepatic steatosis in living liver donors comparison of visual grading with liver attenuation index. **Radiology**, Vol. 244, n. 2, p. 479-485, 2007.

LEGHI, Gabriela Esteves; DOMENICI, Fernanda Aparecida; VANNUCCHI, Helio. Influence of oxidative stress and obesity in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Arquivos de Gastroenterologia**, 2015. Vol. 52, n° 3, p. 228-233.

LIEBER, Charles S. *et al.* Model of nonalcoholic steatohepatitis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 2004. Vol. 79, n° 3, p. 502-509.

LIM, Hwa-Kyung *et al.* Hepatoprotective effects of bergenin, a major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride-intoxicated rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 2000. Vol. 72, n°. 3, p. 469-474.

LIN, Yu-Cheng *et al.* Sonographic fatty liver overweight and ischemic heart disease. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, 2005. Vol. 11, n° 31, p. 4838.

LIU, I.; KOWDLEY, K. Natural History of Non-Alcoholic Steatohepatitis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, 2006. Vol.40, n°1, p. 11-16.

LIU, Yang-Lin *et al.* TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Nature Communications**, 2014. Vol. 5, p. 4309.

LORENZI, Harri *et al.* Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura). **São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 2006. Vol. 640, p. 149.

LUDWIG, Jurgen *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. In: **Mayo Clinic Proceedings**. 1980. Vol. 55, n^o7, p. 434-438.

LUNA, J. S. *et al.* Isolamento e Identificação estrutural dos constituintes químicos de *Endopleura uchi* (Humiriaceae). In **23a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Minas Gerais, Brasil**. Poços de Caldas-MG, 2000. Vol. 2, p. 123.

MA, Xiaozhou *et al.* Imaging-based quantification of hepatic fat: methods and clinical applications. **Radiographics**, 2009. Vol. 29, n^o 5, p. 1253-1277.

MADUKA, H. C. C.; OKOYE, Z. S. C.; EJE, A. The influence of *Sacoglottis gabonensis* stem bark extract and its isolate bergenin, Nigerian alcoholic beverage additives, on the metabolic and haematological side effects of 2, 4-dinitrophenyl hydrazine-induced tissue damage. **Vascular Pharmacology**, 2002. Vol. 39, n^o. 6, p. 317-324.

MAGALHÃES, Lyege Amazonas M. *et al.* Identification of bergenin and carotenoids in the *uchi* (*Endopleura uchi*, Humiriaceae) fruit. **Acta Amazonica**, 2007. Vol. 37, n^o 3, p. 447-450.

MARSHALL, Richard H. *et al.* Hepatorenal index as an accurate, simple, and effective tool in screening for steatosis. **American Journal of Roentgenology**, 2012. Vol. 199, n^o 5, p. 997-1002.

MARX, Friedhelm *et al.* Studies of edible Amazonian Plants. Part 5: Chemical Characterisation of Amazonian *Endopleura uchi* fruits. **European Food Research Technology** 2002. Vol. 214, p. 331-334.

MASHEK, Douglas G. *et al.* Hepatic lipid droplet biology: getting to the root of fatty liver. **Hepatology**, 2015. Vol. 62, n^o 3, p. 964-967.

MATTEONI, Christi A. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**, 1999. Vol. 116, n^o6, p. 1413-1419.

MCPHERSON, Stuart *et al.* Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. **Journal of Hepatology**, 2015. Vol. 62, n^o 5, p. 1148-1155.

MCPHERSON, Stuart *et al.* Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Gut**, 2010. Vol. 59, n^o 9, p. 1265-1269.

MILIC, S.; LULIC, D.; STIMAC, D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: Biochemical, metabolic and clinical presentations. **World Journal Gastroenterology**, 2014. Vol. 20, n^o 28, p. 9330-9337.

MIURA, Kouichi *et al.* Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, 2012. Vol. 302, n^o 11, p. G1310-G1321.

MOK, S. R. S.; DIEHL, D. L. The role of EUS in Liver Biopsy. **Curr Gastroenterol Rep**. 2019. Vol. 21, n^o. 2, p. 6.

MONETTI, Mara *et al.* Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver. **CellMetabolism**, 2007. Vol. 6, n° 1, p. 69-78.

MONTEIRO, S. C.; BRANDELLI, C. L. C. Aspectos teóricos e aplicação. **Farmacobotânica**, 2017. cap.1, p. 1-13.

MUNIZ, M. P. Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Endopleura uchi* Huber Cuatrec. 110 f. **Dissertação (Mestrado em Química)** - Universidade Federal do Amazonas, Manaus UFAM, 2013.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A.**, 2004. Vol.1054, n° 1-2, p.95-111.

NAKAMURA, A. *et al.* Protection from non-alcoholic steatohepatitis and liver tumorigenesis in high fat-fed insulin receptor substrate-1-knockout mice despite insulin resistance. **Diabetologia**, 2012. Vol. 55, n° 12, p. 3382-3391.

NAKAMURA, Akinobu; TERAUCHI, Yasuo. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. **International Journal of Molecular Sciences**, 2013. Vol. 14, n° 11, p. 21240-21257, 2013.

