



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

RENAN PEREIRA DE LIMA

**EFEITO PREVENTIVO DOS TRITERPENOS α , β -AMIRINA NA DOENÇA
HEPÁTICA GORDUROSA NÃO-ALCOÓLICA INDUZIDA POR DIETA
EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2019

RENAN PEREIRA DE LIMA

EFEITO PREVENTIVO DOS TRITERPENOS α , β -AMIRINA NA DOENÇA HEPÁTICA
GORDUROSA NÃO-ALCOÓLICA INDUZIDA POR DIETA EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Farmacologia.

Área de Contracção: Farmacologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Flávia Almeida Santos.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L71e Lima, Renan Pereira de.
Efeito preventivo dos triterpenos α , β -amirina na doença hepática gordurosa não-alcoólica induzida por dieta em camundongos / Renan Pereira de Lima. – 2019.
109 f : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Flavia Almeida Santos.
1. Fígado. 2. Amirina. 3. Protium Heptaphyllum. 4. Dieta Hiperlipídica. I. Título.

CDD 615.1

RENAN PEREIRA DE LIMA

EFEITO PREVENTIVO DOS TRITERPENOS α , β -AMIRINA NA DOENÇA HEPÁTICA
GORDUROSA NÃO-ALCOÓLICA INDUZIDA POR DIETA EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Área de Contracção: Farmacologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Flávia Almeida Santos.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Flavia Almeida Santos (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof^a Dr^a Arlandia Cristina Lima Nobre de Moraes
Universidade de Fortaleza

Prof Dr Tiago Sousa de Melo
Centro Universitário INTA

*A Deus, o Cristo ontem e hoje, princípio e fim.
Aos meus pais, em especial minha mãe, pelo
apoio, compreensão e por não ter medido
esforços para proporcionar a melhor educação
que podia oferecer.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, a fonte inesgotável de amor e água que brota da fonte da Vida, necessário para conclusão deste trabalho. À **Virgem Maria**, minha querida mãe, um sustentáculo grande para mim.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a **Flavia Almeida Santos**, por ter me acolhido em seu laboratório e por ter contribuído para a minha formação durante esse mestrado. Obrigado por compartilhar suas experiências e conhecimentos.

Aos meus pais **Raimundo Nonato** e **Maria Valdenisa** por sempre acreditarem nas minhas escolhas. As minhas conquistas também são de vocês! Agradeço também à minha irmã **Renata Lima**, pelo amor incondicional. Muito obrigado.

A Prof^a Dr^a **Diana Valesca Carvalho**, que sempre acreditou em mim, pela confiança que depositou em mim durante todos esses anos, desde o período de iniciação científica. Por ser uma pessoa tão capacitada, humilde, inteligente e sempre disposta a ajudar.

As professoras Dr^a **Arlandia Cristina Lima Nobre de Moraes** e Dr^a **Maria Angelina da Silva Medeiros**, por serem pessoas tão maravilhosas, por terem me ajudado tanto durante minha graduação, pelos aprendizados e por me tornar uma pessoa melhor.

Aos professores participantes da banca examinadora de qualificação e defesa, Prof Dr **Roberto César Pereira Lima Júnior**, Dr^a **Raquel Carvalho Montenegro**, Dr^a **Ana Paula Negreiros Nunes Alves** e Dr. **Tiago Sousa de Melo**, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Produtos Naturais (LPN), levarei todos no coração. Muito obrigado à **Aguinéa Rocha, Amanda Braga, Ana Virgínia, Gabrielle de Paula, Greyce Luri, Rose Anny, Thais Moreira, Lana Andrade, Raíssa Duarte** e em especial três grandes amigos, **Paulo Iury Nunes** a pessoa mais erudita que eu conheço, estarei sempre torcendo por você, **Ana Flavia Seraine** e **Tuely Bandeira** pessoas de coração enorme. Obrigado a todos pelo suporte e paciência nessa caminhada, por toda ajuda e por toda dedicação.

Aos colegas e amigos de pós-graduação em Farmacologia (turma 2018.1), pelos momentos de convivência e cooperação, em especial, **Ingridy Medeiros, Raica, Dayara de Oliveira e Mauricio Sales**.

Aos amigos de graduação, que estiveram comigo me apoiando durante todo esse período e sempre acreditaram em mim. Muito obrigado à **Rosana Carneiro, Maria Clara Cavalcante, Ana Sheila Queiroz, Wendell Barbosa e Hugo Arnaud**.

Aos amigos e familiares, em especial **Maria Ferreira, Lailson Lima, Lea Soares, Daniela Pereira e Leno Roberto**, pela companhia cotidiana, amizade e pelos momentos de descontração e, sem vocês a caminhada teria se tornado muito mais difícil.

A patologista Dra. **Ana Paula Negreiros**, pela parceria e conhecimentos compartilhados ao longo desta pesquisa.

Aos técnicos **Débora Cavalcante e Delmar**, sempre solícitos em ajudar no processamento dos cortes histológicos.

Aos professores e demais funcionários do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

Aos órgãos de fomento à pesquisa **CNPq**, **CAPES** e **FUNCAP** pelo apoio financeiro.

Muito obrigado!

*“Maravilhas fez conosco o Senhor,
exultemos de alegria”*

(Salmo 125).

RESUMO

EFEITO PREVENTIVO DOS TRITERPENOS α , β -AMIRINA NA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO-ALCOÓLICA INDUZIDA POR DIETA EM CAMUNDONGOS

A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é uma condição clínica-patológica definida pelo acúmulo anormal de triglicerídeos nos hepatócitos, comumente chamada de esteatose hepática (EH). Atualmente, apenas a pioglitazona, um agente de sensibilização à insulina, e a vitamina E como antioxidante são recomendadas para o tratamento da esteatose hepática não-alcoólica de acordo com diretrizes internacionais. Na busca de novas opções terapêuticas para o tratamento da DHGNA, os compostos triterpênicos isolados de plantas medicinais estão sendo investigados quanto ao seu potencial para o tratamento da DHGNA. O presente estudo investigou o efeito da mistura de triterpenos α , β -amirina (AMI), isolada de *Protium heptaphyllum*, na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) induzida por dieta hiperlipídica (DH) em camundongos, uma vez que estudos anteriores com AMI realizados por nosso laboratório mostraram que a AMI é capaz de melhorar a resistência à insulina e restaurar a histologia hepática em modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DH). Os camundongos foram divididos em 5 grupos e alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) e tratados simultaneamente com AMI (10 e 20 mg/Kg) e fenofibrato (FEN) 50 mg/Kg na água de beber durante 15 semanas. Os animais tratados com AMI 10 e 20mg/kg e FEN 50mg/kg demonstraram redução significativa do peso corporal, da gordura abdominal, subcutânea, subescapular, assim como no peso do fígado e dos níveis plasmáticos de glicose, insulina, ALT, AST, colesterol total, LDL, VLDL e triglicerídeos em relação ao grupo DH. AMI (10 e 20 mg/Kg) e FEN (50mg/Kg) foram capazes de reduzir significativamente os níveis hepáticos de lipídios (colesterol total e triglicerídeos) em relação ao grupo DH. Os camundongos alimentados com a DH apresentaram um padrão hiperglicêmico durante o teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGI) e redução da tolerância à insulina no teste de tolerância à insulina intraperitoneal (TTII) em relação ao grupo DP, em contrapartida, o tratamento com o triterpeno foi capaz de melhorar a tolerância à glicose e à insulina em relação ao grupo DH. Além de melhorar a resistência à insulina, AMI reduziu a concentração hepática de malondialdeído e aumentou a concentração hepática da glutathiona reduzida (GSH) em relação ao grupo DH. AMI reduziu o acúmulo de lipídios neutros no fígado evidenciado pela coloração com *Oil red O* quando comparado

com o grupo DH. O tratamento com a AMI (10 e 20 mg/Kg) e FEN (50 mg/Kg) reduziram significativamente a expressão das proteínas SREBP1 e FAS e aumentou significativamente a expressão das proteínas PPAR α e pAMPK no fígado, concomitante, diminuiu a expressão dos genes ACC1, FAS e CD36 no tecido hepático. AMI nas concentrações (3,1 - 400 μ g/mL) não promoveu alterações na viabilidade celular de células HepG2, em ensaio com MTT. Em protocolo de esteatose hepática induzida por ácido oleico (AO), AMI nas concentrações de 12,5; 25 e 50 μ g/mL reduziu o acúmulo de lipídios quando comparado com o grupo que foi induzido apenas com AO, observados pela coloração com *Oil red O*. Os resultados demonstram potencial efeito hepatoprotetor da AMI, elencando-o como um possível produto para a prevenção da DHGNA. Os resultados encontrados, sugerem que o efeito do triterpeno está associado à redução da lipotoxicidade e resistência à insulina evitando assim, a progressão da DHGNA.

Palavras-chave: Fígado. Amirina. *Protium heptaphyllum*. Dieta hiperlipídica

ABSTRACT

PREVENTIVE EFFECT OF α , β -AMYRINE TRITERPENES ON NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE INDUCED BY DIET IN MICE

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a clinical-pathological condition defined by the abnormal accumulation of triglycerides in hepatocytes, commonly called hepatic steatosis (HS). Currently, only pioglitazone, an insulin sensitizing agent, and vitamin E as an antioxidant are recommended for the treatment of non-alcoholic hepatic steatosis by international guidelines. In the search for new therapeutic options for the treatment of NAFLD, triterpenic compounds isolated from medicinal plants are being investigated for their potential for the treatment of NAFLD. The present study investigated the effect of the mixture of α , β -amyrin (AMY) triterpenes isolated from *Protium heptaphyllum* in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) induced by hyperlipidic diet (DH) in mice. The mice were divided into 5 groups and fed a standard diet (DP) or hyperlipidic diet (DH) and treated simultaneously with AMY (10 and 20 mg / kg) and fenofibrate (FEN) 50 mg/kg in drinking water for 15 weeks. Animals treated with AMY 10 and 20mg / kg and FEN 50mg / kg showed a significant reduction in body weight, abdominal fat, subcutaneous fat, subscapular weight, as well as liver weight and plasma levels of glucose, ALT, AST, cholesterol total, LDL, VLDL and triglycerides in relation to the DH group. AMY (10 and 20 mg / kg) and FEN (50 mg / kg) were able to significantly reduce hepatic lipid levels (total cholesterol and triglycerides) in relation to the DH group. Mice fed with DH presented a hyperglycemic pattern during the intraperitoneal glucose tolerance test (TTGI) and reduced insulin tolerance in the intraperitoneal insulin tolerance test (TTII), compared to the DP group. Triterpene was able to improve glucose and insulin tolerance in relation to the DH group. In addition to improving insulin resistance, AMY reduced the hepatic concentration of malondialdehyde and increased the hepatic concentration of reduced glutathione (GSH) compared to the DH group. AMY reduced the accumulation of neutral lipids in the liver evidenced by *oil red O* coloration when compared to the DH group. Treatment with AMY (10 and 20 mg / kg) and FEN (50 mg / kg) significantly reduced the expression of SREBP1 and FAS proteins and significantly increased the expression of PPAR α and pAMPK proteins in the liver, concomitantly decreased gene expression ACC1, FAS and CD36 in hepatic tissue. AMY at concentrations of 3.1 – 400 μ g / mL did not promote changes in cell viability of HepG2

cells in the MTT assay. In protocol of hepatic steatosis induced by oleic acid (AO), AMY at the concentrations of 12.5, 25 and 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ reduced lipid accumulation when compared to the group that was induced only with AO, observed by *oil red O* staining. The results demonstrate potential hepatoprotective effect of AMY, listing it as a possible product for prevention of NALFD. The results suggest that the effect of triterpene is associated with the reduction of lipotoxicity and insulin resistance, thus preventing the progression of NAFLD.

Keywords: Liver. Amyrin. *Protium heptaphyllum*. Hyperlipidic diet.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1. | Mecanismo de acúmulo de gordura no fígado. | 27 |
| Figura 2. | Fotografia da espécie <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) | 35 |
| Figura 3. | Resina extraída da <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) | 36 |
| Figura 4. | Estrutura química dos constituintes triterpênicos da resina de <i>P. heptaphyllum</i> | 36 |
| Figura 5. | Representação esquemática do delineamento experimental..... | 44 |
| Figura 6 | Efeito da α , β amirina sobre a viabilidade de células HepG2..... | 52 |
| Figura 7 | Efeito de α , β -amirina sobre o acúmulo de lipídeos em células HepG2 submetidas à coloração com <i>Oil Red O</i> | 53 |
| Figura 8 | Efeito de α , β -amirina sobre o acúmulo de lipídeos em células HepG2 submetidas à coloração com <i>Oil Red O</i> | 54 |
| Figura 9 | Evolução do peso corporal na doença hepática gordurosa não-alcoolica induzida por dieta hiperlipídica..... | 56 |
| Figura 10 | Efeito da α , β - amirina sobre os níveis hepáticos de triglicerídeos, colesterol total e glicogênio na doença hepática gordurosa não-alcoolica induzida por dieta hiperlipídica..... | 62 |
| Figura 11 | Efeito da α , β - amirina sobre a tolerância à glicose na doença hepática gordurosa não-alcoolica induzida por dieta em camundongos..... | 63 |
| Figura 12. | Efeito da α , β -amirina sobre a tolerância à insulina na doença hepática gordurosa não-alcoolica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos..... | 64 |
| Figura 13. | Efeito da α , β -amirina sobre os níveis de MDA e GSH na doença hepática gordurosa não-alcoolica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos..... | 66 |
| Figura 14. | Imagem do fígado <i>in situ</i> | 67 |

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 15. | Fotomicrografia representativa do fígado de animais submetidos a doença hepática gordurosa não-alcoolica em camundongos | 68 |
| Figura 16. | Fotomicrografia representativa do fígado de animais submetidos a coloração com <i>Oil red O</i> | 70 |
| Figura 17. | Efeito da α , β -amirina sobre a expressões da proteína hepática de AMPK α e da sua forma fosforilada na doença hepática gordurosa não-alcoolica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos..... | 72 |
| Figura 18 | Efeito da α , β -amirina sobre a expressões da proteína hepática de SREBP1-c e PPAR α na doença hepática gordurosa não-alcoolica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos..... | 73 |
| Figura 19 | Efeito da α , β -amirina sobre a expressões da proteína hepática de FAS na doença hepática gordurosa não-alcoolica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos..... | 74 |
| Figura 20 | Efeito da mistura de α , β amirina sobre a expressão relativa do gene de ACC1, CD36 e FAS na doença hepática gordurosa não-alcoolica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos..... | 76 |
| Figura 21 | Esquema representativo dos possíveis mecanismos de ação da α , β -amirina no efeito preventivo da DHGNA..... | 93 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1. | Composição centesimal da dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DH) | 44 |
| Tabela 2. | Sequência gênica e temperatura de anelamento dos <i>primers</i> utilizados..... | 51 |
| Tabela 3. | Efeito da α , β -amirina no peso corporal, medidas murinométricas, consumo de ração, consumo de água na doença hepática gordurosa não-alcoolica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos..... | 57 |
| Tabela 4. | Efeito da α , β -amirina no peso do fígado e da gordura visceral, subescapular e subcutânea na doença hepática gordurosa não-alcoolica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos..... | 59 |
| Tabela 5. | Efeito da α , β -amirina sob parâmetros plasmáticos na doença hepática gordurosa não-alcoolica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.... | 61 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------|--|
| ACC1 | Acetil Coenzima A |
| AGL | Ácidos Graxos Livres |
| ALT | Alanina aminotransferase |
| AMI | α , β -amirina |
| AMPK | Proteína quinase ativada por AMP |
| ANOVA | Análise de variância |
| AO | Ácido oleico |
| AST | Aspartato aminotransferase |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| AUC | Área sob a curva |
| CPT1 | Carnitinal palmitoil transferase 1 |
| CREBPs | Proteína de ligação a elementos responsivos a carboidratos |
| DH | Dieta hiperlipídica |
| DHGNA | Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica |
| DM2 | Diabetes <i>mellitus</i> 2 |
| DMEN | <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DP | Dieta padrão |
| EH | Esteatose hepática |
| ERO | Espécies reativas de oxigênio |
| FAS | Sintase de ácido graxos |
| FATP2 | Proteína de ligação a ácido graxo 2 |
| FEN | Fenofibrato |
| GLUT | Transportador de glicose |
| GSH | Glutathiona reduzida |
| HDL | Lipoproteína de alta densidade |
| IL | Interleucina |
| TNF α | Fator de necrose tumoral α |
| IRS | Substrato do receptor de insulina |
| JNK | c-jun N-terminal kinase |

| | |
|--------|--|
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| LDN | Lipogênese <i>de novo</i> |
| LPL | Lipoproteína lipase |
| LXR | Receptor X do fígado |
| MCP-1 | Proteína quimiotática de monócitos-1 |
| MDA | Malondialdeído |
| MTT | 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometde tetrazólio |
| NASH | Esteatohepatite não-alcoolica |
| PBS | Tampão fosfato salina |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PMSF | Fluoreto de fenilmetilsulfonila |
| PPAR | Receptor ativado por proliferador de peroxissoma |
| PPREs | Elementos responsivos específicos |
| RI | Resistência à insulina |
| RT | Tranciptase reversa |
| SCD1 | estearoil-CoA dessaturase-1 |
| SREBP1 | Proteína ligadora do elemento regulado por esteróis 1 |
| TG | Triglicerídeos |
| TTGII | Teste de Tolerância a Glicose Intraperitoneal |
| TTII | Teste de Tolerância a Insulina Intraperitoneal |
| VLDL | Lipoproteína de muita baixa densidade |
| UCP1 | Proteína desacopladora 1 |
| WB | Western blot |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 1.1. Doença hepática gordurosa não-alcoolica..... | 19 |
| 1.2. Fisiopatologia..... | 20 |
| 1.3. Diagnóstico..... | 30 |
| 1.4. Tratamento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)..... | 31 |
| 1.5. Terpenos e seu potencial sobre a DHGNA..... | 33 |
| 1.5.1. Mistura de triterpenos pentacíclicos alfa e beta-amirina..... | 34 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 38 |
| 3. OBJETIVOS..... | 39 |
| 3.1. Objetivo geral..... | 39 |
| 3.2. Objetivos específicos..... | 39 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 40 |
| 4.1. Reagentes Utilizados..... | 40 |
| 4.2. Obtenção da mistura de α , β -amirina..... | 41 |
| 4.3. Cultura de células..... | 41 |
| 4.3.1. Conjugação do ácido oleico (AO)..... | 42 |
| 4.3.2. Ensaio de viabilidade celular pelo teste do MTT..... | 42 |
| 4.3.3. Protocolo de esteatose hepática induzida por AO e coloração com <i>Oil Red O</i> | 42 |
| 4.4. Animais..... | 43 |
| 4.5. Composição da dieta hiperlipídica (DH)..... | 43 |
| 4.6. Protocolo experimental..... | 44 |
| 4.7. Análises murinométricas e eficiência alimentar..... | 45 |
| 4.8. Análises plasmáticas séricas..... | 45 |
| 4.9. Avaliação dos níveis hepáticos de lipídios totais..... | 46 |
| 4.10. Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal (TTGI) e Teste de Tolerância à Insulina Intraperitoneal (TTII)..... | 46 |
| 4.11. Avaliação dos marcadores do estresse oxidativo..... | 46 |
| 4.11.1. Malondialdeído (MDA)..... | 46 |
| 4.11.2. Glutathiona reduzida (GSH)..... | 47 |
| 4.12. Determinação de glicogênio hepático..... | 47 |
| 4.13. Análise histológica hepática..... | 48 |
| 4.14. Coloração do tecido hepático por <i>Oil red O</i> | 48 |
| 4.15. Expressão proteica hepática de AMPK, SREBP-1, PPAR α e FAS..... | 48 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.16. | Expressão do RNAm de FAS, ACC1 e CD36 no tecido hepático | 50 |
| 4.17. | Analises Estatísticas..... | 51 |
| 5. | RESULTADOS..... | 52 |
| 5.1. | Avaliação do efeito da α , β amirina sobre a esteatose hepática induzida por ácido oleico <i>in vitro</i> | 52 |
| 5.1.1. | Efeito da α , β amirina na viabilidade celular em ensaio com MTT | 52 |
| 5.1.2. | Efeito da α , β -amirina sobre a esteatose hepática induzida por ácido oleico <i>in vitro</i> coradas com <i>Oil Red O</i> | 52 |
| 5.2. | Efeito da α , β -amirina (AMI) no peso corporal, medidas murinométricas, eficiência alimentar e consumo de ração e água..... | 55 |
| 5.3. | Efeito da α , β -amirina (AMI) no peso do fígado e da gordura visceral, subescapular e subcutânea..... | 58 |
| 5.4. | Efeito da α , β -amirina (AMI) nos parâmetros bioquímicos plasmáticos | 60 |
| 5.5. | Efeito da α , β -amirina (AMI) nos parâmetros hepáticos. | 62 |
| 5.6. | Efeito da α , β -amirina (AMI) sobre a tolerância à glicose e à insulina | 63 |
| 5.7. | Efeito da α , β -amirina (AMI) sobre os níveis hepáticos de malondialdeído (MDA) e glutatona reduzida (GSH)..... | 65 |
| 5.8. | Efeito da α , β -amirina (AMI) sobre alterações histológicas hepática | 67 |
| 5.8.1. | Efeito da α , β -amirina sobre o acúmulo de lipídeos neutros em fígado crio preservado e submetido à coloração com <i>Oil Red O</i> | 69 |
| 5.9. | Análise do efeito da α , β -amirina sobre a expressão proteica hepática de AMPK α , pAMPK, SREBP1, PPAR α e FAS..... | 71 |
| 5.10. | Efeito da α , β -amirina na expressão relativa do RNAm de CD36, FAS e ACC1 | 75 |
| 6. | DISCUSSÃO..... | 77 |
| 7. | CONCLUSÕES | 92 |
| 8. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 94 |
| | ANEXO I..... | 106 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença hepática gordurosa não-alcoólica

A Doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é uma condição clínica-patológica definida pelo acúmulo anormal de triglicerídeos nos hepatócitos, comumente chamada de esteatose hepática (EH), sendo definida como o acúmulo de gordura hepática ($\geq 5\%$ do fígado) determinada por imagiologia ou histologia após a exclusão de outras causas de esteatose hepática, tal como hepatite viral, consumo significativo de álcool, uso de medicação esteatogênica ou doenças hereditárias (LONARDO *et al.*, 2017.)

A DHGNA é subdividida em i) esteatose hepática não alcoólica (EHNA), caracterizada pela presença de $\geq 5\%$ EH, sem evidência de lesão hepatocelular, sendo possível a forma de balão nos hepatócitos ou evidência de fibrose, sendo mínimo o risco de progressão para cirrose e insuficiência hepática e, ii) esteatohepatite não alcoólica (NASH), caracterizada pela presença de $\geq 5\%$ EH com inflamação e balonização nos hepatócitos com ou sem fibrose, podendo evoluir para cirrose, insuficiência hepática e raramente câncer de fígado (BENEDICT; ZHANG, 2017).

A maioria dos pacientes com DHGNA em todo o mundo apresentam comorbidade metabólicas, sugerindo que esta associação é bidirecional. Em uma recente meta-análise de pacientes com diabetes, a prevalência da DHGNA foi 57,8% enquanto que a prevalência de NASH foi de 65,3% e a prevalência de fibrose avançada foi de 15,1%. Em adição, a maioria dos pacientes com obesidade mórbida submetidos a cirurgia bariátrica tinham DHGNA, desses, 20-30% tinham NASH, e 10% fibrose avançada (GOLABI *et al.*, 2017; YOUNOSSI, 2018).

A prevalência mundial da DHGNA é de 20% a 30% na população em geral, e sua incidência é de aproximadamente 20 a 30 por 1.000 pessoas-ano (CHALASANI *et al.*, 2017; KWAK; KIM, 2017), tendo como fatores de risco a velhice, o diabetes, a dislipidemia, a obesidade e a síndrome metabólica (CHALASANI 2012; DELLA PEPA *et al.*, 2017).

Em uma revisão realizada por Chalasani (2017) com 11.448 indivíduos da Coreia do Sul por 5 anos, a incidência de DHGNA documentada por ultrassom foi de 12% ($n = 1.418$), já em um estudo realizado durante 11 anos com 635 sobreviventes das bombas atômicas de Nagasaki, a incidência de DHGNA foi de 19,9 por 1000 pessoa/ano (TSUNETO *et al.*, 2010).

No Brasil, foi realizado um estudo multicêntrico pela Sociedade Brasileira de Hepatologia, incluindo 1280 casos de DHGNA. A biópsia hepática realizada em 437 casos mostrou: esteatose isolada em 42% dos casos, DHGNA em 58% e 27% deles apresentaram também fibrose. A cirrose foi observada em 15,4% e o carcinoma hepatocelular em 0,7%. Essa prevalência correlaciona-se, provavelmente, ao aumento das taxas de obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e síndrome metabólica na nossa população na última década (COTRIM *et al.*, 2008).

A DHGNA, é uma doença complexa com vários fatores etiológicos. A compreensão desses fatores, contribui para o conhecimento sobre a sua patogênese e pode nos ajudar no desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e terapêuticas (PATEL, SANYAL, 2013; SINGH, OSNA, KHARBANDA, 2017).

1.2. Fisiopatologia

A glicose é um carboidrato simples de açúcar que serve como combustível fundamental para a maioria das espécies e fornece precursores para a síntese de biomoléculas. De modo a controlar o metabolismo, diferenciação e crescimento, as células possuem vias de sinalização evolutivamente sensíveis à glicose. Esses sistemas de detecção de glicose garantem uma adaptação eficiente a mudanças na disponibilidade de glicose e permitem a sua manutenção homeostática de reservas internas. O fígado desempenha um papel central na homeostase metabólica, coordenando a decomposição, síntese, armazenamento e redistribuição de nutrientes (SALTIEL; KAHN, 2001).

Os hepatócitos possuem múltiplos sistemas de detecção de nutrientes que interagem para modular as vias bioquímicas, a fim de acomodar as necessidades e a disponibilidade sistêmica de combustível. Esses sistemas permitem que o corpo mantenha suas funções durante os períodos de alimentação e jejum e com exigências de energia, como exercícios. As concentrações de glicose no sangue flutuam durante os ciclos de alimentação e jejum, e uma das funções primárias do fígado é manter as concentrações de glicose no sangue dentro de uma faixa fisiológica, e o controle glicêmico, que é coordenado por fatores extra-hepáticos e intra-hepáticos (GEISLER, RENQUIST, 2017).

Os transportadores facilitadores de glicose (GLUT) transportam glicose através da membrana plasmática por meio de um mecanismo de difusão facilitada. São divididos em classe I, II e III. Os GLUTs de classe I são representados por GLUT1 a GLUT4, entre os quais o GLUT2 é expresso principalmente em células beta do pâncreas,

fígado e rim, atuando como um sensor de glicose, sendo responsáveis pela entrada de glicose na célula seguido do metabolismo da glicose através da fosforilação pela glucoquinase que apresenta alto K_m (baixa afinidade) (NAVALE, PARANJAPE, 2016).

Nos hepatócitos, o GLUT1 está associado ao transporte bidirecional de glicose controlada por hormônios, como o hormônio tireoidiano. O GLUT2 na membrana do hepatócito regula a entrada e a saída da glicose, e como tal controla o metabolismo da glicose hepática, em contraste, o GLUT2 em células da borda em escova intestinal e em células do túbulo renal está associado à absorção e reabsorção de glicose, respectivamente. O GLUT3 está presente principalmente no cérebro e tem alta afinidade pela glicose (K_m baixo) sendo responsável, por transportar glicose para células com maior necessidade de glicose (NAVALE, PARANJAPE, 2016).

O GLUT4 é um transportador de glicose sensível à insulina que é encontrado no coração, músculo esquelético, tecido adiposo e cérebro. Está presente em vesículas, das quais é translocado para a membrana plasmática sob a influência da insulina. Tal recrutamento de GLUT4 dirigido por insulina resulta em um aumento de 10 a 20 vezes no transporte de glicose (BRYANT *et al.* 2002).

Entre os transportadores facilitadores de glicose de classe II estão o GLUT5, GLUT7, GLUT9 e GLUT11. O GLUT5 é principalmente um transportador de frutose localizado nas células do intestino delgado, testículos e rim, onde desempenha importantes funções fisiológicas e patológicas. Os transportadores facilitadores Classe III são GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 e GLUT13 (HMIT). (SCHMIDT *et al.* 2009)

O alto consumo de dietas ricas em açúcares e lipídeos são percussores de uma série de condições clínicas de causas multifatoriais e associadas, como a resistência à insulina (RI), o diabetes mellitus tipo II (DM2), a obesidade e a doença hepática gordurosa não-alcoolica (DHGNA) (BRYANT *et al.* 2002).

A glicose consumida na dieta é catabolizada pela glicólise, nela a molécula de 6 carbonos da glicose é convertida em duas moléculas de 3 carbonos de piruvato, gerando energia na forma de ATP e NADH durante o processo. A glicólise pode ser dividida em duas etapas de 5 reações cada. A primeira etapa é denominada de fase preparatória, e nesta etapa o ATP é consumido para ativar a molécula de glicose e convertê-la em gliceraldeído-3-fosfato. Na etapa seguinte, denominada de fase de compensação, o gliceraldeído-3-fosfato é convertido em piruvato (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995; LEHNINGER; COX, 2002).

Ao final da via glicolítica, todos os carboidratos são convertidos em piruvato. O piruvato então pode seguir três destinos diferentes. Em condições anaeróbicas alguns microorganismos e as nossas células musculares quando não recebem oxigenação suficiente realizam a fermentação láctica, onde o piruvato é convertido à lactato. Outros microorganismos como as leveduras convertem o piruvato em etanol na fermentação alcoólica, e em condições aeróbicas, o piruvato é convertido a acetil-coenzima-A (Acetil-Coa), que entra no ciclo do ácido cítrico sendo convertida em CO₂ e água, tendo como produto final a formação de ATP na cadeia transportadora de elétrons. (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995; LEHNINGER; COX, 2002)

A patogênese da DHGNA, é complexa e implica interações entre os diferentes locais metabolicamente ativos. Uma hipótese inicial explicou a patogênese dividindo-a em duas etapas, chamadas de “dois hits”. A hipótese de Day e James (1998) descreve que a resistência à insulina é o “primeiro hit”, que leva à esteatose hepática, e é seguido por um “segundo hit” conduzido pelo estresse oxidativo, que por sua vez leva ao dano hepatocelular e inflamação que caracteriza a DHGNA. Este modelo tem sido expandido para “múltiplos hits paralelos”, hipótese em que um número de diferentes processos pode contribuir para a inflamação do fígado. Um papel crucial é desempenhado por mediadores inflamatórios, em particular os derivados do tecido adiposo, os quais estão envolvidos na cascata de inflamação, fibrose e, eventualmente, termogênese. Neste cenário, o estresse do retículo endoplasmático, citocinas e adipocinas, bem como a imunidade, estão emergindo como condutores das principais características da DHGNA (TILG, MOSCHEN, 2010).

A insulina é sintetizada pelas células β -pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos e é o mais potente hormônio anabólico conhecido. A insulina aumenta a captação de glicose no músculo esquelético e tecido adiposo, através do estímulo a translocação de GLUT4 e inibe a produção de glicose hepática, servindo assim como o regulador principal da concentração de glicose na corrente sanguínea. A insulina também estimula o crescimento celular e diferenciação, e promove o armazenamento de substratos no tecido adiposo, fígado e músculo, estimulando a lipogênese, glicogênese e a síntese de proteínas, e promove a inibição da lipólise, da glicogenólise e da degradação de proteínas. A resistência à insulina ou a sua deficiência resulta em profunda desregulação destes processos (GEISLER, RENQUIST, 2017).

A DHGNA é a manifestação hepática da síndrome metabólica, sendo a resistência à insulina a principal característica patogênica. Dois tipos de resistência à insulina são observados na DHGNA, a resistência à insulina sistêmica e hepática, sendo definidas como a capacidade diminuída dos tecidos para responder aos sinais de insulina. A resistência sistêmica à insulina é caracterizada pela incapacidade da insulina de reduzir adequadamente os níveis de glicose no sangue devido à deteriorada translocação do receptor GLUT4 para a membrana da superfície da célula muscular, levando à perda da absorção de glicose dependente de insulina. A resistência à insulina hepática é causada pela interrupção da supressão, induzida pela insulina, da produção hepática de glicose, com a estimulação preservada da lipogênese (GALBO; SHULMAN, 2013; RUI, 2014; RUTHERFORD *et al.*, 2016).

Em pacientes com resistência à insulina, as ilhotas de Langerhans são estimuladas a promover a secreção de insulina para superar o defeito na absorção de glicose plasmática e reduzir a geração de glicose no fígado. Além disso é observada altas taxas de produção de glicose nos hepatócitos, na presença de altos níveis de insulina, caracterizando um sinal de resistência à insulina hepática (GEISLER, RENQUIST, 2017).

No músculo e no fígado, a insulina promove a captação de glicose para oxidação de glicose ou armazenamento de glicogênio, além de, controlar o metabolismo lipídico, aumentando a reesterificação dos ácidos graxos em triglicérides nos adipócitos e no fígado. A principal função da insulina no fígado é suprimir a glicogenólise e a gliconeogênese. Por outro lado, a insulina promove a síntese do colesterol e triglicérides hepáticos e a captação de glicose nos músculos e tecido adiposo. Como os hepatócitos perdem a auto-regulação mediada por insulina, a produção de glicose é aumentada de ambas as vias. É importante ressaltar que o substrato fornecido pelo adipócito resistente à insulina contribui para a síntese adicional de triglicérides no fígado. Esse paradoxo na resistência à insulina hepática é que a insulina não consegue suprimir a produção de glicose hepática, mas continua a estimular a lipogênese, resultando em hiperglicemia, hiperlipidemia e esteatose hepática (GALBO; SHULMAN, 2013; RUI, 2014; RUTHERFORD *et al.*, 2016).

O excesso de ácidos graxos livres (AGL) da lipólise, causado pela resistência à insulina, é absorvido pelos hepatócitos periportais e oxidado como fonte de energia, o que aumenta bioquimicamente o consumo de oxigênio. Além disso, o excesso de

liberação de AGL no fígado resulta em acúmulo de diacilgliceróis intracelulares que, por sua vez, levam à ativação da proteína quinase C (PKC). A PKC induz resistência à insulina inibindo a fosforilação de proteínas do substrato do receptor de insulina (IRS) estimulada pela insulina (GALBO; SHULMAN, 2013).

A homeostase lipídica hepática é regulada por um sistema complexo de vias de sinalização/transcrição controladas por hormônios, fatores de transcrição e receptores nucleares com sinalização de insulina desempenhando um papel central. O acúmulo de triglicerídeos (TG) é resultado de um desequilíbrio entre a sua síntese e a sua utilização (ARAB; ARRESE; TRAUNER, 2018).

DHGNA leva o comprometimento da ação da insulina nos adipócitos, que por sua vez levam a uma falha na supressão da lipólise, no recrutamento e infiltração de macrófagos no tecido adiposo, com consequente liberação de adipocitocinas pró-inflamatórias, principalmente fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), resistina e inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1). Essas adipocitocinas contribuem para o rompimento da sinalização da insulina pelas vias do fator nuclear κ B (NF- κ B) e c-Jun N-terminal quinase (JNK), criando um ciclo vicioso no tecido adiposo e promovendo a RI em outros tecidos sensíveis à insulina (HARDIE, 2013a; HARDIE; SCHAFFER; BRUNET, 2016; LEE *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011)

A proteína-quinase ativada por AMP (AMPK) é um sensor chave do estado de energia celular presente em essencialmente todas as células eucarióticas, ocorrendo como heterotrímeros. Os estímulos clássicos que ativam AMPK de mamíferos são estresses metabólicos que aceleram o consumo de ATP, como a contração muscular, ou que interferem na produção catabólica de ATP, como a privação de glicose, hipóxia ou isquemia. A ativação da AMPK é necessária para o aumento da captação de glicose que ocorre durante a contração muscular e pode ser responsável por muitos dos benefícios à saúde do exercício regular, incluindo o aumento da sensibilidade à insulina e a proteção contra o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (HARDIE; SCHAFFER; BRUNET, 2016; RUTHERFORD *et al.*, 2016).

Embora a AMPK seja ativada por privação de glicose, na maioria das células de mamíferos que expressam isoformas de hexocinase que está presente no músculo e transportadores de glicose como GLUT1 e GLUT4, a glicose deve ser reduzida a níveis muito baixos (o que não seria tolerado *in vivo*) antes da AMPK ser ativada. No entanto, em células especializadas de "detecção de glicose", que expressam altas concentrações de

glicoquinase (fígado), GLUT2, a AMPK é ativada por variações mais fisiológicas da glicose. Tais células incluem células β pancreáticas, que secretam insulina, neurônios sensíveis à glicose no hipotálamo e o fígado (CHAO *et al.*, 2019; GASTALDELLI *et al.*, 2007; PETERSEN; SHULMAN, 2017).

A ativação da AMPK no hipotálamo pela hipoglicemia tem o potencial de desencadear respostas corretivas, incluindo aumento do apetite e liberação de adrenalina e glucagon pela glândula supra-renal e células α pancreáticas, que por sua vez induz a glicogenólise. A ideia de que a AMPK era uma "chave mestra metabólica" que transformava as células do modo anabólico (no qual armazenariam nutrientes) para o modo catabólico (no qual elas as oxidariam) está bem estabelecida, levando a prever que as drogas que ativam a AMPK podem ser úteis para o tratamento da resistência à insulina e diabetes tipo 2. Em cumprimento a isto, foi demonstrado que o nucleosídeo AICAR, um análogo do AMP que ativa a AMPK, reverte as anormalidades metabólicas em modelos animais de resistência à insulina, como o camundongo ob/ob e camundongos alimentado com dieta rica em gordura (HARDIE, 2011, 2013b; HARDIE; SCHAFFER; BRUNET, 2016; RUI, 2014).

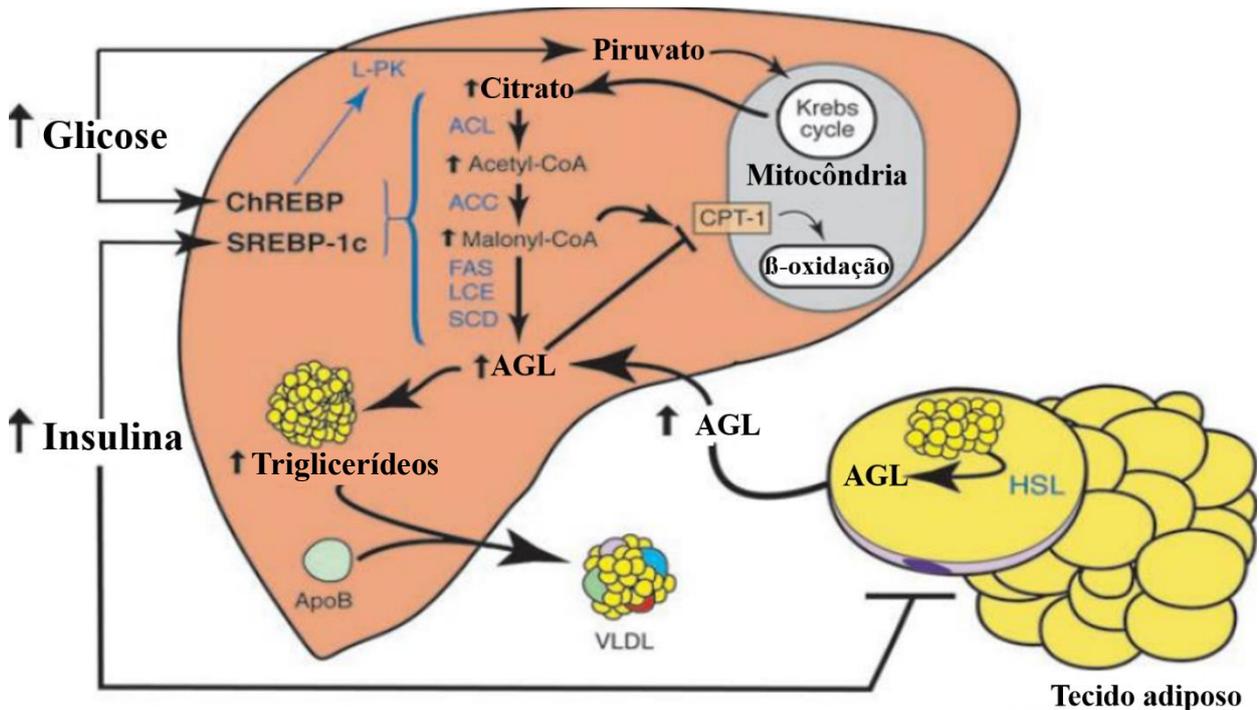
Em pacientes com DHGNA e/ou diabetes *mellitus* 2 (DM2), o desenvolvimento de RI leva a uma lipólise não inibida no tecido adiposo, via proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1 (SREBP1-c), resultando em um influxo excessivo de ácidos graxos livres (AGL) para o fígado, onde são absorvidos pelos hepatócitos através da proteína de transporte de ácidos graxos 2 (FATP2), FATP5 e outras proteínas de transporte, como proteína de ligação a AG e caveolina-1. O CD36 (também chamado translocase de AG) facilita a captação de AGL e o tráfico intracelular em vários tipos de células (macrófagos, hepatócitos, adipócitos, enterócitos e miócitos). Sabe-se que o CD36 aumenta em modelos murinos de esteatose hepática e é um alvo comum do receptor X do fígado (LXR), receptor X do pregnano (PXR) e receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissoma (PPAR γ) (ARAB; ARRESE; TRAUNER, 2018). O CD36 foi identificado como uma translocase de ácido graxo (TAG) em adipócitos de ratos, necessária para o transporte de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), e atua como um potencial receptor para a lipoproteína oxidada de baixa densidade (Ox-LDL). Além disso, estudos com camundongos transgênicos para CD36 confirmaram um papel fisiológico para os transportadores de ácidos graxos. Estudos *in vivo* em ratos hipertensos espontâneos (SHR) com o gene CD36 mutante mostraram transporte defeituoso de AGCL por adipócitos, levando ao DM2 (GAUTAM; BANERJEE, 2011).

Outra forma de acúmulo de gordura do tecido hepático é a lipogênese *de novo* (LDN). A glicose do excesso de carboidratos na dieta sofre glicólise no fígado e é eventualmente convertida em ácidos graxos para serem esterificados em triglicerídeos que são acumulados no fígado e secretados na forma de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) (LAMBERT *et al.*, 2014).

Estudos sustentam o conceito de que a estimulação da lipogênese *de novo* pode levar a um aumento da carga lipídica hepática por múltiplos mecanismos distintos, estes incluem o fato de que a lipogênese elevada é o resultado final de um alto fluxo de carboidratos, fornecendo excesso de triose fosfatos, que servem como o esqueleto do glicerol para a síntese de TG. A estimulação da lipogênese produz AG diretamente através do complexo enzimático da FAS, enquanto ao mesmo tempo elevando as concentrações intracelulares de malonil-CoA que devem inibir a oxidação da AG. Se a oxidação de AG é realmente aumentada na DHGNA, isso sugere que a produção de malonil-CoA é insuficiente para ter um efeito supressor. O produto final da lipogênese é o palmitato, um AG saturado, que pode promover inflamação e estresse no retículo endoplasmático (LAMBERT *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2013; SUNNY *et al.*, 2011; WEI *et al.*, 2006).

Além do aumento do consumo de carboidratos, levando a uma maior oferta de glicose no fígado, a resistência à insulina promove o aumento da gliconeogênese e da glicogenólise hepática, aumentando as concentrações de glicose intracelular, com consequente aumento das concentrações de Acetil-CoA a partir da glicólise. O Acetil-CoA entrará no ciclo do ácido cítrico para geração de energia. Com o aumento de ATP, e da oferta de Acetil-CoA, o citrato formado a partir da união do Acetil-CoA com o oxalacetato será desviado da rota metabólica para a síntese de AG hepático no citosol celular, sendo catalisado principalmente por duas enzimas, acetil-CoA carboxilase (ACC) e sintase de ácidos graxos (FAS). A ACC e FAS são controlados no nível transcricional, pela insulina, por ativação da proteína de ligação ao elemento regulador de esteroide 1 (SREBP-1c) e pela glicose por ativação da proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos (ChREBP) (Figura 1) (ARAB; ARRESE; TRAUNER, 2018).

Figura 1. Mecanismo de acúmulo de gordura no fígado



Fonte: Adaptado BROWNING e HORTON, 2014

Legenda: Alterações metabólicas que resultam em acúmulo de triglicérides hepáticos em estados resistentes à insulina. A resistência à insulina é manifestada por hiperinsulinemia, aumento da produção hepática de glicose e diminuição do armazenamento de glicose. Nos adipócitos, a resistência à insulina aumenta a atividade da lipase sensível ao hormônio (HSL), resultando em taxas elevadas de lipólise de triglicérides e aumento do fluxo de AGL no fígado. Os AGL podem ser oxidados nas mitocôndrias para formar ATP ou esterificados para produzir triglicérides para armazenamento ou incorporação em partículas de VLDL. No fígado, a hiperinsulinemia induz a expressão de SREBP-1c, levando à ativação transcricional de todos os genes lipogênicos. Simultaneamente, a hiperglicemia ativa o ChREBP, que ativa genes lipogênicos. As ações sinérgicas do SREBP-1c e do ChREBP ativam coordenadamente o maquinário enzimático necessário para a conversão do excesso de glicose em ácidos graxos. Uma consequência do aumento da síntese de ácidos graxos é o aumento da produção de malonil-CoA, que inibe a CPT-1, a proteína responsável pelo transporte de ácidos graxos para a mitocôndria. Assim, no cenário da resistência à insulina, os AGL que entram no fígado a partir da periferia, bem como os derivados da lipogênese de novo, serão preferencialmente esterificados em triglicérides.

SREBPs são fatores de transcrição sintetizados como precursores e ligados à membrana do retículo endoplasmático. Na presença dos sinais apropriados, como hiperinsulinemia, as SREBPs fazem a transição para o complexo de Golgi, onde são

clivadas, liberando a forma madura, que se transloca para o núcleo e ativa a expressão do gene alvo. Secundária à hiperinsulinemia, a atividade da SREBP-1c é maior no fígado de camundongos em modelos de obesidade e DM2, ressaltando o papel desse fator de transcrição como contribuinte para a esteatose hepática e resistência à insulina, sugerindo que estratégias para reduzir a atividade da SREBP-1 têm potencial terapêutico para reduzir o acúmulo de lipídios hepáticos e melhorar a sensibilidade à insulina bloqueando a gliconeogênese e o débito de glicose hepático (HORTON; GOLDSTEIN; BROWN, 2002; PETTINELLI *et al.*, 2009; RUIZ *et al.*, 2014).

Outro mecanismo que contribui para o acúmulo de TG no fígado é a deficiência da oxidação hepática dos AG e alteração na secreção de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). A oxidação hepática de AG ocorre nas mitocôndrias, peroxissomos ou microsomas, levando a uma produção de energia de alto rendimento. Durante o jejum, a principal fonte de energia é a β -oxidação dos AGs, onde eles entram no ciclo do ácido cítrico após serem decompostos em acetil-CoA. Para serem utilizados na β -oxidação, os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) precisam ser transportados para a mitocôndria pela ativação da acil-CoA-sintetase no citosol. AGCL são transportados e catalisados na membrana mitocondrial externa pela carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1). CPT1 é inibida por malonil-CoA (um intermediário chave na LDN) e insulina e ativada por PPAR α , no entanto, durante estados de excesso de AG, o acetil-CoA pode sofrer conversão para corpo cetônico, ao invés de entrar no ciclo do ácido cítrico, tendo uma oxidação-dependente do CYP4A no retículo endoplasmático (ER) (DUVAL; MULLER; KERSTEN, 2007).

Os PPARs pertencem à superfamília de receptores nucleares solúveis ativados por ligantes. O PPAR α é o principal regulador da β -oxidação do ácido graxo e promove a oxidação do ácido graxo tanto nas mitocôndrias quanto nos peroxissomos. A expressão do PPAR α no fígado é maior no estado de jejum, e a sua deleção diminui a oxidação do ácido graxo hepático em jejum e exacerba a esteatose hepática induzida pelo jejum, hipoglicemia, hipocetonemia e hipotermia (DUVAL; MULLER; KERSTEN, 2007; KERSTEN *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2007).

Em resposta à ativação do ligante, o PPAR α , predominantemente presente no fígado, heterodimeriza com outro receptor nuclear, RXR α , e após alterações conformacionais que levam ao recrutamento de co-reguladores transcricionais, o complexo receptor modula a expressão do gene alvo resultando em diversas respostas fisiológicas. Sabe-se que os ácidos graxos endógenos e os derivados de ácidos graxos são

considerados potenciais ligantes endógenos para o PPAR α , tendo em vista que eles ligam e os ativam naturalmente. Isto sugere que, em circunstâncias normais, o PPAR α modula a homeostase lipídica através de sua ativação por moléculas sinalizadoras endógenas, conduzindo a expressão aumentada de genes alvo que regulam a mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo e aumento do catabolismo hepático de ácidos graxos mediado por enzimas peroxissomais e mitocondriais, como o SREBP1-c, FAS e LPL (lipoproteína lipase) (DUVAL; MULLER; KERSTEN, 2007)

Devido a este mecanismo regulador chave, o PPAR α é conhecido por ser um modulador central da homeostase lipídica que ocorre em espécies de mamíferos e é ativado em resposta ao jejum quando os lipídios precisam ser mobilizados como fonte de energia. Os tratamentos com agonistas do PPAR α corrigem a esteatose hepática e a hipoglicemia em camundongos com deleção específica da FAS no fígado, que foram alimentados com uma dieta com alto teor de gordura e alto teor de carboidratos (DUVAL; MULLER; KERSTEN, 2007; PETERS; CHEUNG; GONZALEZ, 2005; RUI, 2014)

Sirt1, uma proteína deacetilase dependente de NAD⁺ nuclear, desempenha um papel importante na regulação de vários processos metabólicos críticos (TANG, 2011; HANG E KRAUS, 2010; TANG E CHUA, 2010). Estudos mostram que Sirt1 hepática é um regulador importante da homeostase de lipídios, em particular da oxidação de ácidos graxos. A perda de Sirt1 em hepatócitos prejudica a atividade de PPAR α , resultando na diminuição da oxidação dos ácidos graxos, que leva ao desenvolvimento de esteatose hepática e inflamação na dieta rica em gordura (PURUSHOTHAM *et al*, 2009; BAI *et al*, 2008.).

As mitocôndrias são a fonte predominante de energia em condições normais e durante a lipólise induzida por jejum. As mitocôndrias podem metabolizar ácidos graxos de cadeia curta, média e longa, mas não podem metabolizar ácidos graxos de cadeia muito longa (> C20), que são oxidados exclusivamente em peroxissomas. Os peroxissomos não possuem um ciclo de Krebs e o acetil-CoA gerado não pode ser oxidado em CO₂ e H₂O e, portanto, precisa ser transportada para a mitocôndria. Algumas das enzimas do sistema de β -oxidação mitocondrial são reguladas pelo PPAR α , e os defeitos no PPAR α são conhecidos por influenciar o manejo mitocondrial de ácidos graxos (HASHIMOTO, 1999; YU; RAO; REDDY, 2003).

O excessivo aporte de ácidos graxos ao fígado pode promover esgotamento da oxidação mitocondrial e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS)

bem como a ativação de outras vias de oxidação lipídica, que geram por sua vez mais EROS, aumentando o estresse oxidativo hepático. Esse aumento pode causar peroxidação lipídica, levando a formação de compostos aldeídos, dentre eles, o malondialdeído (MDA) responsável por induzir uma resposta inflamatória no tecido hepático além de estimular uma resposta imunológica (BERSON *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 2000; ALBANO *et al.*, 2005; ZAMARA *et al.*, 2004).

O supressor de proteínas de sinalização de citocinas (SOCS) parece desempenhar um papel fundamental na indução de resistência à insulina em roedores obesos (EMANUELLI *et al.*, 2001; EL-HALEIM; BAHGAT; SALEH, 2016). Estudos em ratos obesos provaram que o aumento da expressão de SOCS-3 estava ligado à diminuição da fosforilação da tirosina das proteínas do substrato do receptor de insulina (IRS) e do receptor de insulina (IR). Além disso, a expressão aumentada de SOCS-3 era suplementar à expressão aumentada da proteína de ligação aos elementos reguladores de esterol (SREBP) -1c, um ativador transcripcional de enzimas lipogênicos. Essas mudanças eventualmente acabariam por um aumento da síntese de ácidos graxos e levaria a esteatose hepática clássica e aumento da lipogênese (FORETZ *et al.*, 1999; EL-HALEIM; BAHGAT; SALEH, 2016).

As citocinas exercem um papel importante na patogênese da DHGNA, pois são capazes de induzir as alterações patológicas que caracterizam a síndrome (CORTEZ-PINTO *et al.*, 2006). Portanto, os produtos da peroxidação lipídica e as citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e TNF, agem em conjunto para desencadear as lesões hepáticas da DHGNA por induzir a inflamação hepática e a fibrose que, eventualmente, leva à fase final da doença hepática (SCHWABE, 2006; TRAN, GUAL, 2013; BERTOLA *et al.*, 2010). O óxido nítrico derivado da (óxido nítrico sintase endotelial) eNOS exerce efeitos parácrino nas células estreladas hepáticas adjacentes, inibindo a vasoconstrição, proliferação e migração. Entretanto, durante a inflamação, a NO-sintase induzível (iNOS) desempenha um papel importante na produção de óxido nítrico, contribuindo para o dano tecidual (YONEDA *et al.*, 2009).

1.3. Diagnóstico

O diagnóstico da DHGNA é de especial importância pois, em caso de diagnóstico em fases iniciais, é possível impedir o agravamento da doença através da

aplicação de métodos simples, tais como o aumento da atividade física e a modificação da dieta. Mesmo em fases mais avançadas da doença, tais como esteatohepatite não alcoólica (NASH), ainda é importante para o diagnóstico, devido ao seu potencial para progredir para cirrose (HADIZADEH; FAGHIHIMANI; ADIBI, 2017; ZUBERBUHLER; BOURSIER, 2019).

A biópsia hepática continua a ser a técnica padrão ouro e mais precisa para identificar a esteatose hepática e a fibrose, embora apresente limitações, como o custo, erro de amostragem e morbimortalidade relacionada ao procedimento. Testes não invasivos como a determinação da atividade das aminotransferases séricas e modalidades de imagem de rotina como ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética, não podem distinguir de forma clara os diferentes estágios da DHGNA (TOVO *et al.*, 2019; YOUNOSSI, 2018).

Apesar da biópsia ser a única técnica eficaz e reconhecida de identificar a EH, hoje usa-se biomarcadores como auxiliares no diagnóstico da DHGNA, como a proteína C reativa (PCR) e marcadores dos produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA) que pode estimular as células estreladas hepáticas e resultar em fibrose através da produção de colágeno (HADIZADEH; FAGHIHIMANI; ADIBI, 2017).

Um teste não invasivo com a capacidade de classificar com clareza a DHGNA não está disponível, por isso uma combinação desses biomarcadores não invasivos pode aumentar o desempenho preditivo desses algoritmos (TOVO *et al.*, 2019; YOUNOSSI, 2018).

1.4. Tratamento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

Apesar da grande procura de abordagens farmacológicas eficientes para o tratamento da DHGNA, a Associação Americana para os Estudos das Doenças Hepáticas (AASLD) sugere que a perda de peso pode ser a melhor forma de alcançar a melhora da histologia hepática, através de uma combinação de uma dieta de baixa caloria (500 a 1000 kcal) e prática de exercícios físicos de intensidade moderada, sendo a perda de peso de 3-5% necessária para melhorar a esteatose, e uma perda de peso de 7-10% necessária para melhorar as características histopatológicas da NASH (HADIZADEH; FAGHIHIMANI; ADIBI, 2017).

O uso de agentes farmacológicos para o tratamento da DHGNA está ativamente sendo pesquisada, com ênfase em drogas que melhorem a resistência à insulina, a dislipidemia, o estresse oxidativo, apoptose, regulem o crescimento excessivo de bactérias e outras vias importantes no desenvolvimento de fibrose hepática (CORRADO *et al.*, 2013; EASL, EASO, 2016; SINGH *et al.*, 2017). Atualmente, a pioglitazona, que atua como agente de sensibilização à insulina, e a vitamina E como antioxidante, tem sido recomendadas para o tratamento da EHNA por diretrizes internacionais. Os agentes que promovem redução de lípidos, incluindo estatinas e fibratos, pentoxifilina, bloqueadores dos receptores da angiotensina, ácido ursodeoxicólico, probióticos e simbióticos são agentes atuais com efeitos benéficos para o tratamento da EHNA, mas ainda não foram aprovados e vários medicamentos emergentes estão em desenvolvimento como a liraglutida, elafibranor, cenicriviroc e aramchol que foram testados em ensaios clínicos ou que estão completando ensaios (ESHRAGHIAN, 2017; EASL, EASO, 2016; CHEUNG *et al.*, 2019).

Fenofibrato tem sido usado por muitos anos para tratar dislipidemias e também recentemente demonstrou ter efeitos anti-inflamatórios. O fenofibrato atua a partir da ativação dos receptores nucleares ativados de proliferação dos peroxissomas-alfa (PPAR- α), levando o aumento da produção e da ação da lipase lipoprotéica (LPL) e redução da apoproteína CIII (Apo CIII). Atuam também por diminuir a síntese das VLDL, pois reduzem a produção dos TG devido ao estímulo da beta oxidação dos ácidos graxos no fígado, além de ações antioxidantes, diminuindo a oxidação das LDL, ações antitrombóticas e anti-inflamatórias inibindo a expressão das interleucinas (IL-1 e IL-6), da cicloxigenase-2 (COX-2), da proteína-C reativa (PCR), das moléculas de adesão, do fator tecidual, do fibrinogênio e do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1) (XAVIER HT., 2005).

Em vista de suas propriedades de redução de lipídios, estudos realizados por El-haleim, Bahgat e Saleh (2016) mostraram que o fenofibrato, além de diminuir o peso corporal dos animais, restaurou a histologia do fígado ao normal, preveniu a esteatose hepática e algum grau de vacuolização citoplasmática em células hepáticas, o que refletiu na melhora nos testes de função hepática. A melhora histológica observada pelo fenofibrato foi acompanhada por restauração da sensibilidade à insulina e redução nos TGs hepáticos e séricos, onde o fármaco causou uma diminuição nas expressões de genes hepáticos de SOCS-3 e FAS sem afetar o de SREBP-1c em modelo de esteatose hepática induzida por frutose.

1.5. Terpenos e seu potencial sobre a DHGNA

Os terpenos formam a maior classe de compostos orgânicos naturais, com mais de 20.000 moléculas já identificadas, tendo um valor econômico significativo devido ao seu uso no setor industrial cosmético e alimentício, como aditivos alimentares, aromatizantes e especiarias. Na indústria farmacêutica, os terpenos além de serem utilizados como excipientes de fármacos (para melhorar penetração na pele), eles também são princípios ativos de alguns medicamentos, como exemplo de produto farmacêutico a base de terpeno tem-se a Artezine® com atividade antimalárica, o Taxol®, com atividade antitumoral e o Salonpas® a base de mentol e cânfora, com atividade analgésica local (GUIMARÃES; SERAFINI; QUINTANS, 2014).

Triterpenos, um grupo de compostos naturais generalizados contendo seis unidades de isopreno com a fórmula molecular de base C₃₀, policíclica, normalmente tetra ou pentacíclica, são sintetizados em muitas plantas pela ciclização do escaleno. Os triterpenos podem ser divididos em três grupos: oleanano (ex: β-amirina), ursano (ex: α-amirina) e lupenona (ex: lupeol). O grupo β-amirina apresenta duas metilas em C-20 e o α-amirina apresenta uma metila no C-20 e outra em C-19. Já o triterpeno do tipo lupenona apresenta diferença na estereoquímica entre os anéis (*trans*), além no número de carbonos do quinto anel, o qual, é formado por cinco átomos de carbono (SHENG; SUN, 2011).

Triterpenos pentacíclicos naturais possuem uma ampla gama de atividades biológicas. Nas últimas décadas, intensos estudos farmacológicos e mecanicistas sobre triterpenos naturais têm sido realizados para explorar seu potencial terapêutico, como, efeitos antitumorais, antivirais, antidiabéticos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antiparasitários, hepatoprotetora, gastroprotetor, analgésicos e cicatrizantes (SHENG; SUN, 2011). Os triterpenos estão presente em drogas vegetais conhecidas, como, *Centella asiática* L. (GNANAPRAGASAM *et al.*, 2004), *Glycyrrhiza glabra* e *Gymnema sylvestre* (ALQAHTANI *et al.*, 2013) e castanha da índia (*Aesculus hippocastanum* L) (LEACH, 2004).