NUNOMURA, Rita *et al.* Characterization of bergenin in *Endopleura uchi* bark and its anti-inflammatory activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2009. Vol. 20, n°6, p. 1060-1064.

OLIVEIRA, K. M.; RAMALHO, J. A.; DANTAS, J. G. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, 2011. Vol. 15, n° 2, p. 209-214.

ONG, J. P.; PITTS, A.; YOUNOSSI, Z. M. Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, 2008. Vol. 49, Issue 4, p. 608-612.

ONG, J. P.; YOUNOSSI, Z. M. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. **Clinics in Liver Disease**, 2007. Vol. 11(1), p. 1-16.

ONI, Ebenezer T. *et al.* Relation of physical activity to prevalence of nonalcoholic Fatty liver disease independent of cardiometabolic risk. **American Journal of Cardiology**, 2015. Vol. 115, n° 1, p. 34-39

PAIS, Raluca *et al.* A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver. **Journal of Hepatology**, 2013. Vol. 59, n° 3, p. 550-556.

PAN, J. J; FALLON, M.B. Gender and racial differences in nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Hepatology**, 2014. Vol. 6, n° 5, p. 274.

PANCHAL, Sunil K. *et al.* Rutin Attenuates Metabolic Changes, Nonalcoholic Steatohepatitis, and Cardiovascular Remodeling in High-Carbohydrate, High-Fat Diet-Fed Rats. **The Journal of Nutrition**, 2011. Vol. 141, n° 6, p. 1062-1069.

PAPATHEODORIDIS, George V. *et al.* High prevalence of elevated liver enzymes in blood donors: associations with male gender and central adiposity. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, 2007. Vol. 19, n° 4, p. 281-287.

PAYNE, J. H; DEWIND, L. T. Surgical treatment of obesity. **The American Journal of Surgery**, 1969. Vol. 118, n° 2, p. 141-147.

PERAZZO, Hugo; OLIVEIRA C P, Thierry; DUFOUR, Jean-François. The interactions of nonalcoholic fatty liver Disease and Cardiovascular Diseases. **Clinics in Liver Disease**, 2014. Vol. 18, n° 1, p. 233-248.

PERERA, Nilanka *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease increases the mortality from acute coronary syndrome: an observational study from Sri Lanka. **BMC Cardiovascular Disorders**, 2016. Vol. 16, n° 1, p. 37.

PESSAYRE, Dominique *et al.* Mitochondria in steatohepatitis. In: **Seminars in Liver Disease**. Copyright© 2001 by Thieme Medical Publishers, 2001. Inc. 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662, p. 057-070.

PETRO, Ann E. *et al.* Fat, carbohydrate, and calories in the development of diabetes and obesity in the C57BL/6J mouse. **Metabolism**, 2004. Vol. 53, n° 4, p. 454-457.

PETTA, S.; MURATORE, C.; CRAXI, A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: the present and the future. **Digestive and Liver Disease**, 2009. Vol. 41, n° 9, p. 615-625.

POLITI, F.A.S. *et al.* Testes preliminares de motilidade intestinal e toxicidade oral aguda com extrato de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) em camundongos. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, 2010. Vol. 1, n° 1, p. 187-189.

POLITI, F. A. S. *et al.* Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities and determination of the total tannin content of bark extracts *Endopleura uchi*. **International Journal of Molecular Sciences**, 2011. Vol. 12, n° 4, p. 2757-2768.

PRANCE, G. T.; SILVA, M. F. da. *Árvores de Manaus*. **CNPq/INPA**, Manaus, Amazonas, 1975. p. 312.

PURI, PUNEET, *et al.* A lipidemic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, 2007. Vol. 46, n° 4, p. 1081-1090.

QUIIN, R.D.V.M. Comparing rat's to human's age: How old is my rat people years? **Nutrition**, 2005. Vol. 21, p. 775-7.

REDDY, Srinevas K. *et al.* Outcomes of curative treatment for hepatocellular cancer in nonalcoholic steatohepatitis *versus* hepatitis C and alcoholic liver disease. **Hepatology**, 2012. Vol. 55, n° 6, p. 1809-1819.

RESTELL, Tamy Ingrid *et al.* Hematology of Swiss mice (*Mus musculus*) of both genders and different ages. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 2014. Vol. 29, n° 5, p. 306-312.

REVILLA, J. Plantas da Amazônia. Oportunidades Econômicas Sustentáveis. Manaus, INPA/SEBRAE, 2001. p. 89-90.

RINELLA, Mary E.; GREEN, Richard M. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. **Journal of Hepatology**, 2004. Vol. 40, nº 1, p. 47-51.

RINELLA, Mary E.; SANYAL, Arun J. Management of NAFLD: a stage-based approach. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 2016. Vol. 13, nº 4, p. 196.

RONG-HUA, P. A. N. *et al.* Comparative pharmacokinetics of bergenin, a main active constituent of *Saxifragastolonifera* Curt. In normal and hepatic injury rats after oral administration. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 2016. Vol. 14, nº 10, p. 776-782.

SÁ, Beatriz M. *et al.* Subchronic toxicity evaluation of the hydroethanolic extract from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec in Wistar rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2015. Vol. 9, nº 8, p. 223-229.

SANTO B, Figueiredo P. *et al.* Impacto de diferentes fontes lipídicas em parâmetros bioquímicos de ratos Wistar. **Revista UNIABEU Belford Roxo**, 2016. Vol. 9, nº 23, p. 140-148.

SAYINER, Mehmet *et al.* Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in the United States and the rest of the world. **Clinics in Liver Disease**, 2016. Vol. 20, nº 2, p. 205-214.

SEKI, Ekihiro; SCHWABE, Robert F. Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. **Hepatology**, 2015. Vol. 61, nº 3, p. 1066-1079.

SHAH, Amy G. *et al.* Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, 2009. Vol. 7, nº 10, p. 1104-1112.

SHIN, Jung Hee; JUNG, JiHye. Non-alcoholic fatty liver disease and flavonoids: current perspectives. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, 2017. Vol. 41, nº 1, p. 17-24.

SILVA, L. R., & Teixeira, R. Phenolic profile and biological potential of *Endopleura uchi* extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 2015. Vol.8, nº11, p. 889-897.

SILVA, Saulo L. *et al.* Antimicrobial activity of bergenin from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. **Acta Amazonica**, 2009. Vol. 39, nº 1, p. 187-191.

SINGH, Siddharth *et al.* Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, 2015. Vol. 13, nº 4, p. 643-654.

SOUZA, Mônica Rodrigues de Araújo *et al.* Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. **Arquivos de Gastroenterologia**, 2012. Vol. 49, nº 1, p. 89-96.

STEPANOVA, Maria *et al.* Predictors of all-cause mortality and liver-related mortality in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Digestive Diseases and Sciences**, 2013. Vol. 58, n° 10, p. 3017-3023.

SU, Wen *et al.* Comparative proteomic study reveals 17 β -HSD13 as a pathogenic protein in nonalcoholic fatty liver disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2014. Vol. 111, n° 31, p. 11437-11442.

TAKAKI, Akinobu; KAWAI, Daisuke; YAMAMOTO, Kazuhide. Molecular mechanisms and new treatment strategies for non-alcoholic steatohepatitis (NASH). **International Journal of Molecular Sciences**, 2014. Vol. 15, n° 5, p. 7352-7379.

TARGHER, G. *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased prevalence of chronic kidney disease and proliferative/laser-treated retinopathy in type 2 diabetic patients. **Diabetologia**, 2008. Vol. 51, n° 3, p. 444-450.

TILG, Herbert. The role of cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. **Digestive Diseases**, 2010. Vol. 28, n° 1, p. 179-185.

TOSHINAI, Koji *et al.* Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2001. Vol. 281, n° 5, p. 1220-1225.

TSCHOP, H.; HEIMAN, M. L. Rodent obesity models: An overview. **Clinical Endocrinology Diabetes**, 2001. Vol. 109, n°6, p. 307-319.

TU, Lan N. *et al.* Metabolomic characteristics of cholesterol-induced non-obese nonalcoholic fatty liver disease in mice. **Scientific Reports**, 2017. Vol. 7, n° 1, p. 6120, 2017.

UCHIL, D; PIPALIA, D. *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) the hepatic component of metabolic syndrome. **JAPI**. 2009. Vol. 57, p. 201.

VERMA, Siddharth *et al.* Predictive value of ALT levels for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Liver International**, 2013. Vol. 33, n° 9, p. 1398-1405.

VONGHIA, Luisa; MICHIELSEN, Peter; FRANQUE, Sven. Immunological mechanisms in the pathophysiology of non-alcoholic steatohepatitis. **International DAM Journal of Molecular Science**, 2013. Vol. 14, n° 10, p. 19867-19890.

VUPPALANCHI, R.; CHALASANI, N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. **Hepatology**, 2008. Vol. 49, n° 1, p. 306-317.

WEBB, Muriel *et al.* Diagnostic value of a computerized hepatorenal index for sonographic quantification of liver steatosis. **American Journal of Roentgenology**, 2009. Vol. 192, n° 4, p. 909-914.

WILFLING, Florian *et al.* Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets. **Developmental Cell**, 2013. Vol. 24, n° 4, p. 384-399.

WILLIAMSON, M. A.; SNYDER, L. M. IN: **Wallach. Interpretação de Exames Laboratoriais**. 9ª edição, editora Guanabara Koogan. 2013, p. 199. ISBN 978-85-722-2230-8.

YAMAGUCHI, Kanji; LIU, Yang. *et al.* Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, 2007. Vol. 45, n° 6, p. 1366-1374.

YASUI, K.; HASHIMOTO, E. *et al.* Ministry of Health. Labour, and Welfare of Japan. Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, 2011. Vol. 9, n°5, 428-433.

YOUNOSSI, Z. M.; KOENIG, A. B. *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, 2016. Vol. 64, n°1, p.73-84.

YOUNOSSI, Z. M.; STEPANOVA, M. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. **Medicine**, 2012. Vol. 9, n°6, p. 319-327.