Foi observado que o triterpeno ácido oleanólico (grupo da β-amirina) estimulou a oxidação de ácidos graxos principalmente através da regulação de fatores de transcrição, como a supressão da expressão dos genes responsivos a SREBP-1, em modelos de ratos alimentados com frutose (LIU *et al.*, 2013). Da mesma forma, outros triterpenos pentacíclicos como o ácido ursólico (JIA *et al.*, 2011, LI *et al.*, 2014, ZHANG

et al., 2016) e ácido corosólico (YAMADA *et al.*, 2008b) melhoraram expressão de enzimas chave envolvidas no metabolismo lipídico, através das vias mediadas pelo PPAR α .

Estudo realizado por Dal Rhee *et al.* (2012), observaram que em camundongos C57BL alimentados com uma dieta hiperlipídica e C57BL (ob/ob) tratados com carboxonolona, apresentaram redução significativa nos triglicerídeos plasmáticos e ácidos graxos livres nos hepatócitos através da inibição da expressão de SREBP1-c, FAS e ACC1, além da, melhora da resistência à insulina e à glicose.

Nosso laboratório demonstrou a atividade dos triterpenos pentacíclicos, ácido oleanólico, ácido betulínico e ácido ursólico, em modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos, e foi possível observar que esses triterpenos preveniram o desenvolvimento da obesidade em camundongos através da redução do peso corporal, da adiposidade visceral, da glicemia e lipídeos sanguíneos, assim como elevaram os níveis sanguíneos de leptina e reduziram os de grelina, quando comparados aos animais que receberam apenas a dieta hiperlipídica e apresentaram um potencial hepatoprotetor, reduzindo o peso do fígado e melhorando as características histopatológicas (DE MELO *et al.*, 2010; DE MELO *et al.*, 2009; RAO *et al.*, 2011).

1.5.1. Mistura de triterpenos pentacíclicos alfa e beta-amirina

Protium heptaphyllum (Aubl.) March é conhecido popularmente como almecegueira, breu-branco-verdadeiro, almecegueira cheirosa, almecegueira de cheiro, almecegueira-vermelha ou almecegueiro bravo, sendo uma árvore de grande porte e com ocorrência em todo o Brasil (CORRÊIA, 1984). Uma lesão no tronco da *P. heptaphyllum* faz exsudar uma resina oleosa e amorfa rica em substâncias aromáticas que é utilizada na medicina popular como anti-inflamatório, gastroprotetor, analgésico, cicatrizante e expectorante (MAIA *et al.*, 2000; SIANI *et al.*, 1999b). As figuras 2 e 3 trazem imagens dessa espécie.

Foram identificadas na resina sete constituintes triterpênicos, distribuídos em três misturas, α , β -amirina (45,25%), breina e maniladiol (9,5%), α , β -amirina e lupenona (1,25%), sendo a mistura de α , β -amirina o principal constituinte. A proporção entre α , β -amirina é de 63:37 (Figura 4) (VIEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2005).

A resina de *P. heptaphyllum* é constituída por substâncias de natureza terpênica, sendo o óleo essencial rico em monoterpenóides e fenilpropanóides (BANDEIRA *et al.*, 2001; SIANI *et al.*, 1999 e ZOGHBI *et al.*, 1995). Entre os constituintes fixos, a literatura registra a presença de um monoterpeno trioxigenado e quatro misturas binárias de triterpenóides (BANDEIRA *et al.*, 2002; MAIA *et al.*, 2000; SUSSUNAGA *et al.*, 2001), onde se destaca como constituinte majoritário a mistura de triterpenos pentacíclicos α , β -amirina (VIEIRA-JUNIOR; SOUZA; CHAVES, 2005).

Figura 2. Fotografia da espécie *Protium heptaphyllum* (Aubl.)



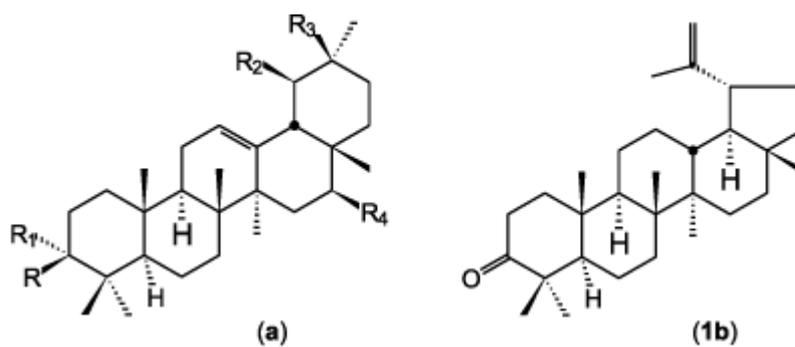
Fonte: <https://www.flickr.com/photos/tarcisoleao/5700875289/in/photostream/>

Figura 3. Resina extraída da *Protium heptaphyllum* (Aubl.)



Fonte: <http://amazonforestrading.com.br/produto/extratos-e-oleos/resina-natural-da-amazonia-de-breu-branco/>

Figura 4. Estrutura química dos constituintes triterpênicos da resina de *P. heptaphyllum*



| | | | |
|-----------|-------------------------|--|-------------------------------------|
| 1a | R=OH | R ₁ = R ₃ = R ₄ = H | R ₂ = CH ₃ |
| 2a | R=OH | R ₁ = R ₂ = R ₄ = H | R ₃ = CH ₃ |
| 3a | R = R ₄ = OH | R ₁ = R ₃ = H | R ₂ = CH ₃ |
| 4a | R = R ₄ = OH | R ₁ = R ₂ = H | R ₃ = CH ₃ |
| 5a | R = R ₁ = O | R ₂ = CH ₃ | R ₃ = R ₄ = H |
| 6a | R = R ₁ = O | R ₂ = R ₄ = H | R ₃ = CH ₃ |

Legenda: α -amirina (1a), β -amirina (2a), breína (3a), maniladiol (4a), α -amirinona (5a), β -amirinona (6a) e lupenona (1b).

Fonte: VIEIRA-JÚNIOR *et al.* 2005

Nosso laboratório já determinou várias atividades biológicas da resina de *P. heptaphyllum* e para a mistura de α , β -amirina. A resina e a mistura de α , β -amirina apresentaram atividade preventiva da obesidade em animais submetidos a uma dieta rica em gordura por 15 semanas, reduzindo o peso corporal, peso do fígado, da gordura abdominal, dos níveis séricos de glicose, amilase, lipase, colesterol total, triglicerídeos, grelina, leptina, TNF- α e IL-6, melhora da histologia hepática, assim como reduzindo a expressão de PPAR- γ e de lipoproteína lipase no tecido adiposo em relação aos animais que receberam apenas a dieta hiperlipídica. Além disso a resina de *P. heptaphyllum* foi capaz de reduzir a adipogênese em células 3T3-L1, reduzindo o acúmulo de lipídeos e a expressão de PPAR- γ , C/EBP α e C/EBP β (CARVALHO *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.* 2016).

A mistura de triterpenos α , β -amirina apresenta atividade antinociceptiva (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2006; HOLANDA PINTO *et al.*, 2008a), anti-inflamatória (HOLANDA PINTO *et al.*, 2008b; MELO *et al.*, 2010; Melo *et al.*, 2011), gastroprotetora (OLIVEIRA *et al.*, 2004), antihiperlipidêmica e hipolipidêmica (SANTOS *et al.*, 2012) e hepatoprotetora (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Em estudo realizado por nosso grupo, a α , β -amirina apresentou atividade anti-adipogênica em células 3T3-L1, inibindo a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos através da supressão dos fatores de transcrição adipogênicos, PPAR γ e C/EBP α , além de estimular a translocação do transportador de glicose GLUT4 e promoveu a fosforilação do AMPK (DE MELO *et al.*, 2019).

Diante dessas informações, de diversos estudos promissores e atuais sobre a atividade biológica da α , β -amirina, nosso grupo buscou avaliar a atividade da α , β -amirina na prevenção DHGNA em camundongos e seus possíveis mecanismos de ação.

2. JUSTIFICATIVA

A DHGNA é um problema de saúde pública, acometendo cerca de 20-40% em todo mundo, principalmente em países desenvolvidos. Um estudo realizado nos Estados Unidos, com 328 pacientes assintomáticos, mostrou que 46% dos indivíduos tinham esteatose e 70% eram obesos. Os medicamentos utilizados atualmente para o tratamento da DHGNA como a pioglitazona, estatinas e fibratos, pentoxifilina, bloqueadores dos receptores da angiotensina, ácido ursodeoxicólico, probióticos e simbióticos embora estejam associados com uma melhora da função hepática, da histologia do fígado, da esteatose hepática e da inflamação, nenhum deles demonstrou reduzir substancialmente a mortalidade associada à esteatohepatite, além de não se conhecer a segurança do uso a longo prazo (BENEDICT, ZHANG, 2017).

Apesar do benefício de mudanças de estilo de vida, a DHGNA continua a ser um grande problema de saúde que necessita de novas terapias farmacológicas. Diante desta necessidade, inúmeras pesquisas têm sido realizadas no mundo, objetivando descobrir medicamentos eficazes e mais seguros como opções de tratamento. Neste contexto, os modelos experimentais pré-clínicos são de grande valia para compreensão da etiologia da doença e no desenvolvimento de terapias medicamentosas mais eficazes, contando com modelos em roedores, em que a relevante patologia do fígado desenvolve-se num contexto metabólico adequado. Estes modelos são ferramentas promissoras para os pesquisadores que investigam uma das questões-chave da DHGNA: não somente como a esteatose ocorre, mas o que leva à transição da esteatose simples à condição inflamatória progressiva (IMAJO *et al.*, 2013; WILLEBRORDS *et al.*, 2015; HAAS, FRANQUE, STAELS, 2015).

A *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March (almecegueira), após lesão no seu tronco, exsuda uma resina oleosa e amorfa rica em substâncias aromáticas e tendo como principal constituinte a mistura de triterpenos α , β -amirina. Tanto a resina de *P. heptaphyllum*, quanto a mistura de α , β -amirina, demonstraram efeito na prevenção da antiobesidade, com melhora da sensibilidade à insulina, ativação de PPAR γ , indução de adiponectinas, regulação de citocinas pró-inflamatórias e efeitos antioxidantes em camundongos. Sendo assim, o presente se propõe avaliar o efeito da mistura de $\alpha\beta$ -amirina na prevenção da DHGNA induzida por dieta hiperlipídica em camundongos e seus possíveis mecanismos de ação.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar o efeito preventivo da mistura de triterpenos pentacíclicos α,β -amirina (AMI) na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) induzida por dieta hiperlipídica (DH) em camundongos.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da AMI sobre a viabilidade de células HepG2.
- Avaliar o efeito da AMI sobre a esteatose hepática induzida por ácido oleico em células HepG2 por meio de coloração com *Oil Red O*.
- Avaliar o efeito preventivo da AMI no desenvolvimento da DHGNA induzida por DH em camundongos, por 15 semanas, através da mensuração das medidas murinométricas, eficiência alimentar, consumo de água e ração, do peso corporal, da gordura visceral, subcutânea e subescapular e do peso do fígado.
- Avaliar o efeito preventivo da AMI sobre os níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), glicose e insulina.
- Avaliar o efeito da AMI sobre os níveis hepáticos de lipídios totais (colesterol total e triglicerídeos) e glicogênio.
- Avaliar o efeito da AMI sobre a resistência à insulina, através, do índice de HOMA-IR, Teste de tolerância à glicose intraperitoneal e Teste de tolerância à insulina intraperitoneal.
- Avaliar o efeito da AMI sobre os marcadores do estresse oxidativo (MDA e GSH) no fígado.
- Avaliar o efeito da AMI nas alterações histológicas do tecido hepático e sobre o acúmulo de lipídios totais através da metodologia de coloração *Oil red O*.
- Avaliar o efeito da AMI sobre as expressões das proteínas SREBP-1c, FAS, AMPK e PPAR α no fígado.
- Avaliar o efeito da AMI sobre a expressão do RNAm dos genes, FAS, ACC1 e CD36 hepáticos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes Utilizados

| Material | Origem |
|---|---------------------------------|
| Albumina bovina sérica (BSA) | Sigma, EUA |
| Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) | Sigma, EUA |
| Ácido tricloroacético (TCA) | Sigma, EUA |
| Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) | Sigma, EUA |
| Ácido acético | Vetec, Química, Brasil |
| Ácido oleico | Sigma, EUA |
| Álcool isopropílico | Dinâmica, Brasil |
| Amersham ECL™ Prime | GE Healthcare, Reino Unido |
| Antrona | Dinâmica, Brasil |
| Coquetel inibidor de protease | Sigma, EUA |
| DC Protein Assay (kit) | BioRad Laboratories, EUA |
| Dimetilsulfóxido (DMSO) | Sigma, EUA |
| <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (DMEM) | Gibco by Life Technologies, EUA |
| Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) | Dinâmica, Brasil |
| Fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) | Sigma, EUA |
| Soro bovino fetal | Gibco by Life Technologies, EUA |
| Formaldeído | Dinâmica, Brasil |
| <i>High Capacity cDNA Reverse Transcription</i> (kit) | Applied Biosystems, EUA |
| Hidróxido de potássio | Dinâmica, Brasil |
| Insulina | Lilly® |
| Membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) | BioRad Laboratories, EUA |
| <i>Oil Red O</i> | Sigma, EUA |
| Ortovanadato de sódio | Sigma, EUA |

| | |
|--|---------------------------------|
| Penicilina/estreptomicina | Gibco by Life Technologies, EUA |
| “PureLink™ RNA Mini” (kit) | Thermo Fisher Scientific, EUA |
| Dodecil sulfato de sódio (SDS) | Sigma, EUA |
| Tampão Ripa | Sigma, EUA |
| 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) | Sigma, EUA |

4.2. Obtenção da mistura de α , β -amirina

A obtenção da mistura de triterpenos α , β -amirina foi realizada pela Prof^a Dr^a Mariana Helena Chaves, na Universidade Federal do Piauí, e pelo Prof^o Msc Armenio André de Carvalho Almeida da Silva, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí. A espécie foi registrada no Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob n^o A4B5E59.

A resina exsudada do caule de *Protium heptaphyllum* foi coletada no município de Timon, no estado do Maranhão. A identificação botânica foi realizada por Roseli Farias de Melo Barros, sob deposição e registro com n^o TEPB 18247, no herbário Graziela Barroso pertencente à Universidade Federal do Piauí.

A resina bruta de *P. heptaphyllum* (410g) foi dissolvida em solução de metanol/diclorometano (4:1), seguida de filtração e evaporação do solvente. Com isso, obteve-se um rendimento de 99,5% da resina branca amorfa e 408 gramas foram obtidos. Análises fitoquímicas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H e ¹³C) e espectrofotometria de massa mostraram a presença de 56% de triterpenos pentaclícos, dos quais 42,25% se tratavam da mistura de α , β -amirina. Breína e maniladiol constituíram 9,5% dos triterpenos, enquanto que 1,25% foram identificados como uma mistura de lupenona e α e β -amirinona (JÚNIOR; DE SOUZA; CHAVES, 2005; DE MELO *et al.*, 2019).

4.3. Cultura de células

A linhagem celular HepG2 (carcinoma hepático imortalizado) (ATCC/HB-8065) foi doada pela Prof^a Dra. Raquel Carvalho Montenegro, do Laboratório de Farmacogenética da UFC, e mantida em incubadora (NUAIRE, modelo NU-5800E) a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. As células foram mantidas em meio DMEM *high*

glucose, adicionado de antibióticos a uma concentração final de 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (SUNG *et al.*, 2010). As células foram subcultivadas após atingir uma confluência de 80%. O crescimento e a morfologia das células foram acompanhados em microscópio óptico de inversão (NIKON, modelo Eclipse TS100).

4.3.1. Conjugação do ácido oleico (AO)

A solução complexada de AO/BSA foi preparada de acordo com metodologia descrita por Hwang, (2014) com modificações. Preparou-se uma solução estoque de 20mM de AO em NaCl 0,1N, em um banho de água, sob agitação constante. Em um banho adjacente preparou-se uma solução de BSA livre de ácido graxos a 2,3% (p/v) em água deionizada a 55° C. Após a solução de AO/NaCl chegar aos 70° C foi adicionado à solução de BSA livre de ácidos graxos obtendo assim uma solução límpida, sendo chama de solução estoque e armazenada no freezer a -20° C por no máximo 4 semanas.

4.3.2. Ensaio de viabilidade celular pelo teste do MTT

O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com o método descrito por Zeng *et al.* (2016). As células HepG2 foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/ mL em placa de 96 poços. Após a confluência das células chegar a aproximadamente 70%, a α , β -amirina foi adicionada nos poços nas concentrações de 3,1; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 µg/mL por um período de 24 h. Em seguida, o meio foi retirado e o MTT adicionado na concentração de 1 mg/mL em meio DMEM *high glucose* durante 3 h. Após esse tempo, o meio foi retirado e o formazan formado (precipitado) foi ressuspendido com 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância foi medida em espectrofotômetro de placa (Biochrom® Asys, UVM 340) a 570 nm e os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade considerando o controle (apenas meio) 100% de viabilidade.

4.3.3. Protocolo de esteatose hepática induzida por AO e coloração com *Oil Red O*

Para induzir a esteatose em células HepG2 foi utilizado o protocolo sugerido por Hwang *et al.*, (2014), com algumas adaptações. As células HepG2 foram mantidas em placas de 24 poços, na concentração de 1×10^5 células/ mL, em meio (DMEM *high*

glucose, SFB e antibióticos). Nessa condição, as células atingem a confluência após 24 h e então o meio foi trocado pela primeira vez com a adição do AO/BSA na concentração final de 1mM para a indução da esteatose. Para avaliar o efeito da α,β -amirina sobre a esteatose induzida por AO/BSA, esta foi incubada com as células e AO/BSA nas concentrações de 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Como substância controle positivo foi utilizado o fenofibrato na concentração final de 10 mMol. Após 24 h os hepatócitos foram lavados com solução de PBS (tampão fosfato) e fixadas em formaldeído tamponado 4%, por 1 h em temperatura ambiente. Posteriormente as células foram lavadas em PBS e álcool isopropílico 60% e este foi evaporado a temperatura ambiente. Um dia anterior foi preparado uma solução de *Oil Red O* na concentração de 0,5% (p/v) em álcool isopropílico, sob agitação, e refrigeração a 4° C. A solução de *Oil Red O* foi filtrada e incubada nos poços por 90 min. Em seguida, as células foram lavadas em água destilada e secas em temperatura ambiente para serem fotografadas. Para quantificação da marcação, o corante foi extraído com álcool isopropílico 60% e a absorbância foi medida em espectrofotômetro com comprimento de onda em 510 nm O percentual de corante foi calculado relativo ao controle (KASTURI; JOSHI, 1982; SUNG *et al.*, 2010).

4.4. Animais

Foram utilizados camundongos, *Swiss*, machos, com peso entre 23-25g, oriundos do Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), acondicionados em gaiolas apropriadas e mantidos à temperatura média de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, em ciclos claro/escuro de 12/12 h, no Laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará sob N° 5347120318 (ANEXO I).

4.5. Composição da dieta hiperlipídica (DH)

A dieta padrão (DP) constituiu a ração para camundongos, obtida a partir de uma fonte comercial (Nuvilab[®], Brasil). A dieta hiperlipídica (DH) foi produzida a partir de ração padrão, amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito tipo maisena. (ESTADELLA *et al.*, 2004). A composição centesimal da DP e DH pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição centesimal da dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DH)

| | Dieta padrão (DP) | Dieta Hiperlipídica (DH) |
|---------------------------------|-------------------|--------------------------|
| Proteínas (%) | 19 | 20 |
| Carboidratos (%) | 56 | 48 |
| Lipídeos (%) | 3,5 | 20 |
| Celulose (%) | 4,5 | 4 |
| Vitaminas e minerais (%) | 5 | 5 |
| Valor energético (kJ/g) | 17,03 | 21,40 |

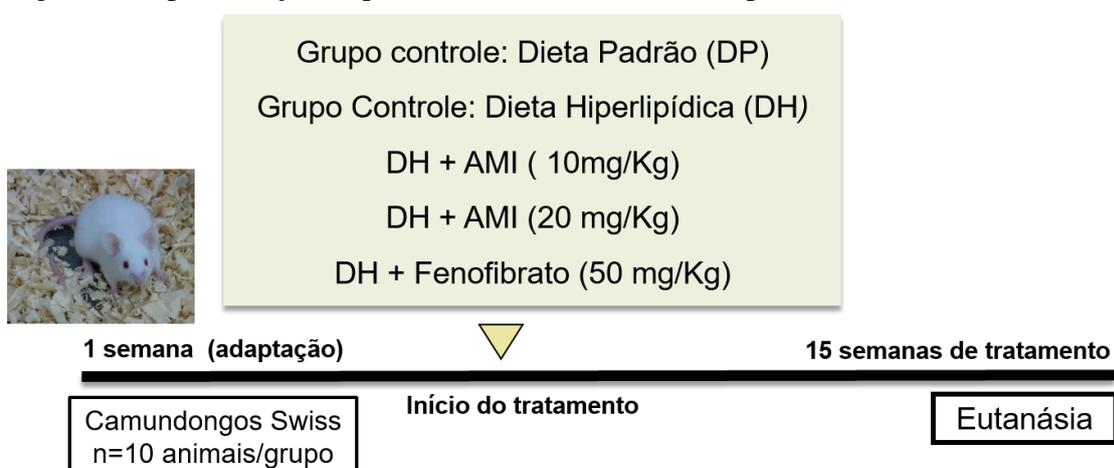
Fonte: Estadella *et al.*, 2004

A dieta hiperlipídica foi preparada no Laboratório de Farmacotécnica do Curso de Farmácia da UFC, sob supervisão do Prof. Dr Said Gonçalves da Cruz Fonseca.

4.6. Protocolo experimental

Os animais foram inicialmente ambientados por uma semana, tendo livre acesso a ração padrão e água *ad libitum*. Após esse período os animais foram divididos em grupos de 10 animais cada, de acordo com o peso corporal, sendo divididos em cinco grupos. 1º Grupo: Controle que recebeu a ração padrão (DP); 2º Grupo: Controle que recebeu a dieta hiperlipídica (DH); 3º Grupo: DH + α , β -amirina (10 mg/kg); 4º Grupo: DH + α , β -amirina (20 mg/kg); 5º Grupo: DH + Lipidil® (Fenofibrato), dose de 50mg/Kg. (Figura 5)

Figura 5. Representação esquemática do delineamento experimental



Forte: autor

A mistura de α , β -amirina e do fenofibrato foram inicialmente solubilizados em 2% Tween 80 e posteriormente em água. O controle DH recebeu o mesmo volume de

veículo (2% Tween 80 na água de beber). As doses das amirinas foram escolhidas por serem aquelas que mostraram melhores resultados no modelo de obesidade por dieta hiperlipídica (CARVALHO *et al.* 2016; CARVALHO *et al.* 2017).

O consumo de água e ração foi registrado diariamente e totalizando ao final de cada semana em mL/semana e g/semana, respectivamente. O peso corporal absoluto (g) dos animais foi registrado duas vezes por semana. O experimento teve a duração de 15 semanas e ao final deste período os animais foram colocados em jejum de 8h para coleta de sangue e após a coleta, os animais foram eutanasiados para coleta do fígado. O soro e o fígado foram estocados a -80°C (DE MELO *et al.*, 2009; DE MELO *et al.*, 2010; RAO *et al.*, 2011).

4.7. Análises murinométricas e eficiência alimentar

Foi realizado as medidas murinométricas como descrito por Nery *et al.* 2011. Foi avaliado o ganho de peso durante as 15 semanas de tratamento e o percentual de ganho de peso na 15ª semana de tratamento.

Foi realizado a coleta do fígado e das gorduras subcutânea, visceral e subescapular após a eutanásia dos animais. A gordura subcutânea foi extraída da região inguinal dos camundongos, visceral da região epididimal e subescapular (marrom) da região subescapular dos camundongos, mimetizando assim, as principais regiões de depósito de gordura nos seres humanos.

4.8. Análises plasmáticas séricas

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 3500g durante 15 min para se obter o soro e este armazenado a -80°C para posterior dosagens bioquímicas. Foram dosados os níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), atividade da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e glicose, os quais, foram dosados seguindo as recomendações do fabricante (LabTest®).

A Insulina plasmática foi quantificada por Elisa, utilizando kit específico (Millipore®, Billerica, MA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

A resistência à insulina foi avaliada pelo modelo da homeostase (HOMA-IR), onde foram calculados como a glicose sérica em jejum (mmol / L) × insulina sérica em jejum (mU / L) /22.5 (CAI *et al.*, 2005)

4.9. Avaliação dos níveis hepáticos de lipídios totais

Os lipídios hepáticos foram extraídos do tecido hepático, utilizando o método de Enternman *et al.* (1957). Foi realizado o homogenato a 10 % (p/v) com álcool etílico e éter (3:1) e com auxílio de um triturador de tecido o homogenato. O homogenato foi levado ao banho seco a 65°C, por 1 hora, e centrifugado a 2000 rpm, por 10 min. O sobrenadante foi concentrado em uma estufa a 95° C e ressuspenso em álcool isopropílico e foi determinada as concentrações de triglicerídeos e colesterol total, utilizando kits bioquímicos (LabTest®), seguindo as recomendações do fabricante.

4.10. Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal (TTGI) e Teste de Tolerância à Insulina Intraperitoneal (TTII)

Os testes de TTGI (Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal) e TTII (Teste de Tolerância à Insulina Intraperitoneal) foram realizados na 14ª semana, com o intervalo de 72 h. Para o TTGI os animais, em jejum de 6h, receberam glicose (2 g/kg, i.p.) e a glicemia foi determinada nos tempos 0 (antes da administração), 15, 30, 60, 90 e 120 min após a administração da glicose. Para o teste de tolerância à insulina intraperitoneal (TTII) os animais, em jejum de 4h, receberam insulina regular humana (0,75UI/kg, i.p.) e a glicemia foi determinada nos tempos 0 (antes da administração), 15, 30, 60, 90 e 120 min após a administração da insulina. O sangue foi coletado da veia caudal e a glicemia foi quantificada em glicosímetro (Accu-Chek®, Bayer). Foi determinada a área sob a curva de cada teste (ANDRIKOPOULOS *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2017).

4.11. Avaliação dos marcadores do estresse oxidativo

4.11.1. Malondialdeído (MDA)

O tecido hepático, foi utilizado para determinar a peroxidação lipídica por mensuração do malondialdeído (MDA) usando o método descrito por Agar *et al.* (1999) com algumas modificações. O fígado foi pesado e homogeneizado em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7), na proporção de 10% (p/v). Em seguida o homogenato foi centrifugado a 10000 rpm, durante 5 min, a 4 °C. Alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram misturadas com ácido acético 20% e ácido 2-tiobarbitúrico 0,5%. A mistura foi transferida para o banho-maria, com temperatura de 95°C, onde ficou durante 1 h, e sequencialmente para o banho de gelo onde ficou durante 30 min. Em seguida recebeu

dodecil sulfato de sódio (SDS, 8,1%) e foi centrifugada a 12000 rpm, durante 15 min, a 25 °C. A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda em 532 nm. A curva padrão foi obtida usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão. Os resultados foram expressos em nanomols de MDA por miligramas de tecido (nmol/mg de tecido).

4.11.2. Glutaciona reduzida (GSH)

O tecido hepático, foi utilizado para determinar a concentração da GSH utilizando o método descrito por Sedlak *et al.* (1988) com algumas modificações. O fígado foi pesado e homogeneizado em EDTA (0,02 M), na proporção de 10% (p/v). Em seguida alíquotas de 40 µL do homogenato foi adicionado a 50µL de água e 10µL de ácido tricloroacético (TCA) 50%. O homogenato foi centrifugado a 5000 rpm, 15 min, 4° C, e o sobrenadante foi utilizado para a reação com o reagente de Ellman, o 5,5´ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB). A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda em 412 nm. A curva padrão foi obtida usando a GSH como padrão. A quantificação de proteína foi determinada de acordo com o descrito pelo método de Lowry (1951). Os resultados foram expressos em microgramas de GSH por nanograma de proteína (µg/ng de proteína).

4.12. Determinação de glicogênio hepático

Inicialmente 200 mg de tecido hepático foram pesados e homogeneizados (p/v) em KOH 30%. O homogenato foi mantido em banho-maria por 20 min e em seguida foi resfriado em banho de gelo. Foram adicionados 1,25 mL de etanol 95%, agitado em vórtex e deixado em banho-maria, evitando a ebulição do conteúdo, por 2 min. Após esse período, foi centrifugado durante 15 min, a 3000 rpm, separado o sobrenadante e adicionado 1 mL de água destilada ao precipitado. Para a reação colorimétrica, foi adicionado 1mL de homogenato em 2 mL do reagente Antrona (0,2 g de Antrona em H₂SO₄ 95%) e homogeneizado em agitador vórtex. Em seguida foi colocado em banho-maria, por 10 min, e resfriado em banho de gelo. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 620 nm. O resultado foi expresso em mg de glicogênio/ 100mg de tecido (CARROLL, LONGLEY, ROE, 1956).

4.13. Análise histológica hepática

Os fígados removidos foram embebidos em solução tampão de formaldeído a 10% para fixação. Após o período de fixação, os tecidos foram desidratados em etanol e embebidos em parafina, e então foram seccionados (4µm) e corados com hematoxilina e eosina. A esteatose foi avaliada usando o escore de DHGNA (estabelecido pela NASH Clinical Research Network (CRN), que é uma soma não ponderada de pontuação da porcentagem de esteatose (grau 0: ausente; grau 1: até 30%; grau 2: até 60% e grau 3: até 90%), a atividade inflamatória lobular foi avaliada com base no número de focos inflamatórios (considerado células neutrofílicas e mononucleares) por campo (0: ausente; 1: discreto infiltrado inflamatório; 2: moderado infiltrado inflamatório e 3: intenso infiltrado inflamatório) e balonização (0: ausente; 1: discreta e 2: moderada) (KLEINER *et al.*, 2005). Todas as análises foram realizadas por patologista habilitado, Prof^a Dr^a. Ana Paula Negreiros Nunes Alves, sem conhecimento prévio dos grupos, para evitar interferência nos resultados.