YOUNOSSI, Zobair M. *et al.* Diagnostic modalities for nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and associated fibrosis. **Hepatology**, 2018.v. 68, n. 1, p. 349-360, 2018.

YOUNOSSI, Zobair M. *et al.* Pathologic criteria for nonalcoholic steatohepatitis: interprotocol agreement and ability to predict liver related mortality. **Hepatology**, 2011. Vol. 53, n°6, p. 1874-1882.

YU, A. S.; KEEFFE, E. B. Nonalcoholic fatty liver disease. **Reviews in Gastroenterological Disorders**, 2002. Vol. 2, n° 1, p. 11-19.

ZOIS, Christos D. *et al.* Steatosis and steatohepatitis in postmortem material from Northwestern Greece. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, 2010. Vol. 16, no. 31, p. 3944.

ANEXO A



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Protocolo nº 025/2017– CEUA / UFAM, intitulado como "Avaliação do efeito protetor da Bergenina, contra doença hepática gordurosa induzida em fígado de camundongos", sob a orientação de **Dra.** Rosany Piccolotto Carvalho e Dr. Emerson Silva Lima e na responsabilidade de Fernando César Façanha Fonseca doutorando do Programa Multidisciplinar do PPGBiotec- UFAM, está de acordo com a Legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM).

Manaus, 01 de novembro de 2017.

Profa. Dra. Cinthya Iamile Frithz Brandão de Oliveira
Presidente do CEUA-UFAM

Portaria 1595/2014 - GR

ANEXO B



CN Lab Nutrition, Asian Group

802 Suite, Tower A, Shiji Yiyuan 4th GaoXin rd
High-Tech Economic Zone Xian, Shaanxi P.R.China

Tel:+86 029-87300736 88443022

www.cnlab.ca

Certificate of Analysis

Product name:	Bergenin		
Batch Number:	CN LAB180401	Manu. Date:	Apr. 17, 2018
Batch Size	430KG	Expiration Date:	Apr. 19, 2018
Net Weight:	1KG	Report Date	Apr. 16, 2020
Storage Condition:	Store in tight containers at controlled room temperature .		

Items	Specification	Result	Method
Maker Compounds	98.00%	98.13%	By HPLC
Organoleptic			
Appearance	Fine Powder	Conforms	Visual
Color	White crystal powder	Conforms	Visual
Odor	Characteristic	Conforms	Organoleptic
Taste	Characteristic	Conforms	Organoleptic
Drying Method	Vacuum drying	Conforms	
Identification			
(1)	positive reaction	Positive	Conforms
(2)	positive reaction	Positive	Conforms
Physical Characteristics			
Particle Size	NLT100%Through80	Conforms	AOAC973.03(TQ 106)
Loss on Drying	≅ 6.0%	4.13%	Conforms
Melting point	232-240°C	236.2-238.2	Conforms
Total Heavy Metals	<10ppm	Conforms	ICP/MS AOAC 993.14
Arsenic(As)	<1ppm	Conforms	ICP/MS AOAC 993.14
Lead(Pb)	<1ppm	Conforms	ICP/MS AOAC 993.14
Mercury(Hg)	<0.05ppm	Conforms	ICP/MS AOAC 993.14
Cadmium (Cd)	<1ppm	Conforms	ICP/MS AOAC 993.14
Microbiological Tests			
Total Yeast & Mold	≤1,00cfu/g	10cfu/g	FDA(BAM) 7th Ed.
E.Coli	Negative	Negative	USP33,NF28,2010
Salmonella	Negative	Negative	USP33,NF28,2010
Staphylococcus	Negative	Negative	USP33,NF28,2010
sterilization method	High temperature sterilizing		
Conclusion:	Conforms to in-USA standard		
Tested by	Yajuan Wei	Approved by	Na Ruan

Maximum absorption should be at 275nm and 220nm

APÊNDICE A

PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA BASEADO NA CLASSIFICAÇÃO DE BRUNT, (1999).