4.14. Coloração do tecido hepático por *Oil red O*

A fim de avaliar o acúmulo de gordura no tecido hepático, fragmentos do mesmo foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C até a microtomia, onde foi realizado a inclusão em Tissue-Tek O.C.T. Cortes congelados com 5 µm de espessura foram obtidos em criostato em lâminas silanizadas. Em seguida os cortes foram fixados em álcool isopropílico 60% absoluto por 3 min e corados com solução de *Oil Red O* 0,5%, por 30 min, em temperatura ambiente, diferenciado em hematoxilina de Meyer por 15 seg e lavado em água corrente por outros 3 min e finalmente as lâminas foram montadas com Entellan®. Por fim as lâminas foram observadas em microscópio óptico (modelo Axio Scope.A1, Zeiss, Alemanha) e 20 imagens de cada lâmina foram capturadas com aumento de 200x. A gotícula de gordura foi quantificada em porcentagem de área marcada com a cor vermelha, usando o sistema de deconvolução do software *ImageJ software* 1.43 e os resultados foram expressos como esteatose (% Área marcada) (MEHLEM *et al.*, 2013).

4.15. Expressão proteica hepática de AMPK, SREBP-1, PPARα e FAS

Os tecidos hepáticos foram pesados e homogeneizados em solução tampão RIPA gelado, na proporção de 10% (p/v). Foram adicionados ao tampão RIPA o coquetel inibidor de protease a 1:100 (v/v), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) a 2mM e o

ortovanadato de sódio a 1mM. O homogenato obtido foi centrifugado a 13.000 rpm, durante 15 min, em 4°C e o sobrenadante foi estocado a -80°C para posterior quantificação de proteínas totais. A quantificação de proteínas foi realizada por meio do método colorimétrico descrito por Lowry *et al.* (1951). Em seguida 50 µg de proteínas de cada amostra foi preparada com tampão de Laemmli 5x (1:5 v/v) e aquecido a 100° C, por 10 min, em banho seco e separadas no gel SDS-PAGE com concentração final de 8% de poli(acrilamida em tampão Tris-HCL 1,5 M, pH 8,8 (BioRad Laboratories) e separadas no gel SDS PAGE a 125 V e amperagem livre durante um tempo médio de 1:30 h em fonte elétrica (modelo PowerPac™, modelo HCPower Supply) à temperatura ambiente.

Ao término da corrida foi realizada a eletrotransferência das proteínas para uma membrana de fluoreto de de polivinilideno (PVDF) (Bio-RadImmu-Blot PVDF, BioRad Laboratories). Foi realizado um sanduiche composto por papeis filtro, esponja e a membrana pelo método de imersão (BioRad Laboratories, modelo MiniTrans Plot Modulo). A eletrotransferência foi realizada sob amperagem constante 0,4 A, voltagem livre e 4° C durante 2 horas. Para reduzir as ligações inespecíficas as membranas foram incubadas com solução de leite desnatado 5% em TBST 1x durante 2 horas. Em seguida as membranas foram lavadas em TBST 1x para a incubação por uma hora com anticorpo primário de interesse.

Os anticorpos primários utilizados tinham especificidade para reconhecer as seguintes proteínas de camundongos: SREBP-1 (Santa Cruz Biotechnology®), AMPK α (Cell Signaling Technology®) e AMPK fosforilada (Cell Signaling Technology®), FAS (Santa Cruz Biotechnology®), PPAR α (Santa Cruz Biotechnology®). O anticorpo primário anti β -actina (Cell Signaling Technology®) foi utilizado como padrão endógeno. Todos os anticorpos primários foram preparados em BSA 5% em TBST 1x na proporção de 1:1000. As membranas foram novamente submetidas a 5 lavagens com TBST 1x sob agitação moderada e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado com enzima peroxidase (Cell Signaling Technology®), diluído na proporção de 1:3000 em BSA 5% em TBST 1x. Para a detecção do FAS foi utilizado o anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado a peroxidase (Cell Signaling Technology®), diluído na proporção de 1:3000 em BSA 5% em TBST 1x.

Para detecção por quimioluminescência, foram utilizados 500 µL/membrana do reagente Amersham ECL™ Prime (GE Healthcare). O reagente foi incubado com as membranas no escuro por 5 minutos e a aquisição de imagens foi realizada no

equipamento ChemiDoc™ MP Image System. As imagens foram, então, analisadas através do Software ImageLab™ 5.1 (Bio-Rad). As membranas foram fotografadas por um captador de imagens ChemiDoc™ MP Imaging System (BIO-RAD) e para aquisição e edição das mesmas foi utilizado o programa Image Lab™ Software (versão 5.1). Após a normalização com β -actina, a média do grupo controle em cada membrana foi considerada como 1 e os resultados foram expressos como unidades arbitrárias.

4.16. Expressão do RNAm de FAS, ACC1 e CD36 no tecido hepático

As amostras de fígado foram congeladas a -80°C até o momento da extração. Foi realizado o homogenato com Qiazol (10% p/v) sendo homogeneizadas no aparelho TissueLyser LT. Em seguida foram adicionados 200 μL de clorofórmio, em cada homogenato, e foi realizado a extração manual de acordo com as especificações do fabricante (Thermo Fisher Scientific®). A fim de avaliar a qualidade do RNA extraído foi dosado (1 μL) em Nanodrop no comprimento de onda de 260 nm, sendo determinada pela razão entre os valores obtidos nas absorvâncias de 260/280 nm, onde os valores entre 1,8 - 2,0 indicam alto grau de pureza do RNA extraído (PAN *et al.*, 2002).

O RNA (1 μl) obtido foi reversamente transcrito em cDNA de acordo com as indicações do fabricante do *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermofisher). As condições do ciclo termal para a reação de transcrição reversa (RT-PCR) foram 25°C -10 min, 37°C -120 min e 85°C -5 minutos. Para a reação do PCR em tempo real foi utilizado o kit master mix *GoTaq*® contendo a sonda *SYBER green*® (PROMEGA). Foram realizados 40 ciclos no aparelho Mx3005p PCR System, com desnaturação em 95°C , por 15 segundos e anelamento/extensão em 59°C , por 60 segundos, para os *primers* ACC1, FAS, CD36 e Beta-actina. A sequência gênica dos *primers* e a temperatura de anelamento são mostrados na tabela 2. A curva de *melting* ou curva de dissociação foi utilizada para avaliar a especificidade dos *primers* na amplificação dos genes de interesse. Os dados foram analisados pela comparação do *Cycle threshold* (Ct) de cada amostra com as médias relativas à quantificação com o gene de referência (β -actina) para obtenção do delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2. Sequência gênica e temperatura de anelamento dos *primers* utilizados.

| Gene | Sequência | Temperatura de anelamento |
|----------------------------------|---|----------------------------------|
| CD36 | Forward 5' GCTTGCAACTGTCAGCACAT3' Reverse 5' GCCTTGCTGTAGCCAAGAAC 3' | 59° |
| FAS | Forward 5' CTGAGATCCCAGCACTTCTTGA 3' Reverse 5' GCCTCCGAAGCCAAATGAGTGA3' | 59° |
| ACC1 | Forward 5' CGCTCAGGTCACCAAAAAGAAT 3' Reverse 5' GTCCCGGCCACATAACTGAT 3' | 59° |
| β-actina | Forward 5'GGGAATGGGTCAGAAGGACTC3' Reverse 5'GGTGTGGTGCCAGATCTTCTC3' | 59° |

4.17. Análises Estatísticas

Os valores obtidos nos ensaios experimentais foram expressos como média \pm E.P.M. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via ou duas vias, seguida dos testes de Student Newman Keuls ou Bonferroni, respectivamente e para os danos não-paramétricos foi utilizado Kruskal Wallis, seguido por teste de Dunn. Os resultados obtidos da quantificação da RT-PCR foram avaliados se seguiam ou não uma distribuição normal, pelo teste de Kolmogorov–Smirnov. A diferença entre as médias da distribuição normal (dados paramétricos) foi analisada pelo teste t de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O programa utilizado na análise estatística foi o GraphPad Prism® 5.03.

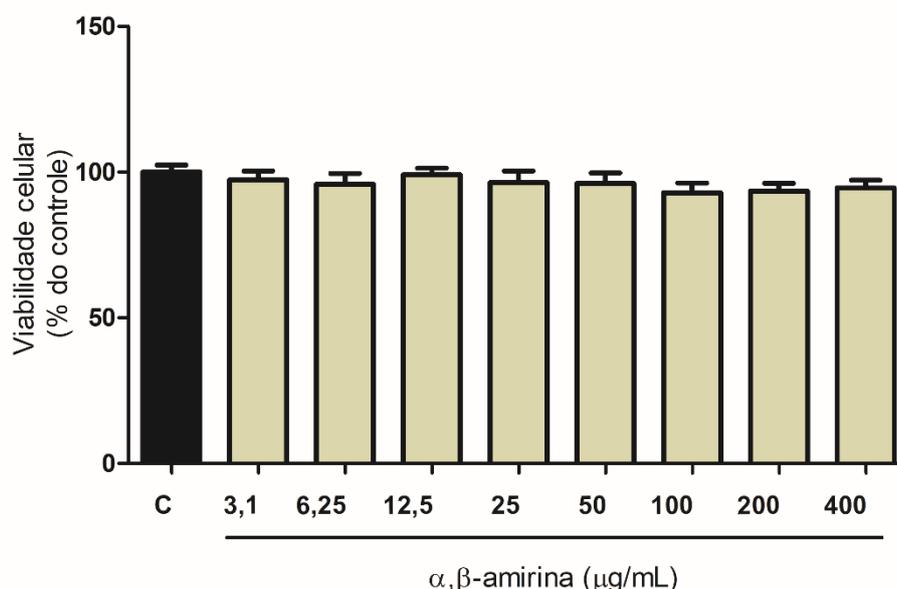
5. RESULTADOS

5.1. Avaliação do efeito da α , β amirina sobre a esteatose hepática induzida por ácido oleico *in vitro*

5.1.1. Efeito da α , β amirina na viabilidade celular em ensaio com MTT

Os resultados evidenciaram que a α , β amirina em todas as concentrações testadas de 3,1; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$, depois de 24 horas, não promoveu alterações na viabilidade de células HepG2, em ensaio com MTT, quando comparado com o grupo controle sem tratamento (Figura 6).

Figura 6. Efeito da α , β amirina sobre a viabilidade de células HepG2

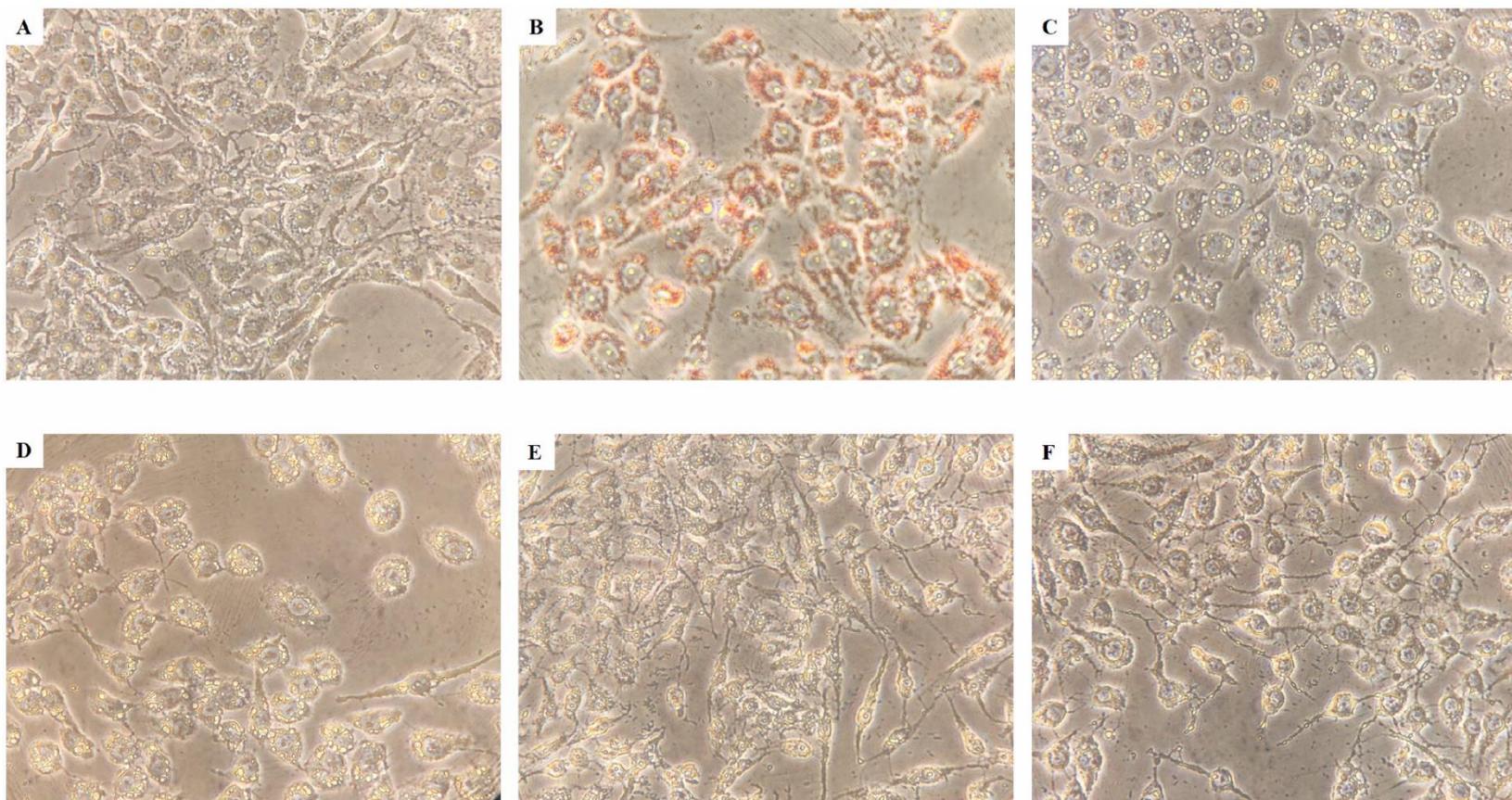


Os dados são expressos como média \pm E.P.M. e representam a porcentagem de viabilidade celular. C=controle sem tratamento (ANOVA “one way” pós-teste de Newman-Keuls)

5.1.2. Efeito da α , β -amirina sobre a esteatose hepática induzida por ácido oleico *in vitro* coradas com Oil Red O

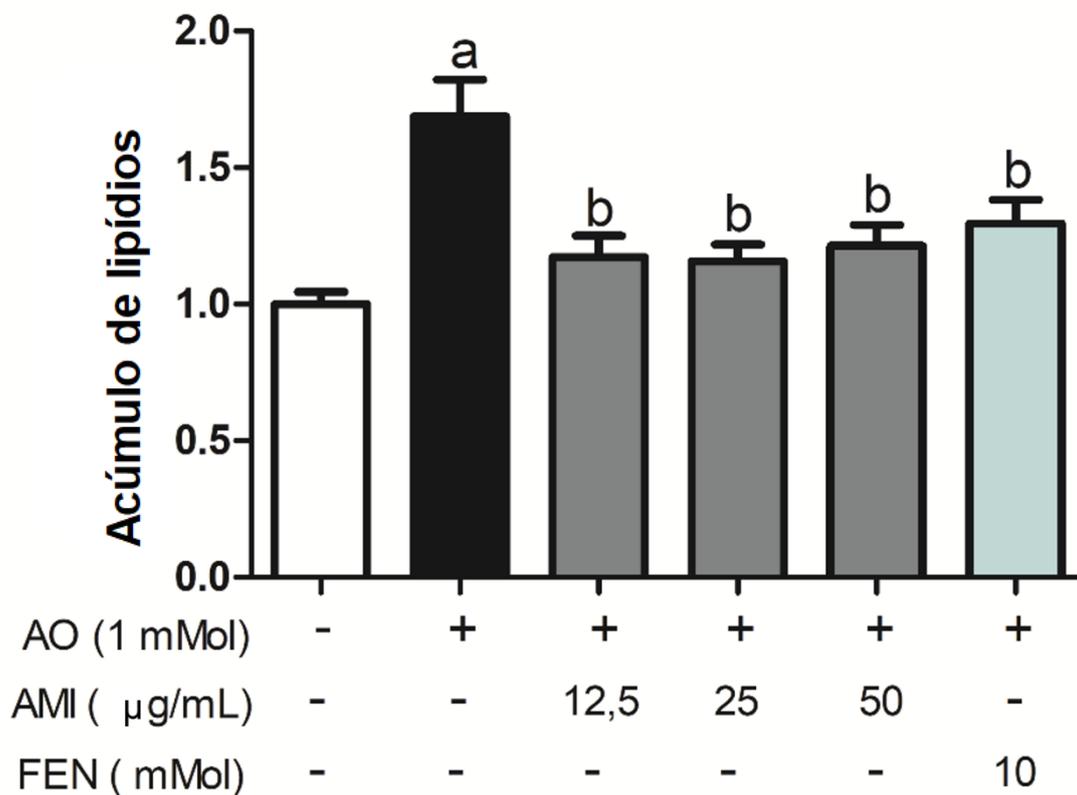
As células HepG2 foram submetidas ao protocolo de esteatose hepática induzida por ácido oleico e tratadas com α , β -amirina durante 24 horas. As células foram coradas com Oil Red O e fotografadas ao microscópio 24 horas após o tratamento (Figura 7). A análise microscópica seguida pela coloração com Oil Red O nos hepatócitos mostra que a α , β -amirina nas concentrações de 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ e fenofibrato na concentração de 10 nMol reduziu o acúmulo de lipídeo nas células quando comparadas ao grupo AO em aproximadamente 34, 44, 68 e 75%, respectivamente (Figura 8).

Figura 7. Efeito de α , β -amirina (AMI) sobre o acúmulo de lipídeos em células HepG2 submetidas à coloração com Oil Red O



Fotomicrografias de células HepG2 tratadas com α , β - amirina após indução da esteatose hepática com ácido oleico coradas com *Oil Red O* (aumento 400x). Controle (A), ácido oleico (AO); (B), AO + AMI 12,5 μ g/mL (C); AO + AMI 25 μ g/mL (D); AO + AMI 50 μ g/mL (E) e AO + FEN 10mMol (F).

Figura 8. Efeito de α , β -amirina (AMI) sobre o acúmulo de lipídeos em células HepG2 submetidas à coloração com *Oil Red O*



Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). AO (ácido oleico), AMI (alfa e beta-amirina), FEN (fenofibrato). ^a $p < 0,05$ vs controle (BSA), ^b $p < 0,05$ vs AO (ANOVA e teste de Student Newman Keuls).

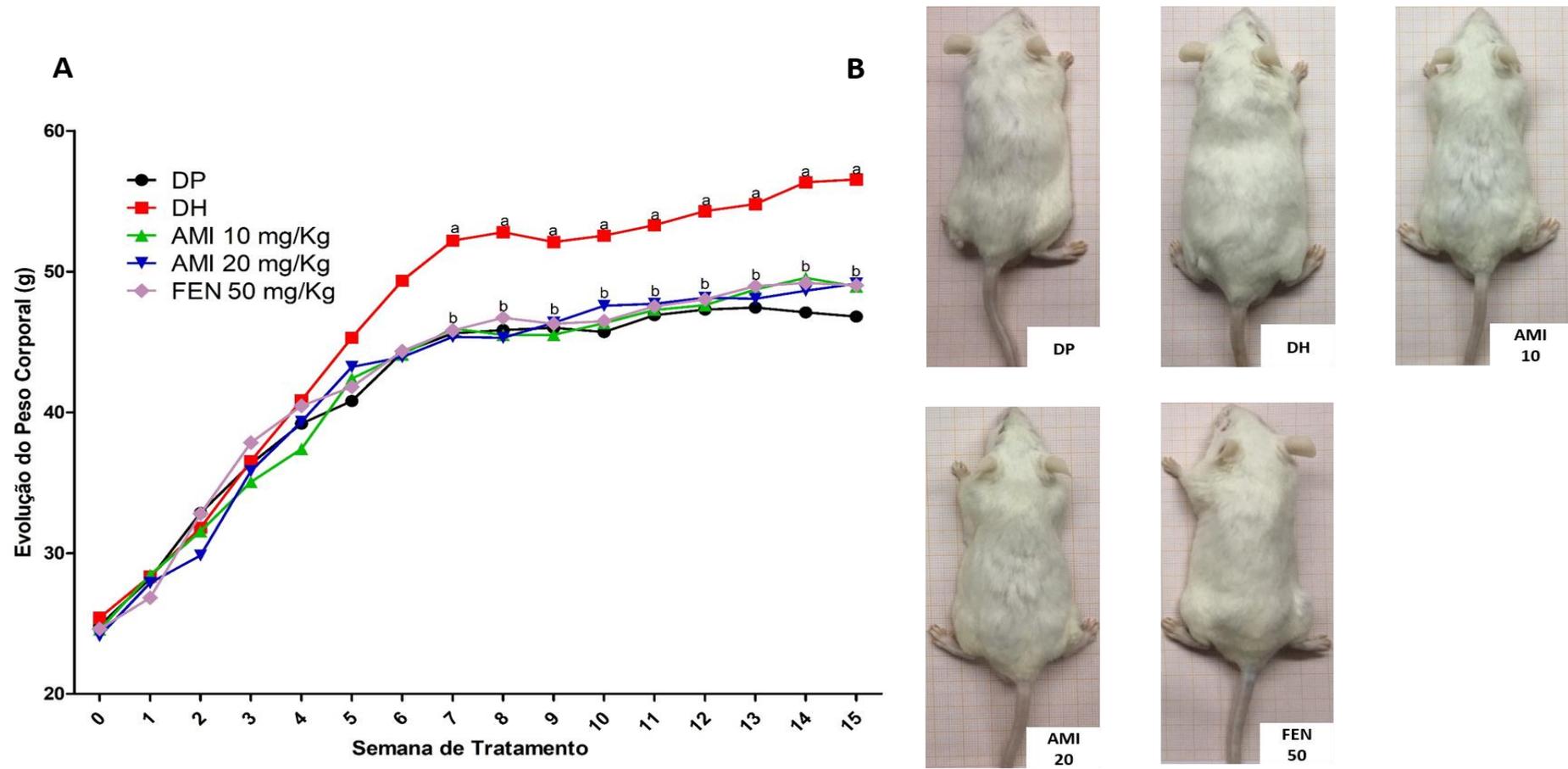
5.2. Efeito da α , β -amirina (AMI) no peso corporal, medidas murinométricas, eficiência alimentar e consumo de ração e água /

Ao início do experimento, todos os grupos experimentais apresentavam a mesma média de peso corporal (Tabela 2). Ao final da 15ª semana, o grupo DH apresentou um aumento de 19,22% do peso corporal ($57,22 \pm 1,44\text{g}$) em relação ao grupo DP ($46,22 \pm 0,72\text{g}$). AMI 10 e 20 mg/Kg e Fenofibrato (FEN) 50 mg/Kg reduziram significativamente o peso corporal dos animais em 16,32; 14,12 e 18,17%, respectivamente, quando comparado ao grupo DH (Tabela 2 e Figura 9)

Assim como no ganho de peso, na 15ª semana avaliamos o percentual de ganho de peso dos animais no grupo DH ($103,8 \pm 6,37\%$) em relação ao grupo DP ($93,78 \pm 2,15\%$). AMI (10 e 20 mg/Kg) e FEN (50 mg/Kg) reduziram significativamente o percentual de ganho de peso ($98,48 \pm 3,18\%$, $103,8 \pm 6,37\%$ e $98,48 \pm 3,18\%$ respectivamente) quando comparados com o grupo DH (Tabela 2).

Os camundongos do grupo DH apresentaram um aumento significativo do consumo de ração ($51,37 \pm 2,68$ g/semana) em relação ao grupo DP ($44,95 \pm 1,08$ g/semana). Os tratamentos com AMI (10 e 20 mg/kg) e FEN (50 mg/kg) reduziram significativamente o consumo de ração dos animais em relação aos animais do grupo DH. Os camundongos do grupo DH apresentaram um aumento significativa do consumo de água ($51,37 \pm 2,68$ mL) em relação ao grupo DP ($44,95 \pm 1,08$ mL). Os tratamentos com AMI (10 e 20 mg/kg) e FEN (50 mg/kg) reduziram significativamente o consumo de água dos animais em relação aos animais do grupo DH (Tabela 2).

Figura 9. Evolução do peso corporal na doença hepática gordurosa não-álcoolica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.



A: Evolução da massa corporal dos camundongos tratados no período de 15 semanas. B: Fotografia dos animais na 15ª semana. Os valores são expressos como média. ANOVA “two way” pós-teste de Bonferroni. DP (dieta padrão), DH (dieta hiperlipídica), AMI (alfa e beta-amirina), FEN (fenofibrato). ^ap<0,05 vs DP, ^bp<0,05 vs DH

Tabela 2. Efeito da α , β -amirina (AMI) no peso corporal, consumo de ração, consumo de água na doença hepática gordurosa não-alcoolica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.

| | DP | DH | DH +AMI 10 mg/Kg | DH + AMI 20 mg/Kg | DH + FEN 50 mg/Kg |
|---------------------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Peso corporal inicial (g) | 24,85 \pm 0,18 | 25,56 \pm 0,34 | 24,72 \pm 0,23 | 24,93 \pm 0,33 | 24,60 \pm 0,90 |
| Peso corporal final (g) | 46,22 \pm 0,72 | 57,22 \pm 1,44 ^a | 47,88 \pm 0,98 ^b | 49,14 \pm 2,63 ^b | 46,82 \pm 1,70 ^b |
| Percentual de ganho de peso (%) | 93,78 \pm 2,15 | 128,5 \pm 2,12 ^a | 98,48 \pm 3,18 ^b | 103,8 \pm 6,37 ^{a,b} | 98,48 \pm 3,18 ^{a,b} |
| Consumo de água (mL/semana) | 66,7 \pm 1,67 | 44,59 \pm 2,63 ^a | 63,67 \pm 2,45 ^b | 68,56 \pm 4,56 ^b | 60,35 \pm 1,45 ^b |
| Consumo de ração (g/semana) | 44,95 \pm 1,08 | 51,37 \pm 2,68 ^a | 37,48 \pm 1,41 ^b | 39,47 \pm 1,92 ^b | 42,12 \pm 1,33 ^b |

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. DP (dieta padrão), DH (dieta hiperlipídica), AMI ($\alpha\beta$ -amirina), FEN (fenofibrato). ^ap<0,05 vs DP, ^bp<0,05 vs DH (ANOVA e teste de Student Newman Keulss)

5.3. Efeito da α , β -amirina (AMI) no peso do fígado e da gordura visceral, subescapular e subcutânea

Os camundongos do grupo DH apresentaram um aumento significativo do peso do fígado ($507,2 \pm 14,05$ mg/10g) em relação ao grupo DP ($427,5 \pm 11,03$ mg/10g). Os tratamentos com AMI (10 e 20 mg/kg) e FEN (50 mg/kg) reduziram significativamente o peso do fígado ($363,3 \pm 12,58$, $369,9 \pm 14,48$ e $415,3 \pm 18,45$ mg/10g, respectivamente) em relação aos animais do grupo DH (Tabela 3).

Em relação a deposição de gordura, os camundongos do grupo DH apresentaram um aumento significativo do tecido adiposo visceral, subescapular e subcutâneo em 87,31%, 86,16% e 83,32% respectivamente, em relação ao grupo DP. Os tratamentos com AMI 10 mg/Kg reduziu a deposição de gordura visceral, subescapular e subcutâneo (39,37%, 65,52% e 62,59%, respectivamente), assim como, AMI 20 mg/Kg (43,43%, 31,23%, 46,73%, respectivamente) e fenofibrato 50 mg/Kg (67,74%, 71,46% e 68,96%, respectivamente) em relação ao grupo DH (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da α , β -amirina (AMI) no peso do fígado e da gordura visceral, subescapular e subcutânea na doença hepática gordurosa não-alcoólica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.

| | DP | DH | DH +AMI 10 mg/Kg | DH + AMI 20 mg/Kg | DH + FEN 50 mg/Kg |
|-------------------------------|---------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Fígado (mg/10g) | 427,5 ± 11,03 | 507,2 ± 14,05 ^a | 363,3 ± 12,58 ^b | 369,9 ± 14,48 ^b | 415,3 ± 18,45 ^b |
| Gordura Visceral (mg/10g) | 92,47 ± 29,35 | 729,1 ± 20,50 ^a | 442 ± 32,84 ^{a,b} | 412,4 ± 40,81 ^{a,b} | 235,2 ± 43,42 ^{ab} |
| Gordura Subescapular (mg/10g) | 22,67 ± 4,29 | 163,9 ± 8,82 ^a | 56,51 ± 4,92 ^{a,b} | 112,7 ± 13,70 ^{a,b} | 46,77 ± 10,70 ^{a,b} |
| Gordura Subcutânea (mg/10g) | 42,66 ± 5,64 | 255,9 ± 19,03 ^a | 95,71 ± 12,97 ^{a,b} | 136,3 ± 17,2 ^{a,b} | 79,10 ± 15,43 ^{a,b} |

Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. DP (dieta padrão), DH (dieta hiperlipídica), AMI (alfa e beta-amirina), FEN (fenofibrato). ^ap<0,05 vs DP, ^bp<0,05 vs DH (ANOVA e teste de Student Newman Keuls).

5.4. Efeito da α , β -amirina (AMI) nos parâmetros bioquímicos plasmáticos

Os níveis de glicose ($174,3 \pm 13,21$ mg/dL) e insulina ($4,52 \pm 0,60$ ng/mL) e o índice de HOMA-IR ($46,30 \pm 5,67$) foram significativamente elevados no grupo dos animais tratados com a DH quando comparado com os animais que receberam a DP ($91,71 \pm 8,69$ mg/dL, $1,50 \pm 0,21$ ng/mL e $8,25 \pm 1,63$, respectivamente). AMI (10 e 20 mg/kg) e FEN 50 mg/Kg reduziram significativamente os níveis de glicose, insulina e o índice de HOMA-IR em relação ao grupo DH (Tabela 4).

A DH aumentou significativamente a atividade enzimática de ALT ($79,12 \pm 3,75$ U/L) e AST ($189,5 \pm 5,99$ U/L) quando comparado aos animais que receberam a DP ($46,53 \pm 0,94$ U/L e $48,46 \pm 2,03$ U/L respectivamente). AMI (10 e 20 mg/kg) e FEN 50 mg/Kg reduziram significativamente a atividade enzimática de ALT e AST em relação ao grupo DH (Tabela 4).

Em relação ao perfil lipídico, os níveis de colesterol total, LDL e triglicérides foram aumentados significativamente nos animais que receberam a DH ($144,3 \pm 5,44$ mg/dL; $54,32 \pm 3,33$ mg/dL e $93,50 \pm 7,88$ mg/dL, respectivamente) em relação ao grupo DP ($95,44 \pm 3,73$ mg/dL; $25,20 \pm 4,67$ mg/dL e $75,75 \pm 1,52$ mg/dL, respectivamente). AMI e FEN reduziram significativamente os níveis de colesterol total, LDL e triglicérides em relação ao grupo DH. Não houve diferença estatística nos níveis plasmáticos de HDL entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito da α , β -amirina (AMI) sob parâmetros plasmáticos na doença hepática gordurosa não-alcoólica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.

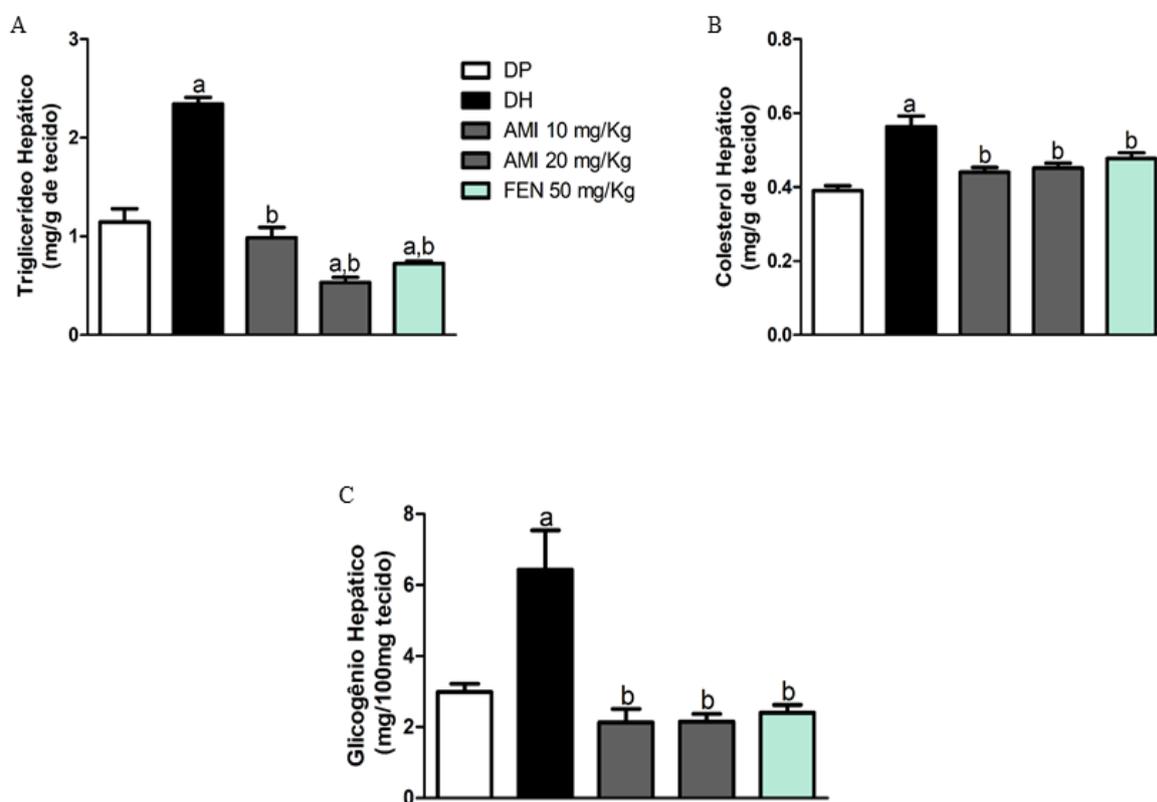
| | DP | DH | DH +AMI 10 mg/Kg | DH + AMI 20 mg/Kg | DH + FEN 50 mg/Kg |
|--------------------------|--------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Glicose (mg/dL) | 91,71± 8,69 | 174,3 ± 13,21 ^a | 83,67 ± 4,91 ^b | 100,5 ± 9,80 ^b | 98,89 ± 14,34 ^b |
| Insulina (ng/mL) | 1,50 ± 0,21 | 4,52 ± 0,60 ^a | 2,16 ± 0,55 ^b | 1,91 ± 0,36 ^b | 1,73 ± 0,40 ^b |
| HOMA-RI | 8,25 ± 1,63 | 46,30 ± 5,67 ^a | 10,38 ± 2,74 ^b | 12,04 ± 2,36 ^b | 7,52 ± 2,37 ^b |
| ALT (U/L) | 46,53 ± 0,94 | 79,12 ± 3,75 ^a | 51,08 ± 1,53 ^b | 51,87 ± 2,65 ^b | 52,37 ± 2,36 ^b |
| AST (U/L) | 48,46 ± 2,03 | 189,5 ± 5,99 ^a | 77,05 ± 4,19 ^b | 69,3 ± 4,66 ^b | 65,34 ± 4,29 ^b |
| Colesterol Total (mg/dL) | 95,44 ± 3,73 | 144,3 ± 5,44 ^a | 125,2 ± 10,03 ^{a b} | 111,5 ± 4,27 ^b | 93,12 ± 4,30 ^b |
| LDL (mg/dL) | 25,20 ± 4,67 | 54,32 ± 3,33 ^a | 43,32 ± 2,73 ^{ab} | 37,84 ± 2,42 ^b | 28,48 ± 5,50 ^b |
| VLDL (mg/dL) | 14,55 ± 0,52 | 18,17 ± 1,43 ^a | 11,54 ± 0,62 ^b | 12,30 ± 0,62 ^b | 13,53 ± 1,44 ^b |
| HDL (mg/dL) | 71,00 ± 2,14 | 73,17 ± 2,30 | 80,33 ± 6,70 | 69,17 ± 3,66 | 67,96 ± 2,78 |
| Triglicerídeos (mg/dL) | 75,75 ± 1,52 | 93,50 ± 7,88 ^a | 60,00 ± 3,53 ^b | 69,00 ± 5,43 ^b | 71,17± 7,04 ^b |

Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. DP (dieta padrão), DH (dieta hiperlipídica), AMI (alfa e beta-amirina), FEN (fenofibrato). ^ap<0,05 vs DP, ^bp<0,05 vs DH (ANOVA e teste de Student Newman Keuls).

5.5. Efeito da α , β -amirina (AMI) nos parâmetros hepáticos.

Os camundongos do grupo DH apresentaram um aumento significativo nos níveis hepáticos de colesterol total, triglicerídeos e glicogênio ($144,3 \pm 5,44$ mg/g; $2,34 \pm 0,06$ mg/g e $6,42 \pm 1,16$ mg/100mg de tecido, respectivamente) em relação ao grupo DP ($95,44 \pm 5,44$ mg/g; $1,14 \pm 1,44$ mg/g tecido e $2,99 \pm 0,22$ mg/100mg de tecido, respectivamente). Os tratamentos com AMI (10 e 20 mg/kg) e FEN (50 mg/kg) reduziram significativamente os níveis hepáticos de colesterol total (13,2%; 22,73% e 35,46, respectivamente), triglicerídeos (57,86%; 77,35% e 69,23%, respectivamente) e glicogênio (66,82%; 65,88% e 66,61%, respectivamente) em relação aos animais do grupo DH (Figura 10)

Figura 10. Efeito da α , β -amirina sobre os níveis hepáticos de triglicerídeos, colesterol total e glicogênio na doença hepática gordurosa não-alcoólica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.

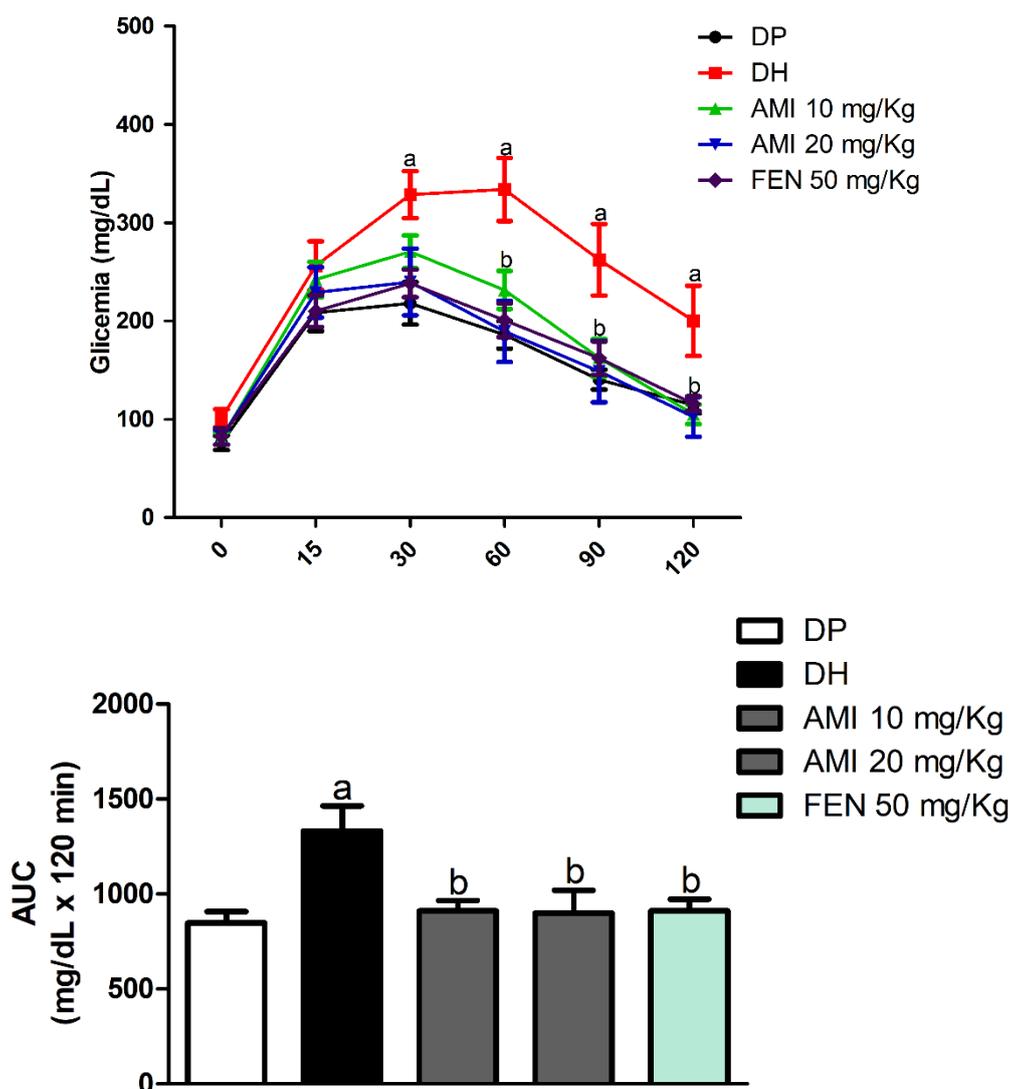


A: Triglicerídeos hepáticos; B: Colesterol hepático e C: Glicogênio hepático. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. DP (dieta padrão), DH (dieta hiperlipídica), AMI ($\alpha\beta$ -amirina), FEN (fenofibrato), ^a $p < 0,05$ vs DP, ^b $p < 0,05$ vs DH (ANOVA e teste de Student Newman Keuls)

5.6. Efeito da α , β -amirina (AMI) sobre a tolerância à glicose e à insulina

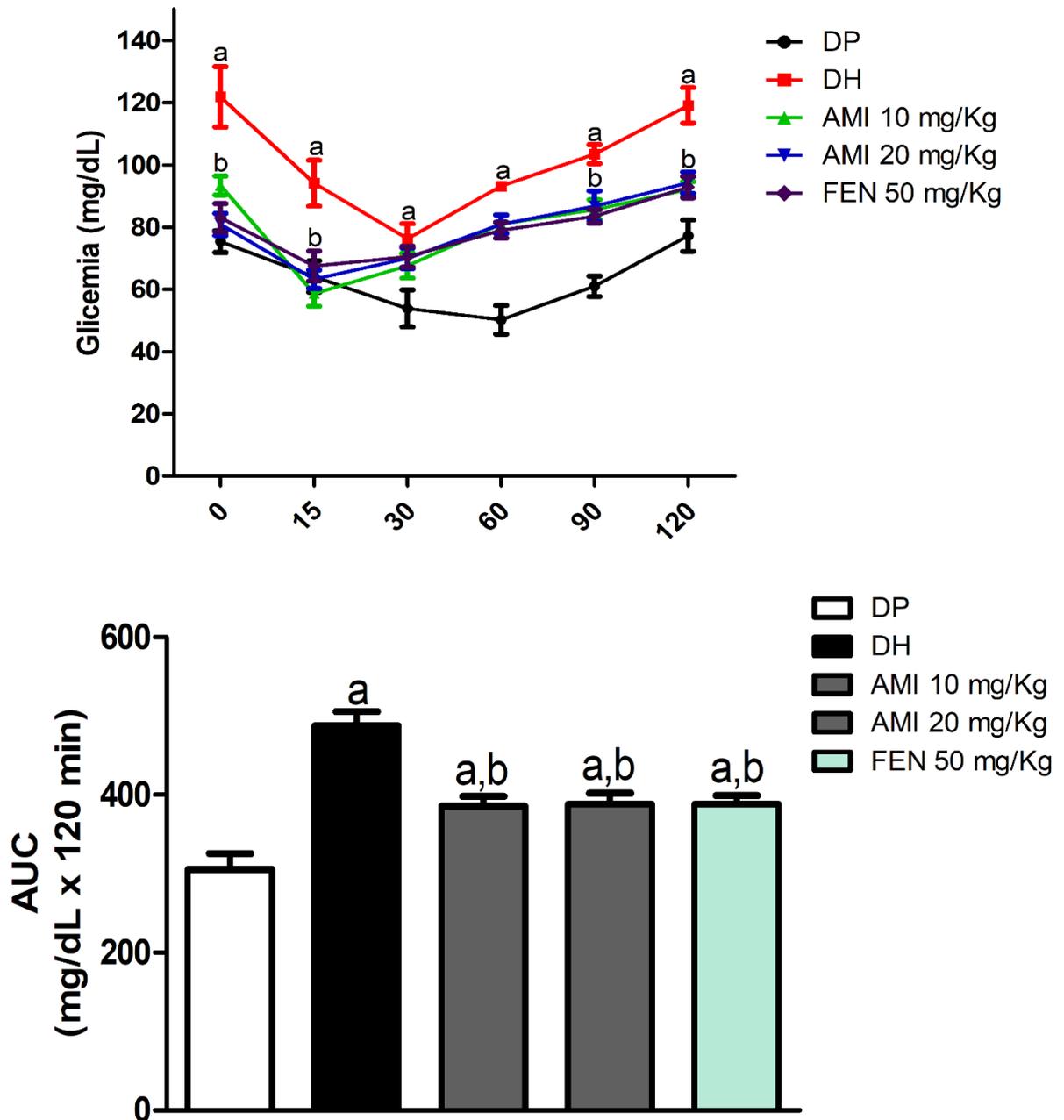
Os camundongos do grupo DH apresentaram um padrão hiperglicêmico durante o TTGI, e redução da tolerância à insulina no TTII, quando comparado ao grupo DP. Os tratamentos com AMI (10 e 20 mg/Kg) e FEN (50 mg/Kg) foram capazes de melhorar a tolerância à glicose e à insulina (Figura 11 e 13), sendo esse resultado evidenciado pela AUC do TTGI e TTII.

Figura 11. Efeito da α , β -amirina (AMI) sobre a tolerância à glicose na doença hepática gordurosa não-alcóolica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.



Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. DP (dieta padrão), DH (dieta hiperlipídica), AMI (α , β -amirina), FEN (fenofibrato), TTGI (Teste de tolerância à glicose intraperitoneal) e AUC (Área sob a curva). ^a $p < 0,05$ vs DP, ^b $p < 0,05$ vs DH. (Curva: ANOVA “two way” pós-teste de Bonferroni. AUC: ANOVA e teste de Student Newman Keuls).

Figura 12. Efeito da α , β -amirina (AMI) sobre a tolerância à insulina na doença hepática gordurosa não-alcoólica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.



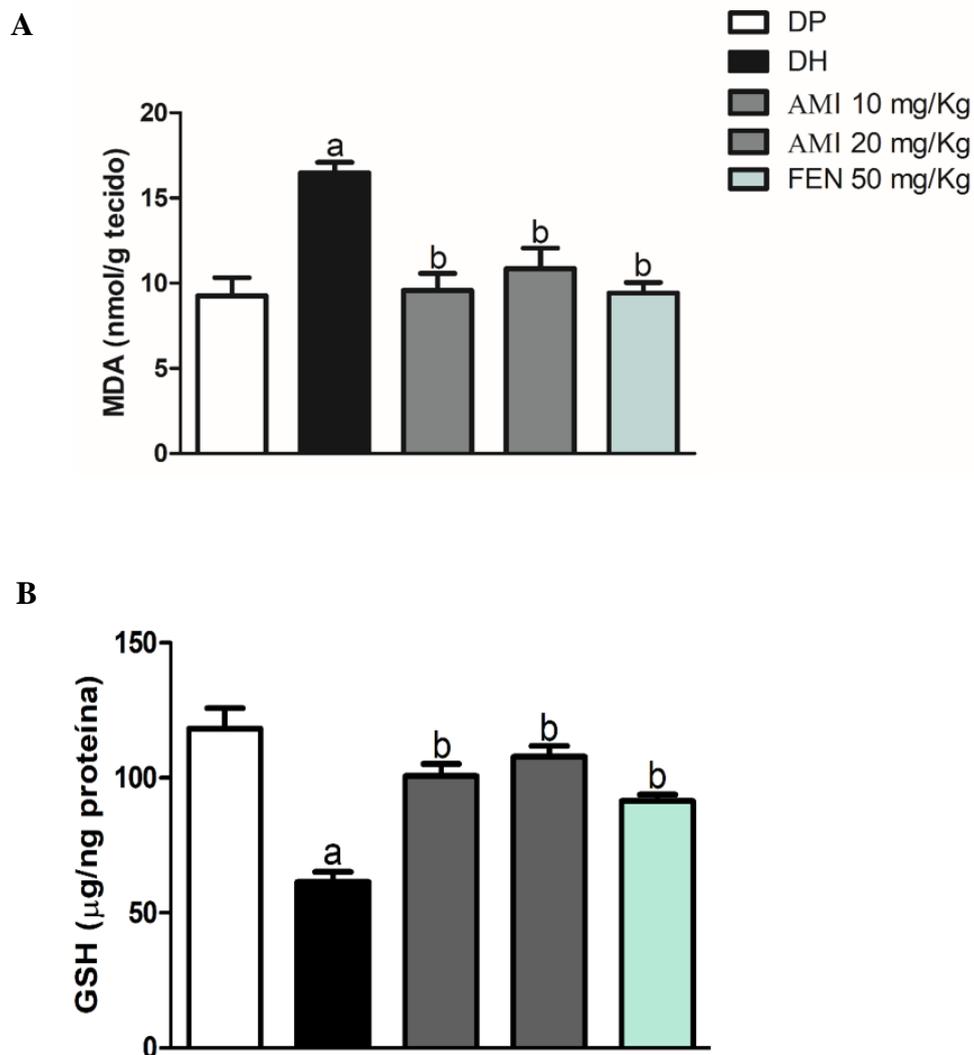
Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. DP (dieta padrão), DH (dieta hiperlipídica), AMI (α , β -amirina), FEN (fenofibrato), TTII (Teste de tolerância à insulina intraperitoneal) e AUC (Área sob a curva). ^a $p < 0,05$ vs DP, ^b $p < 0,05$ vs DH. (Curva: ANOVA “two way” pós-teste de Bonferroni. AUC: ANOVA e teste de Student Newman Keuls).

5.7. Efeito da α , β -amirina (AMI) sobre os níveis hepáticos de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH)

Os animais do grupo DH apresentaram um aumento significativo dos níveis de malondialdeído de 31,86% ($16,63 \pm 1,39$ nmol/mg de tecido), quando comparado com o grupo DP ($10,65 \pm 0,22$ nmol/mg de tecido). Os tratamentos com AMI (10 e 20 mg/Kg) e FEN (50 mg/Kg) foram capazes de reduzir significativamente os níveis de malondialdeído ($8,62 \pm 1,65$; $10,45 \pm 0,68$ e $9,16 \pm 0,84$ nmol/mg de tecido, respectivamente) quando comparado com o grupo DH (Figura 13 A).

Os animais do grupo DH apresentaram uma redução significativa dos níveis da GSH de 51,99% ($61,46 \pm 3,67$ mg/ng proteína), quando comparado com o grupo DP ($118,2 \pm 7,60$ mg/ng proteína). Os tratamentos com AMI (10 e 20 mg/Kg) e FEN (50 mg/Kg) foram capazes de aumentar significativamente os níveis de GSH ($100,7 \pm 4,44$; $107,8 \pm 3,97$ e $91,44 \pm 2,34$ mg/ng proteína, respectivamente) quando comparado com o grupo DH (Figura 13 B).

Figura 13. Efeito da α , β -amirina (AMI) sobre os níveis de MDA e GSH na doença hepática gordurosa não-alcoólica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.



Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. DP (dieta padrão), DH (dieta hiperlipídica), AMI (alfa e beta-amirina), FEN (fenofibrato), MDA (malonaldeído), GSH (glutaciona reduzida). ^a $p < 0,05$ vs DP, ^b $p < 0,05$ vs DH. (ANOVA e teste de Student Newman Keuls)

5.8. Efeito da α , β -amirina (AMI) sobre alterações histológicas hepática

Foi possível observar que no fígado do grupo DH houve um dano hepático evidente, com mudança de coloração e peso em comparação com o grupo DP. Todavia, o tratamento com AMI 10 e 20 mg/Kg e FEN 50 mg/Kg reverteu visualmente o dano hepático, como demonstrado na Figura 14.

Figura 14. Imagem do fígado *in situ*



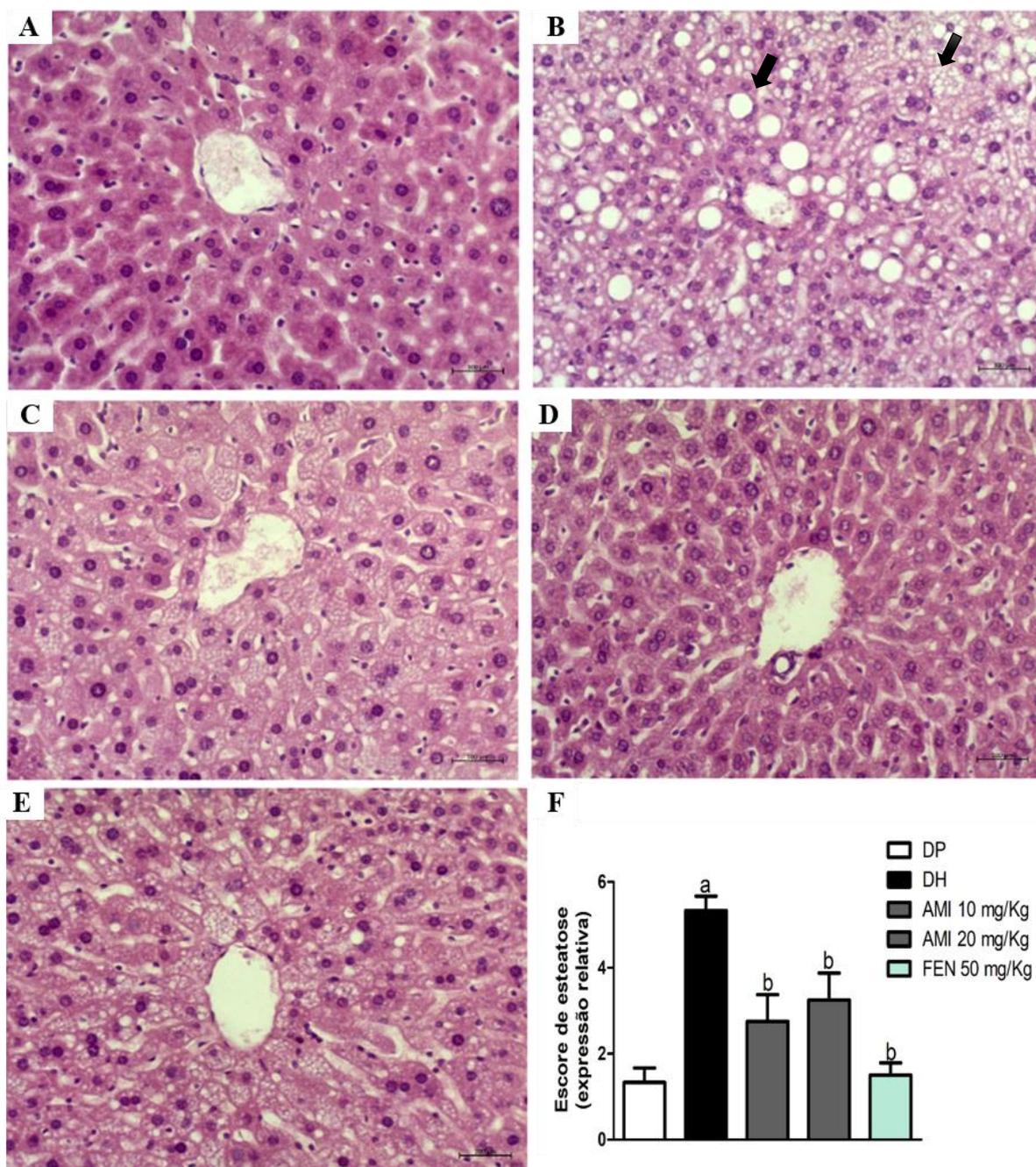
Fonte elaborado pelo autor

Camundongos do grupo Dieta Padrão (A), Dieta Hiperlipídica (B), α , β amirina 10mg/Kg (C), α , β amirina 20 mg/Kg (D) e Fenofibrato 50 mg/Kg (E).

O fígado dos animais alimentados com a dieta padrão (DP) não apresentavam depósito gorduroso em mais 5% dos hepatócitos e ausência de balonização, no entanto, em alguns dos animais houve presença de discreto infiltrado inflamatório e (Figura 15A). A dieta hiperlipídica (DH) não promoveu alteração arquitetural do órgão, no entanto, havia intensa degeneração gordurosa (esteatose) microvesicular e macrovesicular nos hepatócitos e todos os tecidos apresentavam intenso infiltrado inflamatório e focal balonização (Figura 15B). O tratamento com AMI (10 e 20 mg/kg) e FEN (50mg/kg) preveniu o desenvolvimento da esteatose, contudo foi observado discreto infiltrado inflamatório mononuclear, havendo em algumas amostras permanência de discreta a moderada degeneração gordurosa (esteatose) e em um dos animais do grupo AMI 20 mg/Kg discreta balonização (Figura 15C, 15D e 15E).

Os camundongos do grupo DH apresentaram uma densidade de volume de esteatose significativamente maior em relação ao grupo DP e o tratamento com AMI (10 e 20 mg/Kg) e FEN (50 mg/Kg) reduziu a densidade de volume de esteatose em relação ao grupo DH (Figura 15F).

Figura 15. Fotomicrografia representativa do fígado de animais submetidos a doença hepática gordurosa não-alcoólica em camundongos

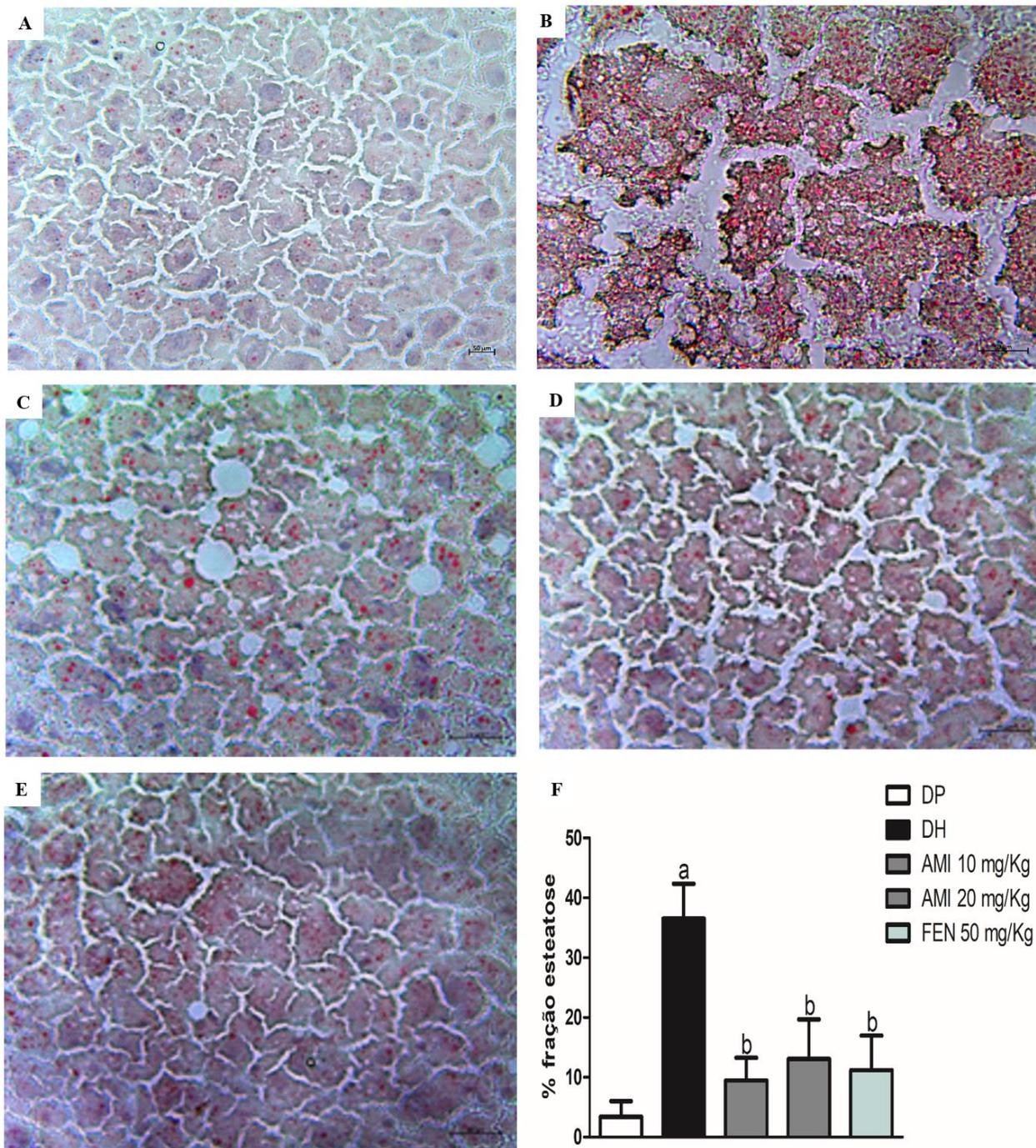


Dieta padrão (A), dieta hiperlipídica (B), AMI 10mg/kg (C), AMI 20mg/kg (D) e FEN 50mg/kg (E) (H&E, $\times 200$) e densidade de volume de esteatose hepática (F). Setas representativas mostrando macro e micro gotículas de gordura (esteatose) no grupo DH. Resultados expressos como média \pm E.P.M., ^a $p < 0,05$ comparado com o DP, ^b $p < 0,05$ comparado com o DH. (Teste de Kruskal-Wallis/Teste de Múltiplas comparações de Dunn).