Grupo		Grau e Estágio de EHNA e fibrose pelo protocolo de Brunt. G= Grau, E= Estagiamento, F= Fibrose	Descrição dos achados- 10 Variáveis importantes à obs. (Brunt): 1) Esteatose Macro vesicular, 2) Balonização hepática, 3) inflamação intra-acinar (Leucócitos polimorfonucleares, linfócitos, plasmócitos e outros mononucleares, eosinófilos e microgranulomas), 4) Inflamação da Tríade Portal, 5) Hialino da Mallory, 6) Células PAS-D Kupffer, 7) Núcleos Glicogenados, 8) Lipogranulomas, 9) Depósito de ferro hepatocelular, 10) corpos acidófilos.
G R U P O GM	A1	(G0) (G1) (G2) (G3) (E1) (E2) (E3) (E4) (F0) (F1) (F2) (F3) (F4)	1) Esteatose (0) - (1) - (2) - (3). 2) Balonização {zona-(1) (2) (3)}. (Leve), (marcante). 3) Inflamação intra-acinar (0) - (1) -(2) -(3). 4) Inf. da Tríade Portal (ausente)- (leve)- (moderada)- (severa). 5) Hialinos de Mallory (0) - (1) - (2). 6) Cel. PAS-D Kupffer (0) - (1) - (2) - (3). 7) Núcleos Glicogenados (0) - (1) - (2) - (3). 8) Lipogranulomas (local da presença) (ausente)- (raros)- (Ocasionais)- (severa). 9) Ferro intra-hepatocitário (0) - (1) - (2) - (3) - (4). 10) Corpos Acidófilos (0) - (1) - (2) - (3) - (4), com inf. intra-acinar.
	A2	(G0) (G1) (G2) (G3) (E1) (E2) (E3) (E4) (F0) (F1) (F2) (F3) (F4)	1) Esteatose (0) - (1) - (2) - (3). 2) Balonização {zona-(1) (2) (3)}. (Leve), (marcante). 3) Inflamação intra-acinar (0) - (1) -(2) -(3). 4) Inf. da Tríade Portal (ausente)- (leve)- (moderada)- (severa). 5) Hialinos de Mallory (0) - (1) - (2). 6) Cel. PAS-D Kupffer (0) - (1) - (2) - (3). 7) Núcleos Glicogenados (0) - (1) - (2) - (3). 8) Lipogranulomas (local da presença) (ausente)- (raros)- (Ocasionais)- (severa). 9) Ferro intra-hepatocitário (0) - (1) - (2) - (3) - (4). 10) Corpos Acidófilos (0) - (1) - (2) - (3) - (4), com inf. intra-acinar.
	A3	(G0) (G1) (G2) (G3) (E1) (E2) (E3) (E4) (F0) (F1) (F2) (F3) (F4)	1) Esteatose (0) - (1) - (2) - (3). 2) Balonização {zona-(1) (2) (3)}. (Leve), (marcante). 3) Inflamação intra-acinar (0) - (1) -(2) -(3). 4) Inf. da Tríade Portal (ausente)- (leve)- (moderada)- (severa). 5) Hialinos de Mallory (0) - (1) - (2). 6) Cel. PAS-D Kupffer (0) - (1) - (2) - (3). 7) Núcleos Glicogenados (0) - (1) - (2) - (3). 8) Lipogranulomas (local da presença) (ausente)- (raros)- (Ocasionais)- (severa). 9) Ferro intra-hepatocitário (0) - (1) - (2) - (3) - (4). 10) Corpos Acidófilos (0) - (1) - (2) - (3) - (4), com inf. intra-acinar.
	A4	(G0) (G1) (G2) (G3) (E1) (E2) (E3) (E4) (F0) (F1) (F2) (F3) (F4)	1) Esteatose (0) - (1) - (2) - (3). 2) Balonização {zona-(1) (2) (3)}. (Leve), (marcante). 3) Inflamação intra-acinar (0) - (1) -(2) -(3). 4) Inf. da Tríade Portal (ausente)- (leve)- (moderada)- (severa). 5) Hialinos de Mallory (0) - (1) - (2). 6) Cel. PAS-D Kupffer (0) - (1) - (2) - (3). 7) Núcleos Glicogenados (0) - (1) - (2) - (3). 8) Lipogranulomas (local da presença) (ausente)- (raros)- (Ocasionais)- (severa). 9) Ferro intra-hepatocitário (0) - (1) - (2) - (3) - (4). 10) Corpos Acidófilos (0) - (1) - (2) - (3) - (4), com inf. intra-acinar.
	A5	(G0) (G1) (G2) (G3) (E1) (E2) (E3) (E4) (F0) (F1) (F2) (F3) (F4)	1) Esteatose (0) - (1) - (2) - (3). 2) Balonização {zona-(1) (2) (3)}. (Leve), (marcante). 3) Inflamação intra-acinar (0) - (1) -(2) -(3). 4) Inf. da Tríade Portal (ausente)- (leve)- (moderada)- (severa). 5) Hialinos de Mallory (0) - (1) - (2). 6) Cel. PAS-D Kupffer (0) - (1) - (2) - (3). 7) Núcleos Glicogenados (0) - (1) - (2) - (3). 8) Lipogranulomas (local da presença) (ausente)- (raros)- (Ocasionais)- (severa). 9) Ferro intra-hepatocitário (0) - (1) - (2) - (3) - (4). 10) Corpos Acidófilos (0) - (1) - (2) - (3) - (4), com inf. intra-acinar.
	A6	(G0) (G1) (G2) (G3) (E1) (E2) (E3) (E4) (F0) (F1) (F2) (F3) (F4)	1) Esteatose (0) - (1) - (2) - (3). 2) Balonização {zona-(1) (2) (3)}. (Leve), (marcante). 3) Inflamação intra-acinar (0) - (1) -(2) -(3). 4) Inf. da Tríade Portal (ausente)- (leve)- (moderada)- (severa). 5) Hialinos de Mallory (0) - (1) - (2). 6) Cel. PAS-D Kupffer (0) - (1) - (2) - (3). 7) Núcleos Glicogenados (0) - (1) - (2) - (3). 8) Lipogranulomas (local da presença) (ausente)- (raros)- (Ocasionais)- (severa). 9) Ferro intra-hepatocitário (0) - (1) - (2) - (3) - (4). 10) Corpos Acidófilos (0) - (1) - (2) - (3) - (4), com inf. intra-acinar.