5.8.1. Efeito da α , β -amirina sobre o acúmulo de lipídeos neutros em fígado crío preservado e submetido à coloração com *Oil Red O*

A técnica de coloração com *Oil Red O* permitiu verificar que os camundongos alimentados com a dieta hiperlipídica apresentaram um aumento na concentração de lipídios neutros no tecido hepático ($36,51 \pm 1,69$ %) em relação ao grupo DP ($3,4 \pm 0,83$ %). Os tratamentos com AMI (10 e 20 mg/Kg) e FEN (50 mg/Kg) foram capazes de reduzir significativamente a concentração de lipídios neutros no tecido hepático ($9,49 \pm 1,33$; $13,06 \pm 2,01$ e $11,18 \pm 1,74$ %, respectivamente) quando comparados com o grupo DH (Figura 16).

Figura 16. Fotomicrografia representativa do fígado de animais submetidos a coloração com *Oil red O*



Dieta padrão (A), dieta hiperlipídica (B), AMI 10mg/kg (C), AMI 20mg/kg (D) e FEN50mg/kg (E) corados com Oil Red O e densidade de volume de esteatose hepática (F) (200 X). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). ^a $p < 0,05$ vs DP, ^b $p < 0,05$ vs DH (ANOVA e teste de Student Newman Keuls).

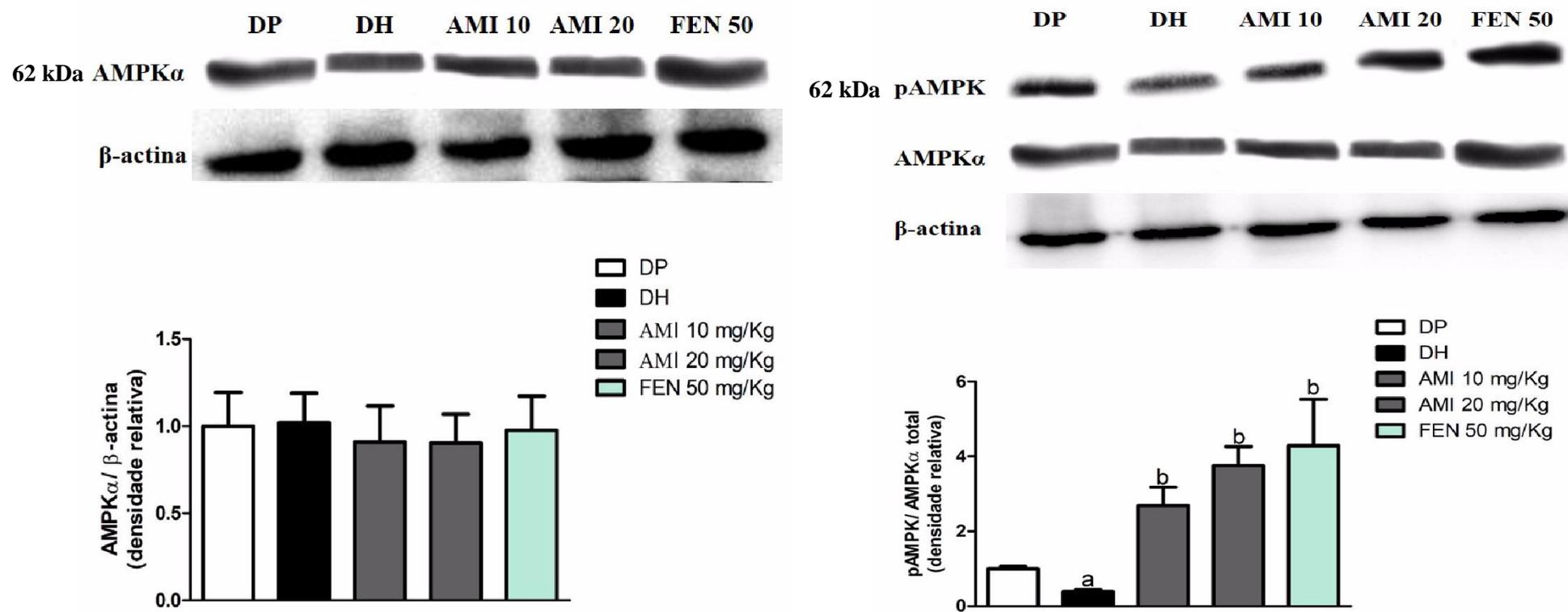
5.9. Análise do efeito da α , β -amirina sobre a expressão proteica hepática de AMPK α , pAMPK, SREBP1, PPAR α e FAS

A fim de confirmar o mecanismo pelo qual a AMI pode atenuar o acúmulo de lipídios induzido por DH, investigamos a expressão de proteínas envolvidas no transporte de ácidos graxos, lipogênese e oxidação lipídica. Como mostrado na Fig. 17 evidenciamos que não houve alteração da expressão do AMPK α total com a DH e tratamento com α , β -amirina, entretanto, a DH diminuiu significativamente a fosforilação do AMPK e os tratamentos com AMI (10 e 20 mg/K) e FEN (50mg/Kg) foram capazes de aumentar significativamente a sua fosforilação em relação ao grupo DH.

Para avaliar a expressão de proteínas que desempenham papéis essenciais na regulação de produtos gênicos responsáveis pela síntese de ácidos graxos, colesterol e triglicerídeos no fígado e que são modulados pela AMPK, investigamos a expressão do SREBP-1c e do PPAR α no tecido hepático. Como mostrado na Fig. 8 descobrimos que a expressão de SREBP1 no grupo DH foi significativamente aumentada em relação ao grupo DP e o tratamentos com AMI (10 e 20 mg/K) e FEN (50mg/Kg) foram capazes de diminuir significativamente a sua expressão em relação ao grupo DH. A expressão da proteína PPAR α no fígado teve uma redução significativa no grupo DH em comparação com o grupo DP e o tratamento com AMI (10 e 20 mg/K) e FEN (50mg/Kg) foi capaz de aumentar significativamente a sua expressão em relação ao grupo DH.

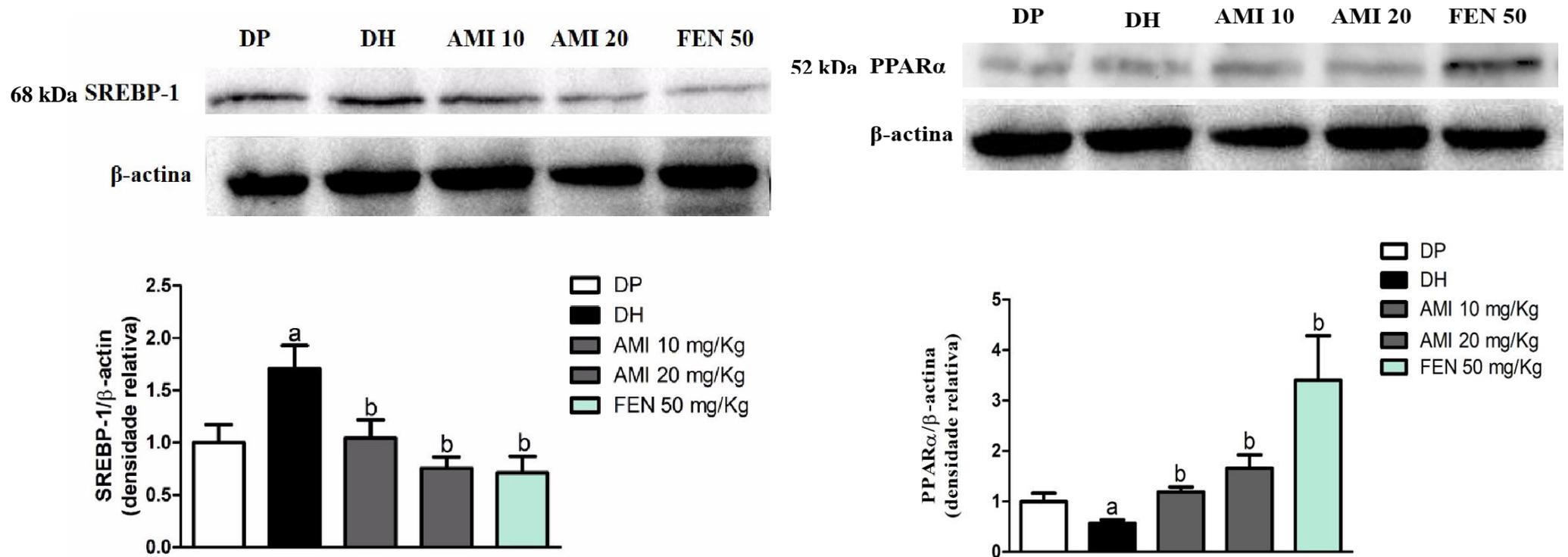
Para avaliar a expressão de proteína modulada pela expressão aumentada de SREBP-1c observada no estudo, investigamos a expressão da sintase de ácidos graxos (FAS) que regula genes necessários para a lipogênese e o transporte de ácidos graxos *de novo* no tecido hepático. Como mostrado na Fig. 19 foi observado, que a expressão da FAS no grupo DH foi significativamente aumentada em relação ao grupo DP e os tratamentos com AMI (10 e 20 mg/K) e FEN (50mg/Kg) foram capazes de diminuir significativamente a sua expressão em relação ao grupo DH, levando a uma diminuição da biossíntese lipídica e à prevenção do acúmulo de lipídios no tecido hepático.

Figura 17. Efeito da α , β -amirina sobre a expressões da proteína hepática de AMPK α e da sua forma fosforilada na doença hepática gordurosa não-alcoólica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.



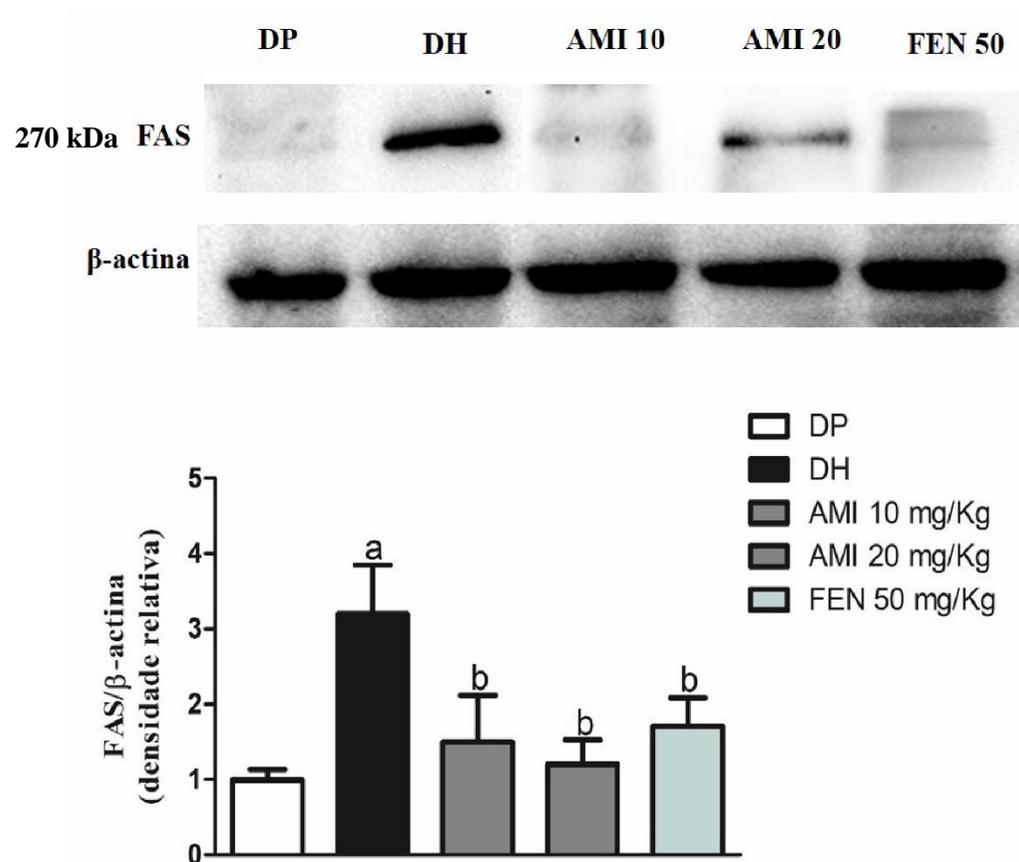
Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. As bandas de proteína foram quantificadas em relação à β -actina. DP (dieta padrão), DH (dieta hiperlipídica), AMI (alfa e beta-amirina), FEN (fenofibrato). ^a $p < 0,05$ vs DP, ^b $p < 0,05$ vs DH (ANOVA e teste de Student Newman Keuls).

Figura 18. Efeito da α , β -amirina sobre as expressões da proteína hepática de SREBP1 e PPAR α na doença hepática gordurosa não-alcoólica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos



Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. As bandas de proteína foram quantificadas em relação à β -actina. DP (dieta padrão), DH (dieta hiperlipídica), AMI (alfa e beta-amirina), FEN (fenofibrato). ^a $p < 0,05$ vs DP, ^b $p < 0,05$ vs DH (ANOVA e teste de Student Newman Keuls).

Figura 19. Efeito da α , β -amirina sobre a expressões da proteína hepática de FAS na doença hepática gordurosa não-alcoólica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos



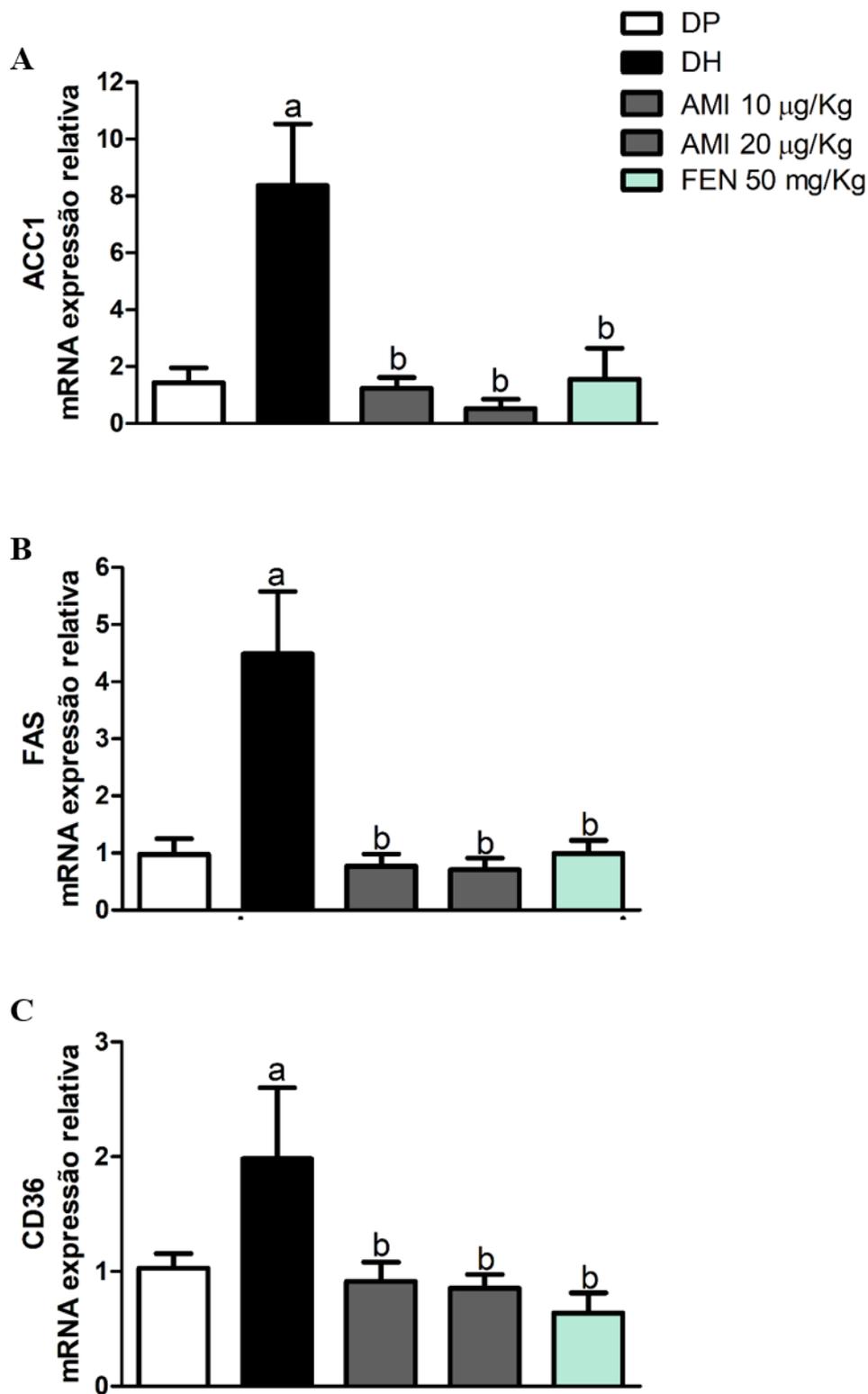
Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. As bandas de proteína foram quantificadas em relação à β -actina. DP (dieta padrão), DH (dieta hiperlipídica), AMI (alfa e beta-amirina), FEN (fenofibrato). ^a $p < 0,05$ vs DP, ^b $p < 0,05$ vs DH (ANOVA e teste de Student Newman Keuls).

5.10. Efeito da α , β -amirina na expressão relativa do RNAm de CD36, FAS e ACC1

A análise da curva de dissociação mostrou um único pico indicando amplificação específica para o gene de ACC1, FAS, CD36 e para o gene de referência β -actina e a razão da absorbância obtida em 260/280 nm ficou entre 1,8 e 2,0.

Na análise da expressão gênica por PCR em tempo real mostrou que a expressão relativa do gene ACC1, FAS e CD36 no grupo DH foi 7,3, 3,4 e 0,98 vezes maior, respectivamente, que a expressão relativa dos genes (ACC1, FAS e CD36) no grupo DP, normalizado para 1. Enquanto nos animais tratados com AMI (10 e 20 mg/K) e FEN (50mg/Kg) a expressão relativa do gene de ACC1, foi 7; 7,8 e 6,8 vezes menor, respectivamente, que a expressão do gene de ACC1 no grupo DH ($7,3 \pm 2,1$). Assim, como na expressão relativa do gene de ACC1, os animais tratados com AMI (10 e 20 mg/K) e FEN (50mg/Kg) a expressão relativa do gene de FAS, foi 3,7; 7,78 e 6,8 vezes menor, respectivamente, que a expressão do gene de FAS no grupo DH ($3,4 \pm 1,1$) e para a expressão relativa do gene de CD36, os animais tratados com AMI (10 e 20 mg/K) e FEN (50mg/Kg) a expressão relativa do gene de CD36, foi 1,07; 1,1 e 1,3 vezes menor, respectivamente, que a expressão do gene de CD36 no grupo DH ($0,98 \pm 1,1$) (Figura 20).

Fig.20. Efeito da mistura de α , β amirina sobre a expressão relativa do gene de ACC1 (A), FAS (B) e CD36 (C) na esteatose hepática não-álcoolica induzida por dieta hipercalórica em camundongos



Resultados expressos como média \pm E.P.M., ^a $p < 0,05$ comparado com o DP, ^b $p < 0,05$ comparado com a DH (n=8 animais/grupo). (Test t de Student).

6. DISCUSSÃO

Os triterpenos são um grande grupo de metabólitos secundários, com mais de 20.000 membros conhecidos na natureza, dos quais, os triterpenos pentacíclicos são os mais estudados, e de grande mérito devido às variadas atividades biológicas neles encontradas, sendo assim, candidatos a protótipos de novos medicamentos (SHENG; SUN, 2011; SILVA; DUARTE; VIEIRA FILHO, 2014). A α , β -amirina, é uma mistura de triterpenos pentacíclicos com notável atividade biológica já documentada, como, gastroprotetora (OLIVEIRA *et al.*, 2004a), antipruriginosa (OLIVEIRA *et al.*, 2004b), antinociceptiva visceral (LIMA-JÚNIOR, 2006) em dor orofacial (HOLANDA PINTO *et al.*, 2008a), inibidora da expressão de receptor NK-1 em modelo de cistite hemorrágica (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2007), hepatoprotetora (OLIVEIRA *et al.*, 2005a), anti-inflamatória em modelo de periodontite (HOLANDA PINTO *et al.*, 2008b), na pancreatite aguda (DE MELO *et al.*, 2009, 2010) e antiobesidade (CARVALHO *et al.* 2016).

No presente estudo, foi investigado, o efeito preventivo da mistura de triterpenos α , β -amirina sobre a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) induzida por uma dieta hiperlipídica em camundongos e seus efeitos sobre o metabolismo hepático.

Para avaliar o efeito das amirinas sobre a DHGNA os animais receberam por 15 semanas uma dieta hiperlipídica, tendo como vantagem, mimetizar os achados histopatológicos encontrados em humanos como também, aspectos patogênicos, da DHGNA humana, pois induz características marcantes observadas na clínica, como, obesidade, resistência insulínica (RI), >5% de esteatose hepática (EH) no histopatológico, com isso, é possível validar o uso da dieta hiperlipídica, como protocolo de indução da DHGNA em camundongos. (LAU; ZHANG; YU, 2016; LAU; ZANG; YOU, 2018).

Os animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram ao final das quinze semanas, elevação dos parâmetros preditores de ganho de peso (peso corporal e percentual de ganho de peso) em relação ao grupo submetido a dieta padrão, em contrapartida, os animais tratados com a α , β -amirina e fenofibrato, concomitante com a dieta hiperlipídica, apresentaram uma redução significativa desses parâmetros em todas as doses utilizadas, em relação ao grupo DH. Esses resultados são condizentes com o efeito da α , β -amirina no peso corporal e medidas murinométricas encontrados em nosso

laboratório em modelo de obesidade induzida com DH, podendo ser atribuído essa redução do peso e dos parâmetros de ganho de peso a melhora da resistência à leptina, resultando na diminuição do consumo de energia, além da inibição das enzimas α -amilase e lipase diminuindo a absorção de gordura e carboidratos (CARVALHO *et al.*, 2016).

Um número expressivo de pesquisadores tem demonstrado interesse em estudar os efeitos dos triterpenos em distúrbios metabólicos, como, obesidade, resistência à insulina e DHGNA, ele trelês, o ácido betulínico (De MELO *et al.*, 2001), ácido ursólico (RAO *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2010), ácido oleanólico (DE MELO *et al.*, 2010), ácido ganodérico (ZHU *et al.*, 2018), ácido asiático (RAMESHREDDY *et al.*, 2018), acteina (CHEN; LIU, 2018), ácido glicirizico (SUN *et al.*, 2017), fração enriquecida com ácido triterpênico de *Cyclocarya paliurus* (ZHAO *et al.*, 2018) e bardoxolona metilada (CAMER *et al.*, 2015) apresentaram efeitos semelhantes na redução do ganho de peso corporal, do fígado e na melhora da resistência à insulina.

Sabe-se que existem três regiões principais de depósitos de gordura anatómicas em humanos: o tecido adiposo branco visceral, subcutâneo e marrom. A região intra-abdominal refere-se ao tecido adiposo branco visceral (TAV), que envolve os órgãos internos, sendo localizado na região omental, mesentérico, retroperitoneal, gonadal e pericárdico. O tecido adiposo branco subcutâneo (TAS) está localizado no abdômen, nádegas e coxas sendo denominadas de depósito gluteofemoral. O tecido adiposo marrom está localizado principalmente na região subescapular, sendo responsável por dissipar energia produzindo calor (termogênese) através do desacoplamento da atividade da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial através da expressão específica da proteína desacopladora 1 (UCP1). O tecido adiposo marrom é composto por adipócitos castanhos caracterizados por um elevado conteúdo mitocondrial e dotados de uma elevada capacidade de oxidação lipídica (VEGIOPOULOS, ROHM, STEPHAN, 2017; TRIM, TURNER, THOMPSON, 2018)

Com objetivo de mimetizar as principais regiões de depósito de gordura nos seres humanos, foi retirado no final do experimento o tecido adiposo dos camundongos nas principais regiões do tecido adiposo branco (visceral e subcutâneo) e marrom. Foi possível observar que o tratamento com AMI e FEN reduziram o peso do fígado e das gorduras visceral, subescapular e subcutânea após as 15 semanas de tratamento. Nos camundongos o TAV está localizado principalmente nas regiões retroperitoneal e epididimal, o TAS está localizado na região inguinal e o tecido adiposo marrom na região

subescapular. Nos seres humanos, o aumento do TAV está associado com um risco aumentado para a resistência à insulina, dislipidemias e DHGNA (VEGIOPOULOS, ROHM, STEPHAN, 2017). Foi observado também o aumento do tecido adiposo na região subescapular nos animais DH, mas não foi possível avaliar a qualidade do tecido extraído.

A esse respeito, o excesso da carga lipídica leva um quadro de lipotoxicidade, que por sua vez responde por muitos efeitos na DHGNA, particularmente alterações na liberação de adipocitocinas desenvolvendo uma resposta inflamatória de baixo grau, levando a disfunção metabólica, como piora da sensibilidade à insulina e intolerância à insulina. Devido ao seu papel crítico na manutenção da função adipocitária adequada, tanto o armazenamento quanto a liberação de lipídios no tecido adiposo branco, estão fisiologicamente sob controle hormonal rígido, considerando que a insulina promove o armazenamento de triglicérides (TG) durante a fase pós-prandial (GALIC et al., 2006; TRIM, TURNER, THOMPSON, 2018).

Assim, estudo realizado por nosso grupo de pesquisa com a α , β -amirina, os camundongos alimentados com DH apresentaram aumento do peso da gordura visceral, apesar de uma redução efetiva no nível circulante do hormônio orexígeno grelina e um aumento no nível do hormônio anorexigênico leptina, sendo associado com a insensibilidade do receptor a esses hormônios, em particular, a resistência à leptina. Já o tratamento com AMI não alterou os níveis de grelina mas diminuiu a secreção de leptina, resultando em uma diminuição na ingestão de alimentos e energia, e com isso reduzindo peso corporal dos animais, resultado semelhante ao observado nesse estudo (CARVALHO *et al.*, 2016). Devemos ressaltar que, no presente estudo, foi observado que a α , β -amirina melhorou o metabolismo da glicose, colesterol total, LDL, triglicérides e das enzimas transaminases (ALT e AST), resultados estes, evidenciados em estudo realizado por Carvalho *et al.*, (2016) com a α , β -amirina, onde o tratamento com o triterpeno foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de glicose e insulina com melhora da resistência à insulina.

A DH foi capaz de aumentar as concentrações de colesterol e triglicérides no tecido hepático e as doses de 10 e 20 mg/Kg da α , β -amirina e fenofibrato 50 mg/Kg, apresentaram similar efeito anti-hiperlipêmicos ao reduzir significativamente os níveis de colesterol total e triglicérides no fígado. Efeitos similares foram observados em estudos com o ácido ursano, triterpeno pentacíclico do grupo do ursano, mesmo grupo da α -

amirina, em modelo de DHGNA induzida por DH. Na dose de 0,25 e 0,50% na ração, o triterpeno diminuiu significativamente as concentrações de triglicerídeos, colesterol total, LDL-C e VLDL de forma dose dependente. Além disso, o tratamento com ácido ursólico melhorou a resistência à insulina induzida por DH por redução do nível de insulina e melhorou a resistência à insulina (HOMA-IR) (LI et al., 2014).

Estudo realizado por Duan *et al.*, (2017), com um triterpeno pentacíclico, o ácido glicirrizico (grupo da β -amirina), em modelo de DHGNA induzida por DH, observaram que o triterpeno nas doses de 15, 30 e 60 mg/Kg de modo dose-dependente tem um potencial efeito protetor contra lesão induzida por DH no fígado, evidenciado pela diminuição significativa no ganho de peso corporal, do peso relativo do fígado e níveis séricos de ALT, AST, bem como melhora na histologia do fígado, redução do acúmulo de triglicéridos hepático e melhora da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina.

O glicogênio é a principal forma armazenada intracelular de glicose e seu nível em vários tecidos, especialmente no fígado, indica reflexo direto da atividade da insulina, uma vez que regula a deposição de glicogênio estimulando a glicogênio sintase e inibindo a glicogênio fosforilase. Nossos resultados de conteúdo aumentado de glicogênio no fígado no grupo DH estão de acordo com outro estudo realizado por Couturier *et al.*, (2011), no entanto, observações contraditórias da diminuição do conteúdo de glicogênio em animais alimentados com DH também apareceram na literatura (MUTHULAKSHMI; SARAVANAN, 2013). A hiperglicemia observada com hiperinsulinemia em camundongos tratados com DH pode ter promovido a síntese de glicogênio no fígado como um mecanismo adaptativo e protetor contra aumento da concentração de glicose intracelular. O aumento crônico na gliconeogênese relatada na condição induzida por dieta hiperlipídica pode ter resultado em síntese aumentada de glicogênio, resultando em aumento dos níveis de glicogênio hepático em camundongos do grupo DH (SUDHAKARA *et al.*, 2017; LAU; ZANG; YOU, 2018)

A administração das amirinas e do fenofibrato juntamente com a DH diminuiu o conteúdo de glicogênio hepático, que pode ser atribuído à diminuição da síntese de glicogênio e/ou aumento da glicogenólise, melhorando a sensibilidade à insulina, resultado semelhante ao observado por Sudhakara *et al* (2017). Estes autores, utilizaram o extrato *Caralluma fimbriata*, uma planta medicinal selvagem, tendo como

principais constituintes fitoquímicos saponinas triterpênicas, pregnanos glicosídeos, flavonóides glicosídeos e glicosídeos Megastigmane, em modelo de esteatose hepática induzida por dieta hiperlipídica.