APÊNDICE B

Quadro 5: Análise descritiva dos resultados bioquímicos dos grupos de tratamentos profiláticos.

GLICOSE								
Grupos	Glicose	Erro Padrão	Quartil_1	Quartil_3	Mínimo	Máximo	N ^o	(ICM)
GM1	118,12	1,16	115,80	120,85	115,60	121,30	5	(114,90; 121,34)
GM2	222,43	17,51	187,75	270,88	180,40	282,20	6	(177,43; 267,44)
GM5	280,64	13,09	261,15	306,25	258,70	330,70	5	(244,29; 316,99)
GM6	286,04	19,94	246,45	328,20	227,60	344,40	5	(230,68; 341,40)
GM9	274,94	13,91	245,80	300,45	227,60	309,30	5	(236,31; 313,57)
GM10	247,35	9,38	231,33	260,38	217,30	286,70	6	(223,23; 271,47)
HbA1c								
Grupos	HbA1c	Erro Padrão	Quartil_1	Quartil_3	Mínimo	Máximo	n	(ICM)
GM1	4,53	0,06	4,45	4,63	4,30	4,70	6	(4,3900; 4,6767)
GM2	4,83	0,27	4,38	5,25	4,00	6,00	6	(4,1351; 5,5316)
GM5	5,75	0,15	5,43	6,05	5,20	6,20	6	(5,3702; 6,1298)
GM6	5,22	0,10	4,90	5,43	4,90	5,50	6	(4,9477; 5,4856)
GM9	4,56	0,12	4,35	4,80	4,20	4,90	5	(4,2362; 4,8838)
GM10	5,00	0,06	4,88	5,13	4,80	5,20	6	(4,8516; 5,1484)
COLESTEROL								
Grupos	Colesterol	Erro Padrão	Quartil_1	Quartil_3	Mínimo	Máximo	n	(ICM)
GM1	61,24	3,89	53,10	70,35	52,60	70,80	5	(50,43; 72,05)
GM2	145,60	10,63	128,68	162,93	104,30	183,70	6	(118,27; 172,93)
GM5	140,68	11,90	119,35	162,68	87,10	165,60	6	(110,09; 171,28)
GM6	151,20	4,64	143,50	162,25	143,50	165,60	5	(138,32; 164,08)
GM9	117,32	7,73	103,35	135,40	98,60	139,70	5	(95,87; 138,77)
GM10	121,03	4,22	113,60	133,48	110,00	134,90	6	(110,18; 131,88)
TRIGLICERÍDEOS								
Grupos	Triglicerídeos	Erro Padrão	Quartil_1	Quartil_3	Mínimo	Máximo	n	(ICM)
GM1	50,0	4,73	42,50	60,00	40	67	5	(36,86; 63,14)
GM2	39,67	3,57	33,75	49,75	30	52	6	(30,50; 48,83)
GM5	46,50	4,89	32,35	55,25	30	59	6	(33,932; 59,07)
GM6	49,00	1,05	47,00	51,50	47	52	5	(46,09; 51,91)
GM9	83,40	7,44	69,50	100,00	67	108	5	(62,74; 104,02)
GM10	85,30	18,70	55,80	108,30	52	175	6	(37,33; 133,34)
TGP Ou ALT								
Grupos	TGP	Erro Padrão	Quartil_1	Quartil_3	Mínimo	Máximo	n	(ICM)
GM1	27,20	3,37	20,50	34,00	18,00	38,00	5	(17,85; 36,55)
GM2	11,60	2,42	8,00	16,00	8,00	21,00	5	(4,88; 18,32)
GM5	12,17	2,87	5,00	20,25	5,00	21,00	6	(4,79; 19,54)
GM6	22,25	4,13	14,75	30,50	14,00	32,00	4	(9,10; 35,40)
GM9	29,80	5,44	17,00	39,50	13,00	41,00	5	(14,71; 44,89)
GM10	20,17	4,98	5,00	30,00	5,00	33,00	6	(7,36; 32,97)

TGO ou AST								
Grupos	TGO	Erro Padrão	Quartil_1	Quartil_3	Mínimo	Máximo	n	(ICM)
GM1	38,83	7,08	25,54	52,12	17,02	60,80	5	(19,17; 58,48)
GM2	47,04	7,02	34,36	60,71	21,48	71,45	6	(28,99; 65,10)
GM5	38,92	7,27	24,15	55,96	10,09	56,85	6	(20,23; 57,43)
GM6	45,09	12,26	20,29	65,76	15,68	66,214	4	(6,08; 84,10)
ESTÁ	32,58	11,75	7,88	59,89	4,54	61,33	5	(4,54; 65,23)
GM10	32,64	7,43	15,92	54,67	14,97	55,65	6	(13,54; 51,74)

ICM: Intervalo de Confiança da Média

Quadro 6: Análise descritiva dos resultados bioquímicos dos grupos de tratamentos curativos.