A resistência à insulina observada no grupo DH foi o primeiro “hit” proposto por Day e James (1998) ao descrever a patogênese da DHGNA, sabendo-se que, o metabolismo do fígado compreende um imenso espectro de funções anabólicas em um estado alimentado (com predominância de efeitos perivenosos de insulina) e catabólicas em estado de jejum (com predomínio dos efeitos periportais do glucagon). O excesso de ácidos graxos livres (AGL) da lipólise esplênica causado pela resistência à insulina é absorvido pelos hepatócitos periportais e oxidado como fonte de energia, o que aumenta bioquimicamente o consumo de oxigênio. Além disso, o excesso de liberação de AGL no fígado resulta em acúmulo de diacilgliceróis intracelulares que, por sua vez, levam à ativação da proteína quinase C (PKC) (BAZOTTE; SILVA; SCHIAVON, 2014).

A PKC induz resistência à insulina inibindo a fosforilação de proteínas IRS estimulada pela insulina. Além disso, o excesso de AGL resulta na ativação da sinalização dos receptores Toll-like inflamatórios (TLR), levando ao aumento da síntese de ácidos graxos. Assim, o acúmulo de ácidos graxos e a inibição mediada por eles induzem a resistência à insulina no fígado pela inibição da fosforilação de Akt (GALBO; SHULMAN, 2013, BAZOTTE; SILVA; SCHIAVON, 2014).

O tratamento com as amirinas e fenofibrato foi eficaz em melhorar a resistência à insulina evidenciado pela análise do índice de HOMA-IR e as curvas glicêmicas (TTII e TTGII), sendo condizente com resultado obtido por Santos *et al* (2012) em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina, onde, o controle normal não mostrou alterações significativas nos níveis de glicose no sangue, e os camundongos diabéticos manifestaram um aumento na glicose no sangue nos tempo de 30, 60 e 90 min e o pré-tratamento oral de cinco dias com α , β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg) e glibenclamida melhoraram significativamente a tolerância à glicose nos tempos de 30, 60 e 90 min. Estudo realizado por Carvalho *et al* (2016) com a α , β amirina em modelo de obesidade induzido por dieta hiperlipídica observaram que o grupo DH apresentou uma elevada concentração de insulina sérica e que o tratamento com os triterpenos diminuiu significativamente a concentração de insulina nos camundongos, evidenciando assim um possível efeito desse triterpeno na resistência insulínica.

Triterpeno pentacíclico, como o ácido glicirrízico (GA) (grupo β -amirina), isolado a partir de *Glycyrrhiza glabra*, uma planta medicinal amplamente utilizada na medicina chinesa tradicional, melhorou a tolerância à glicose em camundongos diabéticos pancreatomizados, e aumentou a captação de glicose estimulada pela insulina através da ativação do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) em adipócitos 3T3-L1. No mesmo estudo, o GA aumentou a secreção de insulina estimulada pela glicose em ilhotas isoladas e aumentou os níveis de RNAm do gene IRS2, aumentando a viabilidade das células beta, além de, restaurar a função renal e atenuar perda de peso corporal nos camundongos diabéticos induzidos por STZ (DUAN *et al.*, 2017, SUN, 2018; KO *et al.*, 2007).

Liu *et al.* (2007) relataram que a administração oral do triterpeno pentacíclico ácido maslínico (grupo β -amirina), na dose 30 mg / kg de peso corporal, reduziu os níveis de glicose no sangue em camundongos em comparação com o controle. O triterpeno diminuiu a insulina plasmática e aumentou o conteúdo de glicogênio hepático, o que contribuiu para uma redução no suprimento de glicose no sangue. Em modelo de diabetes induzida por STZ a administração intragástrica de ácido maslínico (5 mg/kg ou 50 mg/kg) por 14 dias reduziu as concentrações de glicose no sangue, bem como uma redução do risco de infarto nos camundongos (GUAN *et al.*, 2011).

Após o desenvolvimento da resistência insulínica e aumento do acúmulo de lipídeos hepáticos, o fígado apresenta o segundo “hit” descrito por Day e James (1998) ao descrever a patogênese da DHGNA, o estresse oxidativo, onde o acúmulo de lipídeos hepáticos promove a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) podendo levar a ativação da transcrição e liberação de fatores pró-inflamatórios, tais como a interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral-alfa (TNF α) e proteína C reativa (PCR) no tecido hepático resultando na peroxidação lipídica, inflamação e fibrose (LONARDO *et al.*, 2017). O modelo de DHGNA induzida por DH é frequentemente utilizado, devido a reprodutibilidade dos dados e similaridade das lesões geradas no tecido hepático gerando o desequilíbrio entre as ERO e a capacidade antioxidante das células, gerando assim, à peroxidação lipídica e, em última instância, o dano celular (LAU; ZHANG; YU, 2016).

A glutathiona reduzida (GSH) possui papel central na transformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo, impedindo o aumento desordenado de radicais livres e produtos de peroxidação, como o MDA, que pode causar danos diretos às proteínas celulares levando à perda da fluidez, integridade

da membrana e funções. A fim de fornecer evidências da participação do efeito antioxidante da mistura de α , β -amirina sobre a DHGNA induzida por DH, foram analisados os níveis dos marcadores do estresse oxidativo malondialdeído e glutathiona reduzida no tecido hepático. Os camundongos que receberam a DH apresentaram níveis significativamente elevados de MDA enquanto os níveis de GSH foram reduzidos e com o tratamento com AMI e FEN os níveis de MDA foram reduzidos e GSH aumentados (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008).

Assim como a α , β -amirina, outros triterpenos, Ginsenoside Rg1 e a fração enriquecida com ácido triterpênico de *Cyclocarya paliurus* apresentaram ação antioxidantes em modelo de DHGNA induzido por DH, reduzindo significativamente a peroxidação lipídica, a partir da dosagem de MDA e GSH, além de modular fatores pró-inflamatórios como o NF- κ B reduzindo a peroxidação lipídica, mas também reduzindo o estresse RE e respostas inflamatórias levando a proteção da função hepática (ZHAO *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2018).

Fenofibrato, droga utilizada para dislipidemias, foi incluída nesse estudo como controle positivo. Houve redução significativa do acúmulo de gordura abdominal, diminuição do peso corporal, redução de triglicerídeos e colesterol total séricos, recuperação histológica do tecido hepático e atividade antioxidante. FEN é um agonista do PPAR α , que são receptores nucleares que podem controlar o metabolismo lipídico regulando as expressões de genes lipogênicos, como a proteína de ligação do elemento regulatório de esteróis (SREBP)-1c, ácido graxo sintase (FAS) e diacilglicerol aciltransferase. (DGAT) e lipase lipoproteica (LPL), sendo predominantemente expresso no fígado, e sua expressão pode diminuir o acúmulo de lipídios hepáticos e proteger os camundongos de esteatose hepática induzida por alto teor de gordura, como observado no estudo (ZHANG *et al.*, 2015).

A biópsia hepática é essencial para o diagnóstico da DHGNA, apesar das limitações devido à variabilidade amostral. Métodos de coloração então sendo utilizados para facilitar o diagnóstico mais confiável da DHGNA em estudos pré-clínicos e em clínicos, como a coloração de H&E, utilizando a classificação de Brunt modificada por Kleiner *et al* (2005), definindo uma graduação para a DHGNA, baseado no grau de esteatose (0 a 3), inflamação lobular (0 a 3) e balonização (0 a 2), onde a soma menor que 3 é muito provável um ponto de exclusão para DHGNA e igual ou superior a 5 muito provável para DHGNA. Outros métodos de coloração são utilizados como as

histoquímicas de tricoma de masson útil para avaliação da fibrose hepática, do Ácido Periódico de Schiff para avaliação do conteúdo de glicogênio hepático e Oil red O para coloração de lipídeos neutros e colesterol no tecido hepático (MANDARARIM-DE-LACERDA, 2010; EASL, 2016).

Liu *et al*, (2013) em seu estudo, observou a presença maciça degeneração gordurosa difusa, inflamação, balonismo e necrose em animais que receberam dieta hiperlipídica e que o tratamento com o triterpeno Ginsenosideo (RG1) reduziu significativamente os sinais de lesão hepática e diminuiu a extensão da infiltração adiposa no fígado. De forma semelhante, no presente estudo a análise histológica realizada revelou que a ração hiperlipídica levou os animais a lipidose hepática esperada, sendo visualizada de forma intensa e difusa em todos os lóbulos de todos os animais, em um deles levando inclusive à necrose hepatocelular. O tratamento com AMI 10 mg/kg, 20 mg/kg e FEN 50 mg/Kg foi eficaz na redução das lesões de hepatócitos, uma vez que houve redução da intensidade dessas lesões. Resultados semelhantes foram encontrados por Carmer *et al* (2015), ao avaliar o efeito do triterpeno pentacíclico metil bardoxolone sobre a resistência insulínica e esteatose hepática em camundongos alimentados por DH, observando uma melhora no acúmulo de gordura avaliado pela redução do score de Kleiner e área marcada com *Oil Red O*.

Afim de avaliar os mecanismos pelos quais a α,β amirina atua na DHGNA melhorando a resistência à insulina e o acúmulo de lipídeos hepáticos, foi avaliada a expressão de proteínas que sabidamente estão envolvidas na regulação do balanço energético, transporte de ácidos graxos, lipogênese e oxidação lipídica. Na DHGNA, o fígado apresenta o aumento da expressão de fatores de transcrição envolvidos na adipogênese, síntese de ácidos graxos e resistência à insulina. Como chave nesse processo podemos destacar a proteína de ligação a elemento regulador de esterol 1 (SREBP-1), sendo fator de transcrição essencial para genes envolvidos na lipogênese *de novo*, como FAS e ACC (RUIZ *et al.*, 2014).

No estudo foi possível observar o aumento da expressão proteica do SREBP-1 no grupo DH em relação ao DP e o tratamento com AMI e FEN diminuiu significativamente sua expressão em relação ao grupo DH. O SREBP-1c regula preferencialmente o processo lipogênico por meio da ativação de genes envolvidos na síntese de ácidos graxos e triglicerídeos, sintetizadas como proteínas precursoras que são inseridas na membrana do retículo endoplasmático (ER). O precursor do SREBP migra

do RE para o complexo de Golgi e é submetido a processamento proteolítico sequencial para liberar o domínio N-terminal transcricionalmente ativo. Uma vez que a forma nuclear do SREBP é ativa, ela é translocada para o núcleo, se ligando ao elemento regulador do esterol (SRE), presente nos promotores de seus próprios genes alvo, e ativa a transcrição de genes responsivos ao SREBP, como enzimas lipogênicas, tipo acetil-CoA carboxilase (ACC), ácido graxo sintase (FAS), lipoproteína lipase (LPL) e esteroil-CoA desaturase-1 (SCD1) promovendo assim o efeito lipogênico no fígado. A desregulação da SREBP-1c foi implicada na patogênese da esteatose hepática, dislipidemia e diabetes tipo 2 (HORTON; GOLDSTEIN; BROWN, 2002; RUIZ *et al.*, 2014).

Corroborando com este estudo, outros triterpenos pentacíclicos como, ácido glicirrízico (SUN *et al.*, 2017), acteina (CHEN; LIU, 2018), ácido ganodérico (ZHU *et al.*, 2018) e carbenoxolona (DHANESHA *et al.*, 2012) *intra* regularam a expressão de SREBP1-c em modelos de DHGNA induzida por DH reduzindo a ativação de vias lipogênicas no fígado. Liu *et al* (2013) encontraram efeito semelhante do ácido oleanólico, um triterpeno pentacíclico do grupo químico da β -amirina sobre a expressão de SREBP1-c e ChREBP em modelo de esteatose hepática induzida por frutose, restaurando assim a histologia hepática.

Como α , β amirina está envolvida na diminuição da expressão do SREBP1 no tecido hepático, investigamos genes envolvidos no último passo para a biossíntese de ácidos graxos (tais como FAS e ACC1). A sintase de ácido graxo (FAS) é uma enzima que catalisa o último passo na biossíntese de ácido graxos, e assim, acredita-se ser um passo limitante na capacidade máxima do fígado para gerar ácidos graxos a partir da lipogênese *de novo*. A FAS sintetiza cadeia longa de carbono como uma redução equivalente, assim, sob condições normais, os carboidratos em excesso são convertidos em ácidos graxos, seguida por esterificação para triacilgliceróis, que quando necessário, fornecem energia através da beta-oxidação. A Acetil-CoA carboxilase 1 (ACC1) é uma enzima que catalisa a carboxilação dependente de ATP de acetil-CoA, um passo limitante da velocidade na biossíntese dos ácidos graxos, com a produção de malonil-CoA, o qual pode ser utilizado pela FAS para a síntese assim de ácidos graxos (DORN *et al* 2010, HUNKELER *et al.*, 2018, YEH *et al.*, 2018,).

A expressão relativa no RNAm da ACC1 no grupo DH foi maior em relação ao grupo DP e o tratamento com AMI (10 e 20mg/Kg) e FEN (50 mg/Kg) foi capaz de

reduzir significativamente a sua expressão, levando-nos a pensar em uma menor oferta de malonil-Coa para a síntese de AG no tecido hepático. Para assegurar, avaliamos expressão da proteína FAS por WB e do RNAm por RT-PCR e observamos que a DH aumentou significativamente a expressão da proteína e do RNAm em relação a DP e o tratamento com AMI (10 e 20mg/Kg) e FEN (50 mg/Kg) foi capaz de reduzir significativamente a expressão da proteína e do RNAm em relação ao grupo DH, levando assim, uma menor síntese de ácido graxo no tecido hepático observado na quantificação de triglicerídeos e colesterol hepático e na visualização das gotículas de gordura no fígado com o *Oil red O* e redução dos scores de Kleiner.

Os ácidos graxos livres são tomados pelas células hepáticas por difusão passiva ou por meio de transporte mediado por proteína, sendo assim, investigamos a expressão do RNAm de gene transportador de ácido graxo, o CD36. O gene CD36 codifica para uma proteína de membrana que facilita a captação e utilização de ácidos graxos (AG) pelos principais tecidos metabólicos, como o fígado e o tecido adiposo. Sabe-se que a expressão de CD36 hepático é maior em modelos de DHGNA em camundongos, o qual, subsequentemente, aumenta a absorção de ácidos graxos livres. Os estudos clínicos demonstram também que um aumento da expressão de CD36 hepática foi associada à infiltração de ácido graxo hepáticos em pacientes com DHGNA, com aumento da expressão de CD36 os ácidos graxos livres são rapidamente esterificados dentro dos hepatócitos para formar diglicéridios (DG) e triglicerídeos (TG) e levar ao quadro clínico observado no modelo animal (LOVE-GREGORY *et al.*, 2008, GAUTAM; BANERJEE, 2011, YANG *et al.*, 2016).

Expressão de CD36 é regulada transcricionalmente pelo PPAR γ , um receptor nuclear ativado por ligante, há um elemento de PPAR-sensível (PPRE) na região próxima do promotor de CD36, assim, ambos os ligantes de PPAR γ naturais e sintéticas, tais como prostaglandina J2 (PGJ2) e tiazolidinedionas para o tratamento da diabetes, podem aumentar a expressão de CD36 (YANG *et al.*, 2016). Estudo realizado em nosso grupo de pesquisa com células 3T3-L1 observou que α , β -amirina reduziu significativamente a expressão proteica e gênica para PPAR γ nas células, provavelmente, devido a diminuição da expressão gênica de CD36 nos animais tratados com AMI observado no presente estudo (DE MELO *et al.*, 2019).

O PPAR α é um fator de transcrição ativado por ligante que estimula a transcrição gênica pela ligação a elementos de resposta proliferativa do peroxissoma

(PPRE) no promotor de genes alvo. Os genes-alvo do PPAR α estão envolvidos em numerosos processos biológicos, mas estão relacionadas principalmente com o metabolismo lipídico, incluindo a oxidação mitocondrial e peroxissômica dos ácidos graxos (AG), bem como a absorção e transporte de AG, regulando a expressão de genes lipogênicos, tais como SREBP-1c, FAS, DGAT e LPL. Além de regular a expressão gênica, o PPAR α é capaz de reprimir a transcrição, interagindo diretamente com outros fatores de transcrição e interferindo em suas vias de sinalização. Através deste mecanismo, o PPAR α é capaz de regular negativamente a expressão de genes pró-inflamatórios e, conseqüentemente, suprimir a resposta inflamatória. Embora funcionalmente o PPAR α seja melhor caracterizado no fígado, o PPAR α também é expresso no coração, rins, músculo esquelético, intestino delgado, bem como em vários tipos de células inflamatórias, imunes, como monócitos e macrófagos (DUVAL; MULLER; KERSTEN, 2007; ZHANG *et al.*, 2015,).

Nossos resultados mostraram que a DH foi capaz de reduzir a expressão do PPAR α e o tratamento com AMI (10 e 20mg/Kg) e FEN (50 mg/Kg) de aumentar a sua expressão no tecido hepático. De modo semelhante, o triterpeno ácido glicirizico extraído da *Glycyrrhiza glabra*, planta medicinal amplamente utilizada na medicina chinesa tradicional, com potencial hepatoprotetora apresentou aumento da expressão relativa do RNAm do PPAR α , resultando no aumento da beta-oxidação dos AG reduzindo o acúmulo de gordura no tecido hepático (SUN *et al.*, 2017). Outros triterpenos e diterpenos apresentaram atividade hepatoprotetora, aumentando a expressão do PPAR α no tecido hepático, como, acteina (CHEN; LIU, 2018), ginsenosideo Rg1 (XU *et al.*, 2018) e o ácido carnósico (SONG *et al.*, 2018).

Em estudo realizado por Melo *et al* (2019) com células 3T3-L1, foi observado que α , β -amirina nas concentrações de 25 e 50 μ g/mL inibe significativamente a diferenciação e o acúmulo de gordura no adipócito, além de, estimular a translocação do GLUT4 do gene alvo para a membrana celular, sugerindo um aumento da utilização de glicose por esses adipócitos. Também foi observado que a atividade da AMPK foi estimulada e a via da SREBP1 foi regulada negativamente nos adipócitos após exposição a α , β -Amirina, sugerindo o seu efeito inibidor na adipogênese regulada por AMPK-SREBP.

Sendo assim, foi avaliado o efeito de α , β -amirina sobre a fosforilação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK α). A AMPK é uma enzima sensibilizadora do balanço energético celular, sendo ativada pelo aumento da razão AMP/ATP deixando essa razão sempre constante, assim, processos que interfiram tanto na produção quanto no consumo do ATP podem causar a sua ativação. A AMPK foi originalmente definida como uma proteína quinase do fígado de rato que fosforila e inativa duas enzimas chave da síntese de ácido graxo e esterol de mamífero, isto é, acetil-CoA carboxilase-1 (ACC1) e 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase, sendo que, sua ativação requer a fosforilação por quinases em um resíduo de treonina conservado dentro do domínio quinase (geralmente denominado Thr-172), além de inativar a SREBP-1 no momento da sua translocação (HARDIE, 2013; LI *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2009).

No presente trabalho, foi observado que a DH diminuiu a expressão de pAMPK e o tratamento com AMI (10 e 20 mg/Kg) e FEN 50 mg/Kg aumentou a expressão de AMPK, supondo assim, que o triterpeno atua por essa via, regulando o balanço energético celular, melhorando a sensibilidade à insulina e podendo inibir a ativação de genes envolvidos na lipogênese como o SREBP-1, ACC e FAS.

ZHU *et al.* (2018), demonstraram que o triterpeno ácido ganodérico reduziu o ganho de peso corporal, a acumulação de gordura no fígado e tecido adiposo, melhorou os níveis de lípidos no soro e a sensibilidade à insulina em camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica (DH). A droga estudada também atenuou a esteatose hepática, acompanhada pela redução da expressão do RNAm de genes alvos que regulam metabolismo lipídico hepático, como, SREBP1, FAS e ACC, assim como observado em nosso estudo. Um diterpeno, o ácido carnósico, em modelo de esteatose hepática em camundongos induzida por DH, apresentaram uma melhora na tolerância à glicose e insulina, além da redução de citocinas pró-inflamatórias e a supressão do acúmulo de lipídios, através da modulação da via PI3K/AKT, NLRP3/NF-kB e SREBP-1c, ACC e FAZ, assim como observado no presente estudo (SONG *et al.*, 2018).

Assim como AMI, foi reportado que o ácido ursólico, triterpeno do grupo da α -amirina, atenuou significativamente a esteatose hepática induzida por DH através do aumento da β -oxidação pelo aumento da expressão do PPAR- α no fígado, melhorando enzimas chaves no controle do metabolismo lipídico e reduzindo a expressão das proteínas SREBP1-c, FAS e CD36 no tecido hepático e assim, os distúrbios metabólicos foram consequentemente melhorados (KWON; SHIN; CHOI, 2018). Outro triterpeno, o

ácido 18 β -glicirretínico (grupo β -amirina) em modelo de obesidade induzida por DH em camundongos, reduziu significativamente o peso corporal, o peso de gordura, e os níveis de lipídeos no plasma e reduziu a expressão relativa do RNAm para os genes ACC e FAS e SCD1 no tecido hepático, melhorando assim o acúmulo de ácidos graxos no fígado (PARK *et al.*, 2014).

Ácido oleanólico, triterpeno do grupo da β -amirina, restaurou a histologia hepática em modelo com dieta hiperlipídica na dose de 25 mg/Kg, melhorando o perfil lipídico, a resistência à insulina e regulando negativamente a expressão dos genes da via lipogênicas, como SREBP1, FAS e ACC1 e os genes pró-inflamatórios IL-1, IL-6 e TNF α , além de aumentar a expressão do RNAm de PPAR α responsável assim pelo aumento da β -oxidação. Com conseqüente redução do acúmulo de triglicerídeos e inflamação no fígado (JEZIRI *et al.*, 2018).

Triterpeno ácido asiático (AA) (grupo α -amirina), na dose de 20mg/Kg em modelo de obesidade induzida por DH, reduziu o peso corporal, níveis de glicose no sangue, resistência à insulina e níveis de leptina, adiponectina, amilase e lipase e reduziu a expressão do RNAm de ACC, proteína desacopladora-2 (UCP2) e carnitina palmitoiltransferase-1 (CPT1) ativando vias como a da β -oxidação, reduzindo o acúmulo de lipídeos no tecido hepático (RAMESHREDDY, P. *et al.*, 2018).

De modo semelhante, o triterpeno lupenona, também presente na resina de *Protium heptaphyllum*, apresentou atividade antidiabética significativa, inibindo a atividade da α -glicosidase *in vitro* e melhorando o metabolismo da glicose em camundongos diabéticos induzidos por aloxana (NAVGHARE; DHAWALE, 2017). Outro grupo de pesquisa constatou que a lupenona inibiu a atividade da enzima α -amilase e α -glicosidase nos órgãos e reduziu a glicemia de jejum em ratos diabéticos do tipo 2 induzidos por estreptozotocina e alimentados com dieta rica em gordura, além disso, a lupenona melhorou o peso corporal, a ingestão de água/alimentos, a produção urinária, o estado mental, a tolerância à glicose e a tolerância à insulina de ratos diabéticos tipo 2 (XU *et al.*, 2014, 2018). Estudo realizado por AHN; OH. (2013) demonstraram que a lupenona resultou numa redução significativa da acumulação de lípidos e de expressão de genes adipogênicos (PPAR γ e C/EBP α) de modo dependente da dose em células 3T3-L1.

A fim de avaliar o efeito da AMI sobre a esteatose hepática utilizamos o modelo de cultura de carcinoma hepatocelular HepG2. Inicialmente foi observado que a AMI não provocou alteração da viabilidade celular em células HepG2, mostrando que a AMI não apresenta citotoxicidade. Os resultados foram obtidos nos hepatócitos no período de 24h de incubação com AMI.

Para avaliar a esteatose hepática, *in vitro*, um modelo celular hepático foi previamente estabelecido pelo tratamento de células HepG2 humanas com os ácidos graxos livres (AGL), levando em consideração os principais ácidos graxos presentes no corpo humano, que incluem o ácido palmítico (PA) e ácido oleico (OA) e PA e OA são amplamente utilizados para induzir esteatose *in vitro*

De modo semelhante, o triterpeno celastrol isolado de *Celastrus regelii*, com um agente promissor para o tratamento da obesidade, não promoveu efeito significativo na redução da viabilidade celular em células HepG2 em modelo de esteatose hepática induzida por ácidos graxos (HAN *et al.*, 2018). Outro triterpeno pentacíclico com potencial atividade hepatoprotetora, o ácido maslínico, não causa redução da viabilidade celular em células HepG2 (LIU *et al.*, 2014).

No presente estudo, a AMI e FEN reduziram o acúmulo de lipídeos nas células HepG2, demonstrado através da coloração com *Oil Red O*. Corroborando com esse estudo, o triterpeno celastrol reduziu o acúmulo de lipídeos nas células HeG2 e promoveu a inibição de processos pró-inflamatórios, como a expressão proteica das citocinas, IL-1 e TNF alfa. (HAN *et al.*, 2018).

Liu *et al* (2014), realizaram estudo com o ácido maslínico (MA), um triterpeno pentacíclico abundante na pele de azeitona, em células HepG2 e foi observado que o triterpeno exerce efeito antidiabético aumentando o conteúdo de glicogênio e inibindo a atividade da enzima glicogênio fosforilase nas células HepG2, além de reduzir o conteúdo de lipídeos nas células.

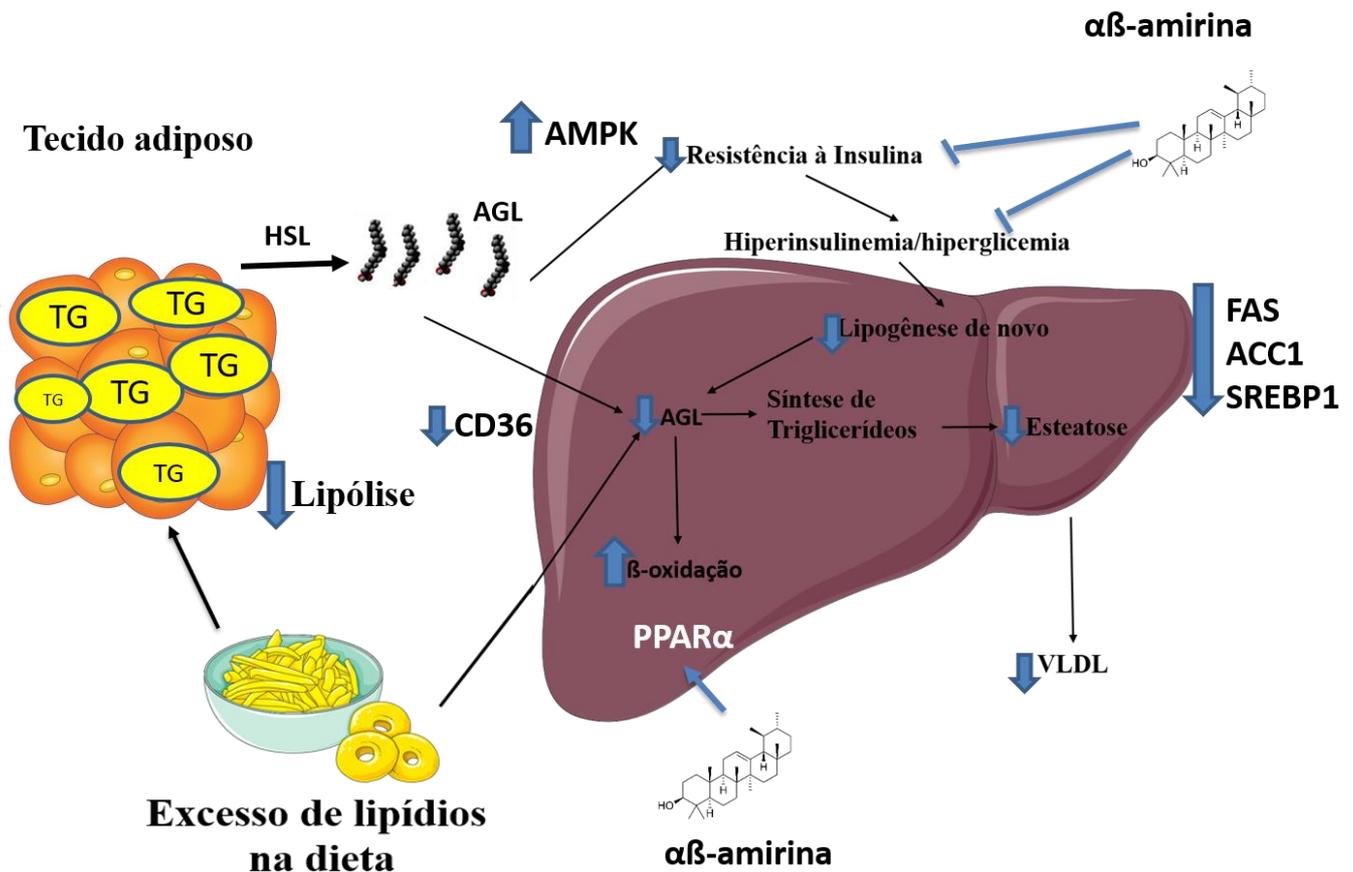
Por fim, os resultados evidenciados neste estudo, mostraram que o tratamento com a α , β -amirina preveniu o desenvolvimento da DHGNA em camundongos submetidos a dieta hiperlipídica durante 15 semanas, tendo resultados semelhantes ao agente antilipidêmico utilizado como controle positivo o fenofibrato. Sua atividade na prevenção da esteatose se dá através da melhora da resistência à insulina e redução dos marcadores do estresse oxidativo, levando a redução do acúmulo de ácidos graxos no

tecido hepático, estando associado a desregulação da via beta-oxidação e lipogênese no tecido hepático, devido a regulação negativa do SREBP1-c, ACC1, FAS e CD36 concomitante à regulação positiva do pAMPK e PPAR α , reduzindo a lipotoxicidade e evitando a progressão da DHGNA no modelo (Figura 21).