GLICOSE								
Grupos	Glicose	Erro Padrão	Quartil_1	Quartil_3	Mínimo	Máximo	N ^o	(ICM)
GM1	118,12	1,16	115,80	120,85	115,60	121,30	5	(114,90; 121,34)
GM2	222,43	17,51	187,75	270,88	180,40	282,20	6	(177,43; 267,44)
GM3	243,55	14,33	206,13	275,03	192,40	278,70	6	(206,71; 280,39)
GM4	245,85	13,96	219,70	285,70	203,20	289,90	6	(209,96; 281,74)
GM7	181,17	12,87	157,58	200,28	146,40	237,10	6	(148,08; 214,25)
GM8	211,83	10,92	193,13	235,08	181,80	256,90	6	(183,77; 239,90)
HbA1c.								
Grupos	HB1C	Erro Padrão	Quartil_1	Quartil_3	Mínimo	Máximo	n	(ICM)
GM1	4,53	0,06	4,45	4,63	4,30	4,70	6	(4,3900; 4,6767)
GM2	4,83	0,27	4,38	5,25	4,00	6,00	6	(4,1351; 5,5316)
GM3	4,70	0,06	4,58	4,83	4,50	4,90	6	(4,5516; 4,8484)
GM4	4,78	0,12	4,60	5,03	4,30	5,10	6	(4,4834; 5,0832)
GM7	4,87	0,06	4,70	5,00	4,70	5,00	6	(4,7233; 5,0100)
GM8	4,82	0,03	4,78	4,90	4,70	4,90	6	(4,7377; 4,8957)
COLESTEROL								
Grupos	Colesterol	Erro Padrão	Quartil_1	Quartil_3	Mínimo	Máximo	n	(ICM)
GM1	61,24	3,89	53,10	70,35	52,60	70,80	5	(50,43; 72,05)
GM2	145,60	10,63	128,68	162,93	104,30	183,70	6	(118,27; 172,93)
GM3	69,87	8,38	52,85	83,03	33,50	90,90	6	(48,32; 91,41)
GM4	124,83	6,52	111,65	134,85	98,30	145,20	6	(108,07; 141,59)
GM7	92,97	5,97	82,78	102,05	77,00	119,60	6	(77,63; 108,30)
GM8	88,75	4,61	82,15	97,48	70,30	104,30	6	(76,90; 100,59)
TRIGLICERÍDEOS								
Grupos	Triglicerídeos	Erro Padrão	Quartil_1	Quartil_3	Mínimo	Máximo	n	(ICM)
GM1	50,00	4,73	42,50	60,00	40	67	5	(36,86; 63,14)
GM2	39,67	3,57	33,75	49,75	30	52	6	(30,50; 48,83)
GM3	59,33	5,73	49,50	70,50	45	84	6	(44,62; 74,05)

GM4	59,83	5,42	48,50	71,75	41	77	6	(45,90; 73,76)
GM7	57,50	4,93	49,75	67,75	46	79	6	(44,82; 70,18)
GM8	57,17	3,75	47,50	67,25	46	68	6	(47,52; 66,82)
TGP= ALT								
Grupos	TGP	Erro Padrão	Quartil_1	Quartil_3	Mínimo	Máximo	n	(ICM)
GM1	27,20	3,37	20,50	34,00	18,00	38,00	5	(17,85; 36,55)
GM2	11,60	2,42	8,00	16,00	8,00	21,00	5	(4,88; 18,32)
GM3	19,50	3,93	11,50	30,25	7,00	31,00	6	(9,40; 29,60)
GM4	9,50	0,56	8,75	10,50	8,00	12,00	6	(8,05; 10,95)
GM7	22,00	7,64	11,25	32,00	9,00	59,00	6	(2,36; 41,64)
GM8	26,00	7,03	10,75	38,25	10,00	54,00	6	(7,92; 44,08)

TGO								
Grupos	TGO	Erro Padrão	Quartil_1	Quartil_3	Mínimo	Máximo	n	(ICM)
GM1	38,83	7,08	25,54	52,12	17,02	60,80	5	(19,17; 58,48)
GM2	47,04	7,02	34,36	60,71	21,48	71,45	6	(28,99; 65,10)
GM3	12,27	6,43	4,30	17,50	2,75	44,17	6	(2,75; 28,81)
GM4	43,92	4,14	36,96	54,13	27,63	55,66	6	(33,27; 54,56)
GM7	22,53	5,69	12,60	37,82	1,95	38,21	6	(7,91; 37,16)
GM8	29,94	5,42	19,47	42,39	10,56	43,77	6	(16,02; 43,86)

ICM: Intervalo de Confiança da Média

Efeito do chá de uxi (*Endopleura uchi*) na esteatose hepática

Effect of Uxi (Endopleura uchi) tea in hepatic steatosis

Natasha Valois Castelo Branco¹, Helber Freitas Alagia¹, Francisco Marcelo Saraiva Luna¹, Diego Miléo de Oliveira Freitas¹, Fernando César Façanha Fonseca², Francisca das Chagas do Amaral Souza³, Denise Moraes Lopes Galeno¹, Rosany Piccolotto Carvalho¹

Recebido da Universidade Federal do Amazonas.

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar o efeito da *Endopleura uchi* na esteatose hepática não alcoólica em ratos obesos. **MÉTODOS:** Foi realizada a indução da dislipidemia por meio do tratamento com ração à base de banha de porco. Foram utilizados 12 ratos machos pesando, em média, 250g. Esses animais foram divididos em dois grupos, com seis animais cada, formando o Grupo Controle e o Grupo Uxi, tratado com *Endopleura uchi*. Foram analisados ganho de massa corporal, consumo de ração, concentração plasmática de colesterol, triglicérides, HDL-c, LDL-c, VLDL, glicose, TGO e TGP. **RESULTADOS:** Os grupos que consumiram o chá de uxi tiveram redução significativa no ganho de massa corporal (75,9%), bem como na esteatose macro e microvesicular, sendo observada diminuição de 50% do grau da esteatose do grupo que ingeriu o chá de uxi. Além disso, nossos resultados também apresentaram redução da balonização hepatocelular e do infiltrado inflamatório, além do grau de fibrose presente em alguns casos. **CONCLUSÃO:** O chá de *Endopleura uchi* não alterou significativamente as concentrações das aminotransferases, mas reduziu significativamente os parâmetros histológicos relacionados à esteatose não alcoólica, além de redução no colesterol total, LDL.

Descritores: Obesidade/complicações; Fígado gorduroso; Medicina herbária; Fitoterapia

ABSTRACT

OBJECTIVE: To evaluate the effect of "Endopleura uchi" in nonalcoholic hepatic steatosis in obese mice. **METHODS:** The induction of dyslipidemia was performed through treatment with a pork lard-based diet. Twelve male rats weighing 250 g on average were used. These animals were divided into 2 groups of 6 animals each, forming the Control Group and the Uxi group, treated with *Endopleura uchi*. The body mass gain, feed intake, plasma concentration of cholesterol, triglycerides, HDL-C, LDL-C, VLDL, glucose, AST, and GTP were analyzed. **RESULTS:** The groups using Uxi tea had a significant reduction in body mass gain (75.9%), and a reduction in macro- and microvesicular steatosis, with a 50% reduction in the degree of steatosis being observed in the group that ingested Uxi tea. Furthermore, our results also showed a reduction in hepatocellular ballooning and inflammatory infiltrate, and in the degree of fibrosis present in some cases. **CONCLUSION:** The tea "Endopleura uchi" did not significantly alter the concentrations of aminotransferases; but it reduced the histological parameters related to nonalcoholic steatosis significantly, and reduced total cholesterol, LDL.

Keywords: Obesity/complications; Fatty liver; Herbal Medicine; Phytotherapy

INTRODUÇÃO

A obesidade é o maior problema de saúde da atualidade e atinge indivíduos de todas as classes sociais, tem etiologia hereditária e induz a um estado de má nutrição, em decorrência de um distúrbio no balanceamento dos nutrientes, ocasionado, entre outros fatores, pelo excesso alimentar. O peso excessivo causa problemas psicológicos, frustrações e infelicidade, além de gama enorme de doenças lesivas. Esse problema também acomete crianças.

A obesidade tem representado, nas últimas décadas, um grande problema de saúde pública, sendo considerada uma epidemia global pela Organização Mundial da Saúde e o principal fator de risco para a obesidade na idade adulta. Nos últimos 10 anos, essa doença tem crescido em torno de 10 a 40% na maioria dos países europeus. No Brasil, acomete cerca de 30% das crianças, principalmente em famílias de média e alta renda.⁽¹⁾

A obesidade está frequentemente associada com alterações morfológicas hepáticas, como esteatose, esteato-hepatite, fibrose e cirrose. A esteatose, ou fígado gorduroso, é a mais comum delas,

1. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

2. Fundação Hospital Adriano Jorge, Manaus, AM, Brasil.

3. Laboratório de Alimentos e Nutrição, Coordenação Sociedade Ambiente e Saúde, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brasil.

Data de submissão: 25/09/2013 – Data de aceite: 03/10/2013

Conflito de interesses: não há.

Fontes de fomento: não há.


Endereço para correspondência:

Natasha Valois Castelo Branco
Universidade Federal do Amazonas
Avenida Rodrigo Otávio, 3.000 – Coroado
CEP: 69077-000 – Manaus, AM, Brasil
Telefone: (92) 8126-2910 – E-mail: natasha_valois@hotmail.com

© Sociedade Brasileira de Clínica Médica

APÊNDICE D

14/10/2019 ScholarOne Manuscripts

 **Acta Amazonica**

[Home](#)

[Author](#)

Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to
Acta Amazonica

Manuscript ID
AA-2019-0385

Title
Use of *Endopleura uchi* (Huber) *Cuatrec* tea to preclude induced obesity through an experimental model.

Authors
Paschoalino, Mylla
Fonseca, Fernando
da Silva, Gustavo
Carneiro, Matheus
Acho, Leonard
Carvalho, Rosany
Muniz, Magno
Nunomura, Sergio
Nakajima, Gerson
Lima, Emerson

Date Submitted
14-Oct-2019

[Author Dashboard](#)

<https://mc04.manuscriptcentral.com/aa-scielo> 1/2