7. CONCLUSÕES

- Os resultados demonstram potencial efeito hepatoprotetor da α , β -amirina, na prevenção da DHGNA induzida por dieta hiperlipídica.
- Sugerindo que o efeito do triterpeno está associado à redução da lipogênese, da síntese e transporte de triglicerídeo, associado à regulação negativa do SREBP1, ACC1, FAS e CD36.
- Além da melhora da resistência à insulina e aumento da peroxidação lipídica associado à regulação positiva do AMPK e PPAR α reduzindo a lipotoxicidade, evitando assim, a progressão da DHGNA.
- Sendo considerado um possível protótipo para novos fármacos para o tratamento da DHGNA.

Figura 21. Esquema representativo dos possíveis mecanismos de ação da α , β -amirina no efeito preventivo da DHGNA.



Adaptado por Dowman *et al.*, 2010 e Roberts KK, 2017.

Legenda: Alterações metabólicas que resultam em acúmulo de triglicérides hepáticos em estados resistentes à insulina. A resistência à insulina é manifestada por hiperinsulinemia, aumento da produção hepática de glicose e diminuição do armazenamento de glicose. Nos adipócitos, a resistência à insulina aumenta a atividade da lipase sensível ao hormônio (HSL), resultando em taxas elevadas de lipólise de triglicérides e aumento do fluxo de AGL no fígado. Os AGL podem ser oxidados nas mitocôndrias para formar ATP ou esterificados para produzir triglicérides para armazenamento ou incorporação em partículas de VLDL. No fígado, a AMI reduziu a expressão de SREBP-1, levando à redução da ativação transcricional de genes lipogênicos, como o ACC1, FAS e CD36 e aumentou a expressão de AMPK e PPAR α reduzindo a resistência à insulina e ativando vias de β -oxidação, respectivamente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAR, E.; BOSNAK, M.; AMANVERMEZ, R.; DEMIR, S.; AYYILDIZ, M.; CELIK, C. The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat. **Neuroreport**, v. 10, p. 1799-1801, 1999.

AHN, E.; OH, J.S. Lupenone isolated from *Adenophora triphylla* var. *japonica* extract inhibits adipogenic differentiation through the downregulation of PPAR γ in 3T3-L1 Cells. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 761 – 766, 2013.

ALBANO, E. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. **Gut**, v. 54, n. 7, p.987-993, 1 jul. 2005.

ALQAHTANI, A. *et al.* The Pentacyclic Triterpenoids in Herbal Medicines and Their Pharmacological Activities in Diabetes and Diabetic Complications. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 908–931, 1 fev. 2013.

ANDRIKOPOULOS, S. *et al.* Evaluating the glucose tolerance test in mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 295, n. 6, p. E1323–E1332, dez. 2008.

ARAB, J. P.; ARRESE, M.; TRAUNER, M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 13, n. 1, p. 321–350, 24 jan. 2018.

BAI, LIANG *et al.* Modulation of Sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes. **Molecular And Cellular Biochemistry**, v. 307, n. 1-2, p.129-140, 13 set. 2007.

BANDEIRA, PN *et al.* Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* march. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p.1078'-1080, dez. 2002..

BAZOTTE, R. B.; SILVA, L. G.; SCHIAVON, F. P. M. Insulin resistance in the liver: Deficiency or excess of insulin? **Cell Cycle**, v. 13, n. 16, p. 2494–2500, 18 ago. 2014.

BENEDICT, M, ZHANG, X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. **World Journal of Hepatology**, v. 9, n. 16, p.715-732, 2017.

BERSON, A *et al.* Steatohepatitis- inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. **Gastroenterology**, v.114, n.4, p. 764-774, 1998.

BERTOLA, A., *et al.* Hepatic Expression Patterns of Inflammatory and Immune Response Genes Associated with Obesity and NASH in Morbidly Obese Patients. **Plos One**, v. 5, n. 10, p.1-11, 22 out. 2010.

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 147–152, 15 jul. 2004

CAI, D. *et al.* Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. **Nature Medicine**, v. 11, n. 2, p. 183–190, fev. 2005.

CAMER, D. *et al.* Bardoxolone methyl prevents insulin resistance and the development of hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 412, p. 36–43, set. 2015.

CANCER, A. L. **Obesity, Fatty Liver and Liver Cancer**. Singapore: Springer Singapore, 2018. v. 1061.

CARROLL, Nicholas V.; LONGLEY, Robert W.; ROE, Joseph H. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. **J Biol Chem**, [S.I.], v. 220, n. 2, p.583-593, jun. 1956.

CARVALHO, K. M.; *et al.* The Resin from Protium heptaphyllum Prevents High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice: Scientific Evidence and Potential Mechanisms. **Evid Based Complement Alternat Med**, p. 1-13, 2015.

CARVALHO, K. *et al.* Amyrins from Protium heptaphyllum Reduce High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice via Modulation of Enzymatic, Hormonal And Inflammatory Responses. **Planta Medica**, v. 83, n. 03/04, p. 285–291, 15 ago. 2016

CHALASANI, N., *et al.* The Diagnosis and Management of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. **Gastroenterology**, v. 142, n. 7, p.1592-1609, jun. 2012.

CHALASANI, N., *et al.* The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, p.1-30, 29 set. 2017.

CHANG, Y., *et al.* Metabolically Healthy Obesity and the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 111, n. 8, p.1133-1140, 17 maio 2016.

CHAO, H.-W. *et al.* Homeostasis of Glucose and Lipid in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 298, 13 jan. 2019.

CHEN, H.; LIU, J. Actein ameliorates hepatic steatosis and fibrosis in high fat diet-induced NAFLD by regulation of insulin and leptin resistant. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, n. September 2017, p. 1386–1396, jan. 2018.

CHEUNG, A. *et al.* Defining Improvement in Nonalcoholic Steatohepatitis for Treatment Trial Endpoints: Recommendations from the Liver Forum. **Hepatology**, p. 1–27, 29 abr. 2019.

CORRADO, R L.; TORRES, DM.; HARRISON, SA. Review of Treatment Options for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Medical Clinics of North America**, [v. 98, n. 1, p.55-72, jan. 2014.

CORRÊA, M Pio; PENA, Leonam de Azeredo. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

CORTEZ-PINTO, H; MOURA, MC; DAY, CP. Non-alcoholic steatohepatitis: From cell biology to clinical practice. **Journal of Hepatology**, v. 44, n. 1, p.197-208, jan. 2006.

COTRIM, H.P. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease (NALFD) in Brazil: clinical and histological profile. **Journal of Hepatology**, v. 48, p.340-341, jan. 2008.

COUTURIER, K. *et al.* Cinnamon increases liver glycogen in an animal model of insulin resistance. **Metabolism**, v. 60, n. 11, p. 1590–1597, nov. 2011.

DAL RHEE, S. *et al.* Carbenoxolone prevents the development of fatty liver in C57BL/6-Lep ob/ob mice via the inhibition of sterol regulatory element binding protein-1c activity and apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 691, n. 1–3, p. 9–18, set. 2012.

DAY C.P; JAMES O.F. Steatohepatitis: a tale of two ‘hits’? **Gastroenterology**. v.114, n.4, p. 842-5, 1998.

DE MELO, C. L. *et al.* Betulinic acid, a natural pentacyclic triterpenoid, prevents abdominal fat accumulation in mice fed a high-fat diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 8776-8781, 2009.

DE MELO, C. L. *et al.* Oleanolic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet. **Chemico-Biological Interactions**, v. 185, n. 1, p. 59-65, 2010.

DE MELO, KM. *et al.* α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpenoid from *Protium heptaphyllum* suppresses adipocyte differentiation accompanied by down regulation of PPAR γ and C/EBP α in 3T3-L1 cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, n. November 2018, p. 1860–1866, 2019.

DHANESHA, N. *et al.* Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 by carbenoxolone affects glucose homeostasis and obesity in db/db mice. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 1, p. 69–77, 2012.

DORN, C. *et al.* Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 3, n. 5, p. 505–514, 2010.

DOWMAN JK, TOMLINSON JW, NEWSOME PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. **Q J Med**. 2010; 103(2):71-83.

DUVAL, C.; MULLER, M.; KERSTEN, S. PPAR α and dyslipidemia. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1771, n. 8, p. 961–971, ago. 2007.

EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, [S.I.], v. 64, n. 6, p.1388-1402, jun. 2016.

EL-HALEIM, EAA; BAHGAT, AK; SALEH, S. Resveratrol and fenofibrate ameliorate fructose-induced nonalcoholic steatohepatitis by modulation of genes expression. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 10, p.2931-2948, 2016.

EMANUELLI, B., *et al.* SOCS-3 Inhibits Insulin Signaling and Is Up-regulated in Response to Tumor Necrosis Factor- α in the Adipose Tissue of Obese Mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 51, p.47944-47949, 16 out. 2001. American

ENTENMAN, C. General procedures for separating lipid components of tissue. **Methods in Enzymology**, p. 299-317, 1957.

ESHRAGHIAN, A. Current and emerging pharmacological therapy for non-alcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 42, p.7495-7504, 14 nov. 2017.

ESTADELLA, D *et al.* Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p.218-224, fev. 2004.

FORETEZ, Marc *et al.* Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. **Pnas**, v. 96, n. 22, p.12737-12742, out. 1999.

GALBO, T.; SHULMAN, G. I. Lipid-induced hepatic insulin resistance. v. 5, n. 8, p. 582–583, 2013.

GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 316, n. 2, p. 129–139, mar. 2010.

GASTALDELLI, A. *et al.* Relationship Between Hepatic/Visceral Fat and Hepatic Insulin Resistance in Nondiabetic and Type 2 Diabetic Subjects. **Gastroenterology**, v. 133, n. 2, p. 496–506, ago. 2007.

GAUTAM, S.; BANERJEE, M. The macrophage Ox-LDL receptor, CD36 and its association with type II diabetes mellitus. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 102, n. 4, p. 389–398, 2011.

GEISLER, C. E.; RENQUIST, B. J. Hepatic lipid accumulation: cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones. **Journal of Endocrinology**, v. 234, n. 1, p. R1–R21, jul. 2017.

GNANAPRAGASAM, A. *et al.* Protective effect of Centella asiatica on antioxidant tissue defense system against adriamycin induced cardiomyopathy in rats. **Life Sciences**, v. 76, n. 5, p. 585–597, dez. 2004.

GOLABI, P. *et al.* The global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. **Association of the Study of Liver Disease Meeting**, p. 2225, 2017.

GUIMARÃES, A. G.; SERAFINI, M. R.; QUINTANS, L. J. JR. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 3, p. 243-65, 2014.

HAAS, J.T.; FRANQUE, S; STAELS, B. Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Annual Review of Physiology**, v. 78, n. 1, p.181-205, 10 fev. 2016.

HADIZADEH, F.; FAGHIHIMANI, E.; ADIBI, P. Nonalcoholic fatty liver disease: Diagnostic biomarkers. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 8, n. 2, p. 11, 2017.

HAN, L. P. *et al.* Effect of celastrol on toll-like receptor 4-mediated inflammatory response in free fatty acid-induced HepG2 cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 42, n. 4, p. 2053–2061, 2018.

HANG, T; KRAUS, WL. SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: Linking NAD⁺ metabolism and signaling to the control of cellular functions. **Biochimica ET Biophysica Acta (bba) - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 8, p.1666-1675, ago. 2010.

HARDIE, D. G. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor with a key role in metabolic disorders and in cancer. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 1, p. 1–13, 1 fev. 2011.

HARDIE, D. G. AMPK: A Target for Drugs and Natural Products With Effects on Both Diabetes and Cancer. **Diabetes**, v. 62, n. 7, p. 2164–2172, 1 jul. 2013b.

HARDIE, D. G.; SCHAFFER, B. E.; BRUNET, A. AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 3, p. 190–201, mar. 2016.

HASHIMOTO, T. Peroxisomal beta-oxidation enzymes. **Neurochem Res.**, v. 24, n. 551–63, 1999.

HELMSTÄDTER, A.; STAIGER, C. Traditional use of medicinal agents: a valid source of evidence. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 1, p. 4-7, 2014.

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 9, p. 1125–1131, 1 maio 2002.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. DE. Glutathiona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

HUNKELER, M. *et al.* Structural basis for regulation of human acetyl-CoA carboxylase. **Nature**, v. 558, n. 7710, p. 470–474, 201

HWANG, Y.-J. *et al.* Pinus densiflora Sieb. et Zucc. Alleviates Lipogenesis and Oxidative Stress during Oleic Acid-Induced Steatosis in HepG2 Cells. **Nutrients**, v. 6, n. 7, p. 2956–2972, 23 jul. 2014.

IMAJO, Kento *et al.* Rodent Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p.21833-21857, 4 nov. 2013.

JIA, Y. *et al.* Ursolic acid is a PPAR- α agonist that regulates hepatic lipid metabolism. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 19, p. 5876–5880, out. 2011.

JÚNIOR, G.; DE SOUZA, C.; CHAVES, M. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Química Nova**, v. 28, p. 183 – 187, 2005.

KAWANO, Y.; COHEN, D. E. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 48, n. 4, p. 434–441, 9 abr. 2013.

KERSTEN, S. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 11, p. 1489–1498, 1 jun. 1999.

KIM, Donghee. Non-alcoholic fatty liver disease and lifestyle modifications, focusing on physical activity. **The Korean Journal of Internal Medicine**, p.1-11, 6 dez. 2017.

KLEINER, D. E. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313–1321, 2005.

KWAK, M; KIM, D. Non-alcoholic fatty liver disease and lifestyle modifications, focusing on physical activity. **The Korean Journal of Internal Medicine**, p.1-11, 6 dez. 2017.

KWON, E.-Y.; SHIN, S.-K.; CHOI, M.-S. Ursolic Acid Attenuates Hepatic Steatosis, Fibrosis, and Insulin Resistance by Modulating the Circadian Rhythm Pathway in Diet-Induced Obese Mice. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1719, 2018.

LAMBERT, J. E. *et al.* Increased De Novo Lipogenesis Is a Distinct Characteristic of Individuals With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Gastroenterology**, v. 146, n. 3, p. 726–735, mar. 2014.

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

LEE, Y. K. *et al.* Curcumin exerts antidifferentiation effect through AMPK α -PPAR- γ in 3T3-L1 adipocytes and antiproliferatory effect through AMPK α -COX-2 in cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 305–310, 2009.

LEACH, M. J. The clinical feasibility of natural medicine, venotonic therapy and horsechestnut seed extract in the treatment of venous leg ulceration: a descriptive survey. **Complementary Therapies in Nursing and Midwifery**, v. 10, n. 2, p. 97–109, maio 2004.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 2ª Edição, 1995. Ed. Artmed.

LEHNINGER, T. M., & COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 4ª Edição, 2002. Ed. Artmed.

LI, Y. *et al.* AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-Induced Insulin-Resistant Mice. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 4, p. 376–388, abr. 2011.

LI, Y. *et al.* Ursolic acid stimulates lipolysis in primary-cultured rat adipocytes. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 11, p. 1609-1617, 2010.

LI, S. *et al.* Therapeutic Role of Ursolic Acid on Ameliorating Hepatic Steatosis and Improving Metabolic Disorders in High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e86724, 29 jan. 2014.

LIMA-JUNIOR, R.C. *et al.* Attenuation of visceral nociception by alpha- and beta-amyrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice. **Planta Med.**, v. 72, n.1, p. 34-39, 2006.

LIU, C. *et al.* Oleanolic Acid Diminishes Liquid Fructose-Induced Fatty Liver in Rats: Role of Modulation of Hepatic Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c-Mediated Expression of Genes Responsible for De Novo Fatty Acid Synthesis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–11, 2013.

LIU, C. *et al.* Pedunculoside, a novel triterpene saponin extracted from *Ilex rotunda*, ameliorates high-fat diet induced hyperlipidemia in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 101, n. February, p. 608–616, maio 2018.

LIU, J. *et al.* Maslinic acid modulates glycogen metabolism by enhancing the insulin signaling pathway and inhibiting glycogen phosphorylase. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 4, p. 259–265, 2014.

LIU, J. *et al.* Maslinic Acid Reduces Blood Glucose in KK-Ay Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 11, p. 2075–2078, 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2DeltaDeltaCT method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LONARDO, A *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease: Evolving paradigms. **World Journal of Gastroenterology**, [s.l.], v. 23, n. 36, p.6571-6592, 28 set. 2017.

LOVE-GREGORY, L. *et al.* Variants in the CD36 gene associate with the metabolic syndrome and high-density lipoprotein cholesterol. **Human Molecular Genetics**, v. 17, n. 11, p. 1695–1704, 2008

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p. 265-75, 1951.

MAIA, RM *et al.* Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): characterization in binary mixtures. **Quím. Nova [online]**, vol.23, n.5, p.623-626, 2000.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. **Avaliação Quantitativa da Esteatose Hepática**. 2010. 67 f. - Curso de Academia Nacional de Medicina, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

MEHLEM, A. *et al.* Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. **Nature Protocols**, v. 8, n. 6, p. 1149–1154, 23 jun. 2013.

MELO, C.M. *et al.* Anti-inflammatory effect of α , β -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Inflammation Research**, v. 60, n. 7, p.673-681, 12 mar. 2010.

MELO, C.M. *et al.* α , β -amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 34, p.4272-4280, 2010.

MELO, K. M. *et al.* α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpenoid from *Protium heptaphyllum* suppresses adipocyte differentiation accompanied by down regulation of PPAR γ and C/EBP α in 3T3-L1 cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, n. November 2018, p. 1860–1866, 2019.

MONTAGNER, A. *et al.* Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. **Gut**, v. 65, n. 7, p. 1202–1214, jul. 2016

MUTHULAKSHMI, S.; SARAVANAN, R. Efficacy of azelaic acid on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in high fat diet induced type 2 diabetic mice. **Biochimie**, v. 95, n. 6, p. 1239–1244, jun. 2013.

NAVALE, A. M.; PARANJAPE, A. N. Glucose transporters: physiological and pathological roles. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 1, p. 5–9, 19 mar. 2016.

NASCIMBENI F *et al.*, A. from NAFLD in clinical practice to answers from guidelines. **J Hepatol**, v.59, p. 859-871, 2013.

NERY, C. DA S. *et al.* Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhadas reduzidas na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 1, p. 49–55, fev. 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

OLIVEIRA, F. A. *et al.* Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 2, p.105-111, 2004.

OLIVEIRA, F.A. *et al.* Gastroprotective Effect of the Mixture of α - and β -Amyrin from *Protium heptaphyllum*: Role of Capsaicin-Sensitive Primary Afferent Neurons. **Planta Medica**, v. 70, n. 8, p.780-782, ago. 2004

OLIVEIRA, F.A. *et al.* Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1-2, p.103-108, abr. 2005.

PAN, J *et al.* Use of a quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method to study the induction of CYP1A, CYP2B and CYP4A forms in precision-cut rat liver slices. **Xenobiotica**, v. 32, n. 97, p. 39-47, 2002.

PARK, M. *et al.* 18 β -glycyrrhetic acid attenuates anandamide-induced adiposity and high-fat diet induced obesity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, n. 7, p. 1436–1446, 31 jul. 2014.

PATEL, V. and Sanyal, A.J. Drug-Induced Steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 17 (2013) 533–546.

PETERS, J. M.; CHEUNG, C.; GONZALEZ, F. J. Peroxisome proliferator-activated receptor- α and liver cancer: where do we stand? **Journal of Molecular Medicine**, v. 83, n. 10, p. 774–785, 23 out. 2005.

PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. Roles of Diacylglycerols and Ceramides in Hepatic Insulin Resistance. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 7, p. 649–665, jul. 2017.

PETTINELLI, P. *et al.* Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR- α ratio and steatosis in obese patients: Correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1792, n. 11, p. 1080–1086, nov. 2009.

PINTO, H.S. A. *et al.* Anti-inflammatory effect of α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. **Inflammopharmacology**, v. 16, n. 1, p.48-52, 1 fev. 2008.

PINTO, H.S.A. *et al.* Antinoceptive effect of triterpenoid α , β -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p.630-634, ago. 2008.

PURUSHOTHAM, A; SCHUG, TT; LI, X. SIRT1 performs a balancing act on the tight-rope toward longevity. **Aging**, v. 1, n. 7, p.669-673, 30 jul. 2009.

RAMESHREDDY, P. *et al.* Obesity-alleviating potential of asiatic acid and its effects on ACC1, UCP2, and CPT1 mRNA expression in high fat diet-induced obese Sprague–Dawley rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 442, n. 1–2, p. 143–154, 9 maio 2018.

RAO, V. S. *et al.* Ursolic acid, a pentacyclic triterpene from *Sambucus australis*, prevents abdominal adiposity in mice fed a high-fat diet. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 11, p.1375-1382, 2011.

ROBERTS, Katharine K.. **Non-Alcoholic Fatty Liver Disease**. EUA: UCSD Transplant Hepatology Fellow, 2017. 57 slides, color.

RUI, L. Energy Metabolism in the Liver. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. p. 177–197.

RUIZ, R. *et al.* Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 (SREBP-1) Is Required to Regulate Glycogen Synthesis and Gluconeogenic Gene Expression in Mouse Liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 9, p. 5510–5517, 28 fev. 2014.

RUTHERFORD, C. *et al.* Phosphorylation of Janus kinase 1 (JAK1) by AMP-activated protein kinase (AMPK) links energy sensing to anti-inflammatory signaling. **Science Signaling**, v. 9, n. 453, p. ra109–ra109, 8 nov. 2016.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799–806, dez. 2001.

SANTOS, F *et al.* Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p.1-8, 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-511x-11-98>.

SCHWABE, RF. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF- α -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. **Ajp: Gastrointestinal and Liver Physiology**, [S., v. 290, n. 4, p.583-589, 1 abr. 2006.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with ellman reagents. **Analytical Biochemistry**, v. 25 p. 192-205, 1968.

SHENG, H.; SUN, H. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: A multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 3, p. 543–593, 2011.

SHI, L. J. *et al.* Oxymatrine attenuates hepatic steatosis in non-alcoholic fatty liver disease rats fed with high fructose diet through inhibition of sterol regulatory element binding transcription factor 1 (Srebf1) and activation of peroxisome proliferator activated recep. **European Journal of Pharmacology**, v. 714, n. 1–3, p. 89–95, 2013.

SIANI, A. C.; Ramos, M. F. S.; Guimarães, A. C.; Susunaga, G. S.; Zoghbi, M. G. B.; J. Essent. Oil Res. 11, 72, 1999a.

SIANI, AC *et al.* Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p.57-69, jul. 1999.

SILVA, F. C.; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A. Celastraceae Family: Source of Pentacyclic Triterpenes with Potential Biological Activity. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1205–1220, 2014.

SINGH, S; OSNA, N; KHARBANDA, KK. Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: A review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 36, p.6549-6570, 28 set. 2017.

SONG, H.-M. *et al.* Carnosic acid protects mice from high-fat diet-induced NAFLD by regulating MARCKS. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 42, n. 1, p. 193–207, 27 mar. 2018

SUDHAKARA, G. *et al.* Modulatory effects of Caralluma fimbriata extract against high-fat diet induced abnormalities in carbohydrate metabolism in Wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 1062–1072, ago. 2017

SUN, X. *et al.* Protective effects of glycyrrhizic acid against non-alcoholic fatty liver disease in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 806, n. August 2016, p. 75–82, 2017.

SUNG, K; WILD, SH.; BYRNE, CD. Development of new fatty liver, or resolution of existing fatty liver, over five years of follow-up, and risk of incident hypertension. **Journal of Hepatology**, v. 60, n. 5, p.1040-1045, maio 2014.

SUNG, H. ; HONG, C.; SUH, Y.; CHO, H.; PARK, J.; BAE, J.; PARK, W.; HAN, J.; SONG, D. Role of (-)-epigallocatechin-3-gallate in cell viability, lipogenesis, and retinol-binding protein 4 expression in adipocytes. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 382, p. 303 – 310, 2010a.

SUNNY, N. E. *et al.* Excessive Hepatic Mitochondrial TCA Cycle and Gluconeogenesis in Humans with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 6, p. 804–810, dez. 2011.

SUSUNAGA, G.S *et al.* Triterpenes from the resin of Protium heptaphyllum. **Fitoterapia**, v. 72, n. 6, p.709-711, ago. 2001.

TANG, BL. Sirt1's systemic protective roles and its promise as a target in antiaging medicine. **Translational Research**, v. 157, n. 5, p.276-284, maio 2011.

TANG, BL; CHUA, CEL. Is systemic activation of Sirt1 beneficial for ageing-associated metabolic disorders? **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 391, n. 1, p.6-10, jan. 2010.

TILG, H; MOSCHEN, AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p.1836-1846, 29 out. 2010.

TOVO, C. V. *et al.* Transient hepatic elastography has the best performance to evaluate liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Annals of Hepatology**, v. 19, abr. 2019.

TRAN, A; GUAL, P. Non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. **Clinics And Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 37, n. 1, p.17-29, fev. 2013.

TRIM, W.; TURNER, J. E.; THOMPSON, D. Parallels in Immunometabolic Adipose Tissue Dysfunction with Ageing and Obesity. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 9 fev. 2018.

TSUNETO, A *et al.* Fatty liver incidence and predictive variables. **Hypertension Research**, v. 33, n. 6, p.638-643, 9 abr. 2010.

VEGIOPOULOS, A.; ROHM, M.; HERZIG, S. Adipose tissue: between the extremes. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 14, p. 1999–2017, 14 jul. 2017.

VIEIRA JÚNIOR, GM; SOUZA, CML; CHAVES, MH. Resina de Protium heptaphyllum: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p.183-187, mar. 2005.

WEI, Y. *et al.* Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 291, n. 2, p. E275–E281, ago. 2006.

WILLEBRORDS, J *et al.* Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research. **Progress in Lipid Research**, v. 59, p.106-125, jul. 2015.

WONG, VW *et al.* Incidence of non-alcoholic fatty liver disease in Hong Kong: A population study with paired proton-magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 1, p.182-189, jan. 2015.

XAVIER, Hermes Toros. Farmacologia do fibratos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s.l.], v. 85, p.15-16, out. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0066-782x2005002400004>.

XIE, Q. *et al.* Soyasaponins Reduce Inflammation and Improve Serum Lipid Profiles and Glucose Homeostasis in High Fat Diet-Induced Obese Mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n. 19, p. 180-205, out. 2018.

XU, Y. *et al.* Ginsenoside Rg1 Protects against Non-alcoholic Fatty Liver Disease by Ameliorating Lipid Peroxidation, Endoplasmic Reticulum Stress , and Inflammasome Activation. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 41, n. 11, p. 1638–1644, 2018

YAMADA, K. *et al.* Dietary Corosolic Acid Ameliorates Obesity and Hepatic Steatosis in KK-Ay Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 4, p. 651–655, 2008.

YANG, S *et al.* Mitochondrial Adaptations to Obesity-Related Oxidant Stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 378, n. 2, p.259-268, jun. 2000.

YANG, X. *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and CD36 protein expression: The dual pathophysiological roles of progesterone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 29, p. 15108–15118, 2016.

YEH, YTE *et al.* Chinese olive extract ameliorates hepatic lipid accumulation in vitro and in vivo by regulating lipid metabolism. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

YONEDA, Masato *et al.* Influence of inducible nitric oxide synthase polymorphisms in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Hepatology Research**, v. 39, n. 10, p.963-971, out. 2009.

YOUNOSSI, Z. M. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Implications for liver transplantation. **Liver Transplantation**, v. 24, n. 2, p. 166–170, fev. 2018.

YU, S.; RAO, S.; REDDY, J. K. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, Fatty Acid Oxidation, Steatohepatitis and Hepatocarcinogenesis. **Current Molecular Medicine**, v. 3, n. 6, p. 561–572, 1 set. 2003.

ZAMARA, Elena *et al.* 4-Hydroxynonenal as a selective pro-fibrogenic stimulus for activated human hepatic stellate cells. **Journal of Hepatology**, v. 40, n. 1, p.60-68, jan. 2004.

ZHANG, D. *et al.* Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 43, p. 17075–17080, 23 out. 2007.

ZHANG, Y. *et al.* PPAR α/γ agonists and antagonists differently affect hepatic lipid metabolism, oxidative stress and inflammatory cytokine production in steatohepatic rats. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 127–135, set. 2015.

ZHANG, Y. *et al.* Ursolic acid prevents augmented peripheral inflammation and inflammatory hyperalgesia in high-fat diet-induced obese rats by restoring downregulated spinal PPAR α . **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 6, p. 5309–5316, jun. 2016.

ZHAO, M. *et al.* Triterpenic acids-enriched fraction from *Cyclocarya paliurus* attenuates non-alcoholic fatty liver disease via improving oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 104, n. March, p. 229–239, ago. 2018.

ZENG, L. *et al.* Alisol A 24-Acetate Prevents Hepatic Steatosis and Metabolic Disorders in HepG2 Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 3–4, p. 453–464, 2016.

ZHU, J. *et al.* Chemico-Biological Interactions Ganoderic Acid A improves high fat diet-induced obesity , lipid accumulation and insulin sensitivity through regulating SREBP pathway. **Chemico-Biological Interactions**, v. 290, n. May, p. 77–87, 2018.

ZOGHBI, MGB; MAIA, JGS.; LUZ, AIR. Volatile Constituents from Leaves and Stems of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, n. 5, p.541-543, set. 1995.

ZUBERBUHLER, F.; BOURSIER, J. Noninvasive diagnosis of liver fibrosis in NAFLD: Tips tricks. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 19, abr. 2019

ANEXO I - FOLHA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da resina de Protium heptaphyllum e da mistura de alfa e beta-amirina na doença hepática não alcoólica em camundongos", protocolada sob o CEUA nº 5347120318 (ID 000247), sob a responsabilidade de **Flávia Almeida Santos e equipe; RENAN PEREIRA DE LIMA** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 30/05/2018.

We certify that the proposal "Effect of Protium heptaphyllum resin and the mixture of alpha and beta-amirina on non-alcoholic liver disease in mice", utilizing 70 Heterogenics mice (70 males), protocol number CEUA 5347120318 (ID 000247), under the responsibility of **Flávia Almeida Santos and team; RENAN PEREIRA DE LIMA** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 05/30/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **04/2018 a 01/2020**

Área: **Departamento de Fisiologia E Farmacologia**

Origem: **Biotério Central da UFC**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **5 a 7 semanas**

N: **70**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **23 a 25 g**

Local do experimento: Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Rua Coronel Nunes de Melo, Nº 1315, 1º Andar. Bairro Rodolfo Teófilo. Fortaleza, Ceará.

Fortaleza, 05 de maio de 2019

Alexandre Havt Bindá

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

C. Roncari

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais