VICÊNCIA MARA RODRIGUES DE LIMA

**Esteato-hepatite não alcoólica (ENA) em camundongos
obesos (ob/ob): avaliação do efeito citoprotetor do Yo
Jyo Hen Shi Ko (YHK)**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Gastroenterologia Clínica
Orientadora: Profa. Dra. Claudia Pinto Marques
Souza de Oliveira

São Paulo
2007

Dedicatória

Aos meus pais, Shirley e José Cosme de Lima, responsáveis por tudo que eu conquistei na minha vida pessoal e profissional, sempre me orientando da forma mais correta possível e sem os quais eu não chegaria até aqui.

**À minha tia, Vicência, pelo amor e afeto
em todos os dias de minha vida.**

**Obrigada pelo grande apoio que me
permitiu alcançar mais esta etapa de
minha vida.**

**Aos meus filhos, Dayanne e Raphael,
obrigado pelo carinho, amor e por toda a
alegria que vocês trouxeram para a minha
vida.**

**Ao Stephen Caldwell, meu mentor
intelectual, por me incentivar em todos os
momentos. Obrigado pelo amor e carinho
que nos acompanhou nesta fase das
nossas vidas.**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira, minha orientadora, que além de me guiar em todas as fases deste curso, reconheceu minha capacidade de levar este projeto adiante. Neste período de convivência, suas qualidades de pesquisadora e de ser humano fizeram aumentar, ainda mais, minha admiração e estima. Sou grata pela paciência, carinho, apoio, e pela inestimável orientação dedicada em todas as etapas deste trabalho. Agradeço por ter contribuído para meu amadurecimento científico, humano e profissional. Pela grande amizade compartilhada.

Ao Prof. Dr. Flair José Carrilho, por ter permitido e incentivado o início deste estudo e ter acreditado no meu trabalho.

Ao Dr. José Tadeu Stefano pela amizade e companheirismo compartilhados nestes anos de convívio. Agradeço também pelas valiosas sugestões na Banca de Qualificação de Mestrado e na elaboração do manuscrito final.

Ao Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves e ao Dr. Evandro Sobroza de Mello pelo grande auxílio na análise histológica das amostras de tecido hepático.

Ao Dr. Alberto Queiroz Farias pela amizade e auxílio na revisão do manuscrito final

À secretária Claudia de Arruda pelo grandioso auxílio na formatação deste trabalho e amizade compartilhada em vários momentos desde o início do estudo.

Ao técnico do LIM 07, José Édson Pereira pelo agradável convívio e inestimável colaboração na realização dos experimentos.

Aos Doutores Dulce Reis Guarita e Adérson Omar Damião pelas valiosas sugestões na Banca de Qualificação de Mestrado.

Ao Dr. Hermes Vieira Barbeiro, grande amigo que me ensinou alguns aspectos técnicos durante os procedimentos de avaliação do estresse oxidativo.

À Capes e a Família Alves de Queiroz pelo auxílio financeiro concedido.

À todos os funcionários do curso de Pós-graduação.

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

	Lista de Abreviaturas e Siglas	
	Lista de Figuras	
	Lista de Tabelas	
	Resumo	
	Summary	
1.	INTRODUÇÃO	01
1.1.	Definição, Epidemiologia e História Natural da DHGNA	02
1.2.	Fatores Predisponentes e Fisiopatogênese	05
1.3.	Modelos Animais de DHGNA	12
1.4.	Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK)	18
2.	OBJETIVOS	20
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1.	Animais	24
3.2.	Local	25
3.3.	Preparação e Delineamento Experimental	25
3.3.1.	Composição das dietas	27
3.4.	Avaliação da Lesão Hepatocelular	28
3.4.1.	Bioquímica	28
3.4.2.	Avaliação Histológica	29
3.4.3.	Avaliação do Estresse Oxidativo Hepático	30

3.4.3.1.	Determinação do Malondialdeído (MDA)	31
3.4.3.2.	Determinação da Glutathione (GSH) Hepática	32
4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5.	RESULTADOS	35
5.1.	Efeitos do YHK na Composição Corpórea dos Animais	36
5.2.	Efeitos do YHK nas Concentrações Séricas das Aminotransferases (AST/ ALT) e Lípides Plasmáticos em Camundongos ob/ob submetidos à dieta DCM ou dieta hiperlipídica	39
5.3.	Efeitos do YHK sobre os Aspectos Morfológicos em Camundongos obesos ob/ob submetidos à dieta deficiente em colina/ metionina ou dieta hiperlipídica	41
5.4.	Efeitos do YHK sobre os Parâmetros de Estresse Oxidativo em Camundongos obesos ob/ob submetidos à dieta deficiente em colina/ metionina ou dieta hiperlipídica	44
6.	DISCUSSÃO	47
7.	CONCLUSÕES	54
7.1.	Anexos	57
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	ácidos graxos
AGL	ácidos graxos livres
ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
ATP	adenosina trifosfato
ATP III	“Adult Treatment Panel III”
CAPPesp	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CHC	carcinoma hepatocelular
DHGNA	doença hepática gordurosa não alcoólica
DCM	dieta deficiente em colina e metionina
DM	“diabetes mellitus”
ENA	esteato-hepatite não alcoólica
EROS	espécies reativas de oxigênio
FA	fosfatase alcalina
FC	fosfatidilcolina
GSH	glutathione
H	dieta hiperlipídica
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	lipoproteína de alta densidade
HE	hematoxilina-eosina
IMC	índice de massa corpórea

LDL	lipoproteína de baixa densidade
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MDA	malondialdeído
min	minutos
NAS	“Non Alcoholic Fat Liver Disease Activy Score”
NCEP	“National Cholesterol Education Program”
NIH	“Nationa Institute of Health”
PPAR	“peroxisome proliferator-activated receptor alpha”
TNF α	fator de necrose tumoral alfa
VLDL	lipoproteína de baixíssima densidade
YHK	Yo Jyo Hen Shi Ko

LISTA DE SÍMBOLOS

↑	aumento
↓	diminuição
α	alfa
β	beta
γ	gama
–	menos que
=	igual a
±	mais ou menos que
<	menor que
>	maior que
≤	menor que ou igual a
≥	maior que ou igual a
~	aproximadamente
p	significância estatística
°C	graus Celsius
%	por cento
cm	centímetros
g	grama
kg	quilograma
kg/m ²	quilograma por metro quadrado
L	litro
m	mili

m	metro
M	molar
mg/dL	miligramma por decilitros
mg/kg	miligramma por quilo
mm	milímetro
ng	nanogramma
V	volts

LISTA DE FÓRMULAS

H_2O_2 peróxido de hidrogênio

KCl cloreto de potássio

OH radica hidroxil

O_2^- radical superóxido

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fisiopatogênese da DHGNA.	09
Figura 2	Histologia hepática de esteato-hepatite em camundongos ob/ob submetidos à dieta deficiente em colina e metionina (DCM) (2A). Histologia hepática de esteato-hepatite em camundongos ob/ob submetidos à dieta Hiperlipídica (H) (2B).	18
Figura 3	Variação do peso dos camundongos ob/ob submetidos às dietas deficiente em colina e metionina e hiperlipídica, com ou sem a adição do YHK.	37
Figura 4	Efeito do Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK) na adipocidade visceral. Observa-se intensa redução na adiposidade visceral após o uso de 4 semanas do YHK em relação ao animal que utilizou apenas a dieta deficiente de colina e metionina (DCM).	38
Figura 5	Redução da esteatose macro/microvesicular e do infiltrado inflamatório lobular misto, presentes nos animais submetidos às dietas hiperlipídica (Figura 5A) e deficiente em colina e metionina (Figura 5C), com a utilização do YHK (Figura 5B e 5D).	43
Figura 6	Redução dos níveis hepáticos de MDA nos camundongos submetidos às dietas deficiente em colina e metionina e hiperlipídica associadas ao YHK.	45
Figura 7	Redução dos níveis séricos de GHS nos camundongos submetidos à dieta DCM associadas ao YHK.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Modelos animais para estudo da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Esteato-hepatite Não Alcoólica – Fatores Genéticos.	13
Tabela 2	Modelos animais para estudo da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Esteato-hepatite Não Alcoólica – Fatores Ambientais.	14
Tabela 3	Formulações das dietas utilizadas.	26
Tabela 4	Concentrações séricas da alanino aminotransferase (AST), aspartato aminotransferase (ALT), colesterol total e triglicérides em camundongos obesos ob/ob que foram alimentados com uma dieta deficiente em colina e metionina ou uma dieta hiperlipídica com ou sem tratamento com YHK.	40
Tabela 5	Variáveis histológicas nos diversos grupos de camundongos obesos.	42

RESUMO

LIMA VMR. Esteato-Hepatite Não Alcoólica (ENA) em camundongos obesos (ob/ob): avaliação do efeito citoprotetor do YO JYO HEN SHI KO (YHK) [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Introdução: A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) tem sido considerada atualmente a forma mais comum de doença hepática no mundo ocidental, relacionada principalmente ao aumento da prevalência da obesidade. A DHGNA abrange um largo espectro de doença, desde casos de esteatose simples até esteato-hepatite (ENA) e fibrose, podendo evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC). Embora se conheçam os fatores predisponentes para o desenvolvimento da ENA, sua patogênese, assim como tratamento eficaz, permanecem pouco conhecidos. Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK), produto derivado do Henshiko, é formado por 4 ingredientes: *Panax pseudo ginseng*, *Eucommia ulmoides*, *Polygonati rhizoma*, e *Licorice root*. Estes compostos que apresentam propriedades antioxidantes, hepatoprotetoras, hipoglicemiantes e hipolipemiantes. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do YHK na ENA em camundongos obesos (ob/ob). **Métodos:** ENA foi induzida em camundongos ob/ob, machos, pesando 40-50g, com 8 semanas de vida, por meio de dieta deficiente em colina e metionina (DCM) ou dieta hiperlipídica (H) durante 4 semanas. Os animais foram distribuídos aleatoriamente por meio de tabela de classificação seqüencial randomizada em 5 grupos, com 5 animais em cada grupo: 1) Grupo DCM: submetidos à dieta em pó, deficiente em colina e metionina por um período de 4 semanas associada a 0,3 mL de solução

fisiológica por meio de gavagem diária; 2) Grupo DCM tratado com YHK: submetidos à dieta em pó, deficiente em colina e metionina por um período de 4 semanas associada à solução de YHK (Kyotsu, Yokyo, Japan) (20mg/kg/dia diluída em 0,3mL de solução fisiológica) administrados diariamente por gavagem; 3) Grupo H: submetidos à dieta em pó, hiperlipídica, por 4 semanas associada a 0,3 mL de solução fisiológica diariamente por meio de gavagem; 4) Grupo H tratado com YHK: submetidos à dieta hiperlipídica por um período de 4 semanas associada a solução de YHK (Kyotsu, Yokyo, Japan) (20mg/Kg/dia diluída em 0,3mL solução fisiológica) administrados diariamente por gavagem; 5) Grupo C: submetidos à dieta padrão NUVILAB CR1 (NUVITAL Industria Brasileira Ltda.) por um período de 4 semanas associada a 0,3 mL de solução fisiológica diariamente por meio de gavagem. O diagnóstico histológico de DHGNA e ENA foi determinado segundo a classificação padronizada pelo “Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network”, que designou e validou as características histológicas e um sistema de escore de atividade para DHGNA. **Resultados:** Os animais das dietas DCM e H não tratados com YHK desenvolveram moderada esteatose macro e microgoticular, balonização hepatocelular e infiltrado inflamatório misto. Com a adição de YHK, ocorreu uma redução na esteatose e inflamação em ambas as dietas. No que se refere à bioquímica hepática, as aminotransferases reduziram-se significativamente em ambos os grupos tratados com o YHK. Associadamente observou-se perda de peso significativa nos camundongos tratados com o YHK em ambas as dietas empregadas (DCM e H) ($p < 0,05$), embora a ingestão alimentar não tenha sido diferente entre os grupos. A redução da ENA e das concentrações de aminotransferases associou-se à redução do estresse oxidativo hepático, avaliado pela diminuição na lipoperoxidação no tecido hepático (redução do MDA - Malonaldeído). Contudo, a glutatona reduzida (GSH) só sofreu redução

significativa no grupo da dieta DCM que usou o YHK. **Conclusões:** Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK) inibiu o desenvolvimento da ENA experimental induzida por dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e hiperlipídica (H), reduziu as concentrações séricas das aminotransferases e reduziu os parâmetros de estresse oxidativo hepático nesses dois modelos experimentais. Futuros estudos serão necessários para elucidar melhor, o mecanismo de hepatoprotetor do YHK.

SUMMARY

LIMA VMR. YO JYO HEN SHI KO, a novel Chinese herbal, prevents nonalcoholic steatohepatitis in ob/ob mice fed a high fat or methionine/choline deficient diet [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2007.

Background: Oxidative stress plays a role in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK) is a complex compound purported to reduce reactive oxygen species (ROS) by blocking the propagation of radical-induced reactions. **Aim:** The aim of this study was to evaluate the role of the effect of YHK in experimental NASH. **Methods:** NASH was induced in male ob/ob mice by a high-fat (H) diet or methionine/choline deficient (MCD) diet for 4 weeks. YHK-treated animals received YHK solution orally (20 mg/kg/day) in both experimental diets (n = 5; each group) while control animals received only vehicle. **Results:** The MCD and H groups developed moderate diffuse macrosteatosis, hepatocellular ballooning, and a diffuse inflammatory infiltrate. With the addition of YHK, there was a marked reduction in macrosteatosis in both groups. This was associated with decreased lipoperoxide and reduced glutathione (GSH) concentrations as well as reduced serum aminotransferases and improved histological markers of inflammation. These changes were also associated with weight loss in the MCD+YHK group and diminished weight gain in the H+YHK group. **Conclusion:** YHK therapy blunts the development of macrosteatosis in these models of NASH and significantly reduces markers of oxidative stress. YHK also diminishes weight gain in this obesity prone model. Our findings warrant further study on the mechanisms involved with these effects.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Definição, Epidemiologia e História Natural da DHGNA

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) tem sido considerada atualmente, a forma mais comum de doença hepática no mundo ocidental, relacionada principalmente ao aumento da prevalência da obesidade (Zafrani, 2004). A DHGNA abrange um largo espectro de doença, desde casos de esteatose simples até esteato-hepatite (ENA) e fibrose, podendo evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) (Powell et al., 1990; Caldwell et al., 1999).

A ENA é caracterizada por esteatose macro/microgoticular, infiltrado inflamatório misto, balonização hepatocelular em zona III, podendo apresentar fibrose, corpúsculos de Mallory e cirrose (Brunt, 2005). Foi descrita por Ludwig et al. (1980) em pacientes com alterações histológicas semelhantes às encontradas na hepatite alcoólica, contudo na ausência de ingestão alcoólica. Este estudo representou um marco para o crescente interesse pelos mais variados aspectos da DHGNA.

A prevalência de DHGNA varia de 10-40% nas populações da América do Norte, Japão, Europa, Austrália e América do Sul, sendo a prevalência global estimada em 20% (Browning et al., 2004; Clark, 2006). Estudos epidemiológicos estimam que 20% a 34% dos adultos nos Estados Unidos são obesos e recentes estudos demonstraram que até 34% da população adulta americana têm um excessivo acúmulo de gordura hepática, não relacionada ao abuso do álcool sugerindo que mais de 60 milhões de americanos sejam portadores de DHGNA (Clark et al., 2002). No Brasil, embora não existam estudos populacionais relacionados à DHGNA, um inquérito realizado pela Sociedade Brasileira de Hepatologia computou 2.232 casos de DHGNA, 68% dos quais com ENA (Cotrim et al., 2004).

A alta prevalência da DHGNA não é exclusiva da população caucasiana ocidental. Jimba et al. (2005), utilizando ultra-sonografia, relataram uma prevalência de até 29% de adultos japoneses saudáveis, indicando uma doença de proporções epidêmicas em diferentes populações. A DHGNA ocorre em qualquer idade, inclusive em crianças e adolescentes, sem que haja predomínio de sexo. A prevalência de DHGNA em crianças é de 2,6%, contudo, aumenta até 53% nas crianças obesas (Saviano et al., 1997).

A prevalência da ENA é estimada em torno de 1,2% a 4,8% na população geral, contudo, sua frequência aumenta consideravelmente em portadores de obesidade, sobrepeso (Falck-Ytter et al., 2001) e síndrome metabólica (SM) (Marchesini et al., 1999; Adams et al., 2005;

Xiong e Zhiping, 2006). Segundo os critérios diagnósticos do ATP III ("Adult Treatment Panel III"), define-se síndrome metabólica, quando três ou mais dos seguintes critérios estão presentes: obesidade abdominal (visceral), (cintura > 102 cm em homens e > 88 cm em mulheres); hipertrigliceridemia > 150 mg/dL; HDL colesterol < 40 mg/dL em homens e < 50 mg/dL em mulheres; hipertensão arterial sistêmica > 130/85 mmHg; glicemia de jejum > 110 mg/dL. Estudo realizado no Japão mostra que há relação positiva entre ENA, síndrome metabólica e adiposidade visceral (Hamaguchi et al., 2005). Da mesma forma, Chitturi et al. (2002) confirmaram a presença de síndrome metabólica em cerca de 85% dos pacientes portadores de ENA e Marchesini et al. (2001) e Marchesini et al. (2003), demonstraram que a presença de 3 critérios da síndrome metabólica em pacientes com DHGNA eleva em 3,5 vezes o risco para desenvolver fibrose acentuada e doença crônica hepática (Gholam et al., 2002).

A cirrose criptogênica parece ser na maioria dos casos uma evolução da DHGNA (Caldwell et al., 1999). Pacientes com cirrose criptogênica apresentam significativamente mais obesidade e diabetes, em comparação aos pacientes com cirrose viral ou cirrose auto-imune. Além disso, existe constatação que muitos pacientes que receberam transplante hepático, por cirrose criptogênica, desenvolveram DHGNA e esteato-hepatite no pós-transplante. A dificuldade de diagnóstico quando já existe cirrose é que, nesse estágio há redução ou desaparecimento da esteatose, provavelmente por perda da capilarização dos sinusóides

associada a mudanças no metabolismo das lipoproteínas.

O interesse pela história natural, pela patogênese e pelo tratamento da DHGNA tem aumentado expressivamente nos últimos dez anos. Marchesini e Forlani (2002) localizaram 161 artigos sobre ENA entre 1980 e 1999 e, mais 122 artigos em 2000 e 2001 (Marchesini e Forlani, 2002), demonstrando o grande aumento de publicações da DHGNA.

1.2 Fatores Predisponentes e Fisiopatogênese

A patogênese da DHGNA ainda não está totalmente elucidada, entretanto, diversos estudos têm demonstrado que a DHGNA é multifatorial. Diversos fatores ou condições têm sido relacionados à predisposição para desenvolvimento da DHGNA. Dentre eles destacam-se a obesidade, a síndrome metabólica, diabetes, dietas hipercalóricas, o sedentarismo, a presença de mutações e polimorfismos nos genes relacionados à resistência insulínica, hipertensão arterial, anormalidades no metabolismo lipídico e nos adipócitos. Outros fatores predisponentes também têm sido detectados, contudo em menor escala, como cirurgias de “bypass” jejuno-ileal, desnutrição calórico-protéica, nutrição parenteral prolongada, uso de drogas e exposição ocupacional (Cotrim et al., 1999; Adams et al., 2005; Chituri e Farrell, 2001).

Embora se conheçam os fatores predisponentes, e se saiba que a esteatose pode evoluir para cronicidade, a verdadeira relação causal entre esteatose ou ENA, fibrogênese e doença crônica do fígado,

assim como sua patogênese, ainda não estão totalmente esclarecidas. A teoria mais aceita atualmente foi proposta por Day e James (1998) e se refere à teoria dos dois “hits”. Segundo estes autores, a resistência insulínica seria a condição inicial ou primeiro estímulo (“first hit”), necessário para o acúmulo de ácidos graxos no hepatócito e o estresse oxidativo ou a endotoxemia crônica como segundo estímulo (“second hit”) para o desenvolvimento de inflamação e fibrose.

A etapa inicial segundo a teoria dos dois “hits” seria o acúmulo de ácidos graxos no hepatócito, suplantando sua capacidade de metabolização e exportação conseqüente à ação lipogênica da insulina. A hiperinsulinemia presente na obesidade e síndrome metabólica favoreceria a lipogênese hepática e aumentaria a lipólise periférica, aumentando excessivamente a quantidade de ácidos graxos para o fígado, condições estas favoráveis para a infiltração gordurosa hepática (McCullough, 2006). O tecido adiposo libera a gordura na forma de ácidos graxos livres (AGL), mediante o estímulo da adrenalina, corticosteróide e outros hormônios como a insulina. Os AGL têm dois destinos após entrada nos hepatócitos: são oxidados pelas mitocôndrias para gerar energia (ATP) ou são convertidos novamente em triglicérides, acoplados às lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e exportados do fígado para o tecido adiposo (Figura 1). A deposição de triglicérides no interior do hepatócito (esteatose) decorre principalmente da disponibilidade e mobilização de AGL, da síntese hepática aumentada de AGL e do decréscimo da exportação hepática de triglicérides sob a forma de VLDL.

Provavelmente, na DHGNA exista uma combinação destes fatores intensificados por alterações na lipólise pós-prandial relacionada à insulina, a qual provoca aumento de ácidos graxos liberados para o fígado; excesso de carboidratos na dieta que resulta em nova síntese de ácidos graxos hepáticos; falha na β -oxidação mitocondrial e depleção de adenosina trifosfato; produção de citocinas próinflamatórias e um complexo mecanismo deficiente de transporte de triglicérides (Brunt et al., 2004).

O estresse oxidativo (“second hit”), por sua vez, gerado neste contexto, seria importante na evolução de esteatose para esteato-hepatite e fibrose (Madan et al., 2006; Leclercq et al., 2000; Yang et al., 2000; Oliveira et al., 2002; Oliveira et al., 2005). Durante o metabolismo normal, o oxigênio é reduzido a água e, nesse processo, os produtos intermediários são o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH^{\cdot}$), denominados conjuntamente espécies reativas de oxigênio (EROS). Esses compostos têm meia-vida ultra curta, pois a presença de um elétron não-pareado os faz reagir com moléculas de DNA, proteínas e lipídios. O estresse oxidativo se estabelece quando as defesas intracelulares antioxidantes são insuficientes para detoxificar as EROS ou, também, quando há produção excessiva de EROS. Dentro desse contexto, o excessivo aporte de ácidos graxos ao fígado pode promover esgotamento da oxidação mitocondrial e aumento na produção de EROS, bem como ativação de outras vias de oxidação lipídica (via peroxissomal e microssomal) que geram, por sua vez, mais EROS,

aumentando o estresse oxidativo hepático. Esse aumento pode causar peroxidação lipídica, cujos produtos intermediários são importantes agentes pró-inflamatórios e parecem ativar as células de ITO, favorecendo a fibrogênese (“second hit”) (Lee et al., 1995). Um dos produtos finais da peroxidação de lipídios é o malondialdeído (MDA) que ativa a produção de colágeno com conseqüente fibrose (Lee et al., 1995). O processo inflamatório também pode ser desencadeado pelo MDA que ativa citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-8 e interleucina-6. Oliveira et al. (2002) demonstraram em ratos, que a deposição crônica de gordura no fígado está associada à peroxidação de lipídios, e que o grau de peroxidação é proporcional à gravidade da esteatose. De forma paralela, Oliveira et al. (2005) demonstraram em fígado de pacientes com obesidade mórbida, submetidos à cirurgia de Fobi-Capella, correlação positiva entre a presença de esteato-hepatite e o aumento da produção de hidroperóxidos.

Figura 1 Fisiopatogênese da DHGNA

Um outro estímulo importante, além do estresse oxidativo, na progressão para inflamação e fibrose na DHGNA, seria a endotoxemia crônica presente principalmente na obesidade. A obesidade e a síndrome metabólica são condições inflamatórias que conduzem à aterosclerose e a um processo inflamatório crônico (Stumvol, 2003; Das, 2002). A elevação de proteínas de fase aguda e de citocinas pró-inflamatórias está demonstrada em obesos livres de traumas, infecções, artropatias crônicas, moléstias auto-imunes e também derivação jejuno-ileal (Kern et al., 1995; Duncan et al., 2000). O tecido adiposo secreta citocinas que atuam em mecanismos responsáveis pela sensibilidade à insulina. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, que além de participar da resposta imunológica e da etipatogenia de algumas neoplasias, também está envolvido na gênese da resistência insulínica, por inibir a fosforilação de receptores de insulina. O TNF- α é expresso pelo tecido adiposo e está envolvido em todas as fases de lesão hepática na DHGNA, promovendo a esteatose, estimulando a lipogênese nos hepatócitos e aumentando a liberação de AGL pelos adipócitos. Além disso, induz diretamente a apoptose dos hepatócitos e participa do processo de ativação de células estreladas, contribuindo para o desenvolvimento de fibrose hepática (Diehl et al., 2005; Farrell e Larter, 2006).

Estudos recentes relacionam a adiposidade visceral às manifestações deletérias da “lipotoxicidade” da síndrome metabólica. O tecido adiposo não é mais considerado um tecido inerte para reserva de energia ou de excesso de ácidos graxos livres; é altamente ativo como um

órgão endócrino e originando numerosos produtos secretórios ativos, coletivamente chamados de adipocinas ou adipocininas. A leptina, proteína de 16K, descoberta em 1994, é sintetizada pelo tecido adiposo e surge como uma adipocina importante na fisiopatogênese da DHGNA. É encontrada em níveis elevados na maioria dos pacientes com ENA (Copaci et al., 2006) e parece participar do desenvolvimento da fibrose em pacientes com ENA mediante a ativação das células estreladas (Leclercq et al., 2002; Ikejima et al., 2002). A leptina é liberada do tecido adiposo em quantidades proporcionais à massa de tecido adiposo, indicando estado de abundância energética (Baratta, 2002). Assim, se aceita que a leptina tenha um paralelismo com o balanço energético: em situação de balanço energético negativo como em restrição dietética, há redução dos níveis de leptina com conseqüente redução do gasto energético e aumento do apetite; em situações de abundância de energia, a leptina aumenta, reduzindo o apetite e aumentando o gasto energético. Estudos indicam que a maioria dos obesos tem altos níveis de leptina por serem resistentes à sua ação. Contudo, os mecanismos que explicam a resistência à leptina em obesos não são completamente reconhecidos, mas devem resultar de defeitos no transporte da barreira hematoencefálica ou de sinalização intracelular prejudicada (Enriori et al., 2006).

1.3. Modelos Animais de DHGNA

Estudos em animais têm ajudado no conhecimento sobre os mecanismos fisiopatogênicos e terapêuticos de DHGNA. Atualmente existem vários modelos animais para estudar a DHGNA e ENA, embora nenhum deles consiga reproduzir na totalidade, os componentes essenciais presentes na doença humana (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Modelos animais para estudo da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Esteato-hepatite Não Alcoólica – Fatores Genéticos

Modelo Animal	Descrição	DM/RI	Obeso	Leptina	Fibrose
<i>Aumento a importação e síntese de lipídios</i>					
Camundongos ob/ob	Deficiente em leptina. Esteatose que progride para ENA após o "second hit".	SIM	SIM	↓	NÃO
Camundongos db/db	Deficiente no receptor da leptina. Esteatose que progride para ENA após o "second hit"	SIM	SIM	↓	SIM
Camundongos obesos amarelo agouti (Ay)	Hiperfágico. Não há supressão do apetite no hipotálamo pela melanocortina	SIM	SIM	-	NÃO
Camundongos CD36 ^{-/-}	Aumento do influxo de ácidos graxos no fígado. Esteatose	NÃO	NÃO	-	NÃO
Camundongos PEPCK-NSREBP-1a	Lipoatrofia. SREBP-1c superexpresso no tecido hepático. Esteatose	SIM	SIM	↓	NÃO
Camundongos aP2-NSREBP-1c	Lipoatrofia. SREBP-1c superexpresso no tecido adiposo. Esteatose	SIM	SIM	↓	NÃO
<i>Redução na exportação e catabolismo dos lipídios</i>					
Camundongos PPAR α ^{-/-}	Disfunção mitocondrial da β -oxidação. Esteatose	NÃO	NÃO	-	NÃO
Camundongos Acetyl CoA oxidase ^{-/-}	Disfunção mitocondrial da β -oxidação. Esteatose transitória	-	-	-	-
Camundongos Aromatase (Cyp19)	Deficiência de estrógeno na fêmea	NÃO	SIM		NÃO
MTP ^{-/-}	Deleção de uma enzima mitocondrial da β oxidação. ENA	SIM	?	?	?

Adaptado de Anstee e Goldin, 2006.

Tabela 2. Modelos animais para estudo da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Esteato-hepatite Não Alcoólica – Fatores Ambientais

Modelo Animal	Descrição	DM/RI	Obeso	Leptina	Fibrose
<i>Promovem aumento da importação e síntese lipídica</i>					
Dieta com alto teor de gordura	↑ adiposidade,				
	↑ influxo de ácidos graxos (AG), ↑ resistência insulínica.	SIM	SIM	↑	?
	Esteatose e ENA				
Dieta com alto teor de sacarose e frutose	↑ síntese de AG				
	↑ enzimas hepáticas	NÃO	NÃO	-	NÃO
	Esteatose				
<i>Deficiência de Arginina</i>	↑ síntese de AG. Esteatose	NÃO	NÃO	-	NÃO
<i>Redução na exportação lipídica</i>					
Dieta DCM	Disfunção na β -oxidação mitocondrial				
	↓ exportação de triglicérides	NÃO	NÃO	-	SIM
	Esteatose e ENA				
Esteróide e tamoxifen	Disfunção na β -oxidação mitocondrial				
	↓ exportação de triglicéride	SIM	SIM	-	-
	Esteatose				

Adaptado de Anstee e Goldin, 2006.

Entre os principais modelos destaca-se o modelo do camundongo obeso deficiente em leptina (ob/ob) que é portador de síndrome metabólica. Esses camundongos apresentam comportamento e fisiologia de animais em um estado constante de jejum, hiperfágicos e hipometabólicos, com níveis séricos elevados de corticosterona e insulina, hipotérmicos e incapazes de se manterem aquecidos e, com alterado limiar de apetite, o que gera a obesidade característica com distúrbios metabólicos similares aos dos diabéticos. Apresentam também, comprometimento no crescimento e na reprodução, sendo inférteis quando desenvolvem a obesidade, resistência insulínica e esteatose hepática espontânea com 10-12 semanas de vida, sendo esse desenvolvimento uma das características mais fortes que favorecem o uso deste animal na DHGNA. Contudo, este animal não desenvolve ENA espontaneamente, necessitando de um segundo estímulo (“second hit”) para que a esteatose se transforme em esteato-hepatite. Outros modelos como o rato fa/fa (Zucker) e o camundongo db/db desenvolvem resistência insulínica e obesidade pelo fato de apresentarem mutações no receptor da leptina. Estes animais, além de obesidade e hiperinsulinemia, apresentam hiperfagia, infertilidade, intolerância à glicose e alterações neuro-endócrinas e termogênicas, semelhantes àsquelas dos camundongos ob/ob (Koteish et al., 2002; Anstee e Goldin, 2006; Nanji, 2004).

Em modelos com animais transgênicos, que eliminaram ou incorporaram ao seu genoma fragmentos específicos de DNA, podemos

estudar as funções de alguns genes através da expressão aumentada ou anulada. Os modelos transgênicos podem ser produzidos tanto para a obtenção de um determinado fator medicinal de interesse, como também para a pesquisa científica em busca da cura de determinadas doenças. Os “knockout” têm uma seqüência parcial ou total de um gene retirada, de forma a gerar uma determinada patologia. Os camundongos usados para identificar o mecanismo são chamados de animais “knockout” porque têm um gene “nocauteado”. Já os animais “knockin”, diferente dos “knockout”, têm uma seqüência parcial ou total de um gene introduzida no genoma do animal de forma a gerar uma patologia pelo excesso do produto gênico. Existem vários modelos transgênicos para estudo de DHGNA (Tabela 1).

Fatores ambientais com as dietas hipercalóricas ou deficientes em algum nutriente também são utilizadas para induzir DHGNA (Tabela 2). A dieta deficiente em colina e metionina (DCM) já é um modelo conhecido de indução de esteatose e esteatohepatite em animais de pequeno porte. A metionina é um aminoácido essencial não sintetizado pelo organismo e que deve, portanto, ser obtido através da alimentação. É essencial para a absorção, transporte e biodisponibilidade de lípidos e atua também como agente lipotrófico na prevenção da formação de gordura em excesso no fígado. A colina, uma amina quaternária, é nutriente necessário para síntese de fosfolípidios como a esfingomielina e a fosfatidilcolina (FC), essenciais na composição de todas as membranas celulares e de moléculas como lipoproteínas de baixíssima densidade (VLDL). Há duas vias pelas quais a FC pode ser

sintetizada: através da incorporação direta da colina nos radicais fosfatidil e por meio da metilação da fosfatidiletanolamina pela S-adenosilmetionina. Numa dieta carente de colina e metionina, ambas as vias são inibidas, resultando em produção deficiente de FC e prejuízo na formação de VLDL. Uma vez que os hepatócitos exportam os AG por meio da conversão em VLDL, ocorre acúmulo de triglicérides nestas células (Zeisel, 2000; Grattalano et al., 2000). Assim, a dieta DCM em última análise, provoca inibição da secreção de VLDL.

A associação de um modelo que espontaneamente apresente resistência insulínica e aumento do aporte de ácidos graxos a um modelo tóxico que dificulta a excreção de triglicérides pode induzir ENA semelhante à forma humana. A esteato-hepatite induzida por dieta DCM no modelo de camundongo obeso está associada a um aumento da atividade do citocromo peroxissomal P450 2E1 (CYP2E1) e da peroxidação lipídica nos hepatócitos.

Implementou-se em nosso meio, em trabalhos anteriores, o modelo experimental de esteato-hepatite não alcoólica induzida tanto pela dieta DCM como a dieta hiperlipídica (H), ambas em camundongos obesos (Oliveira et al., 2005). Conseguiu-se com estes modelos, desenvolver esteato-hepatite não alcoólica muito semelhante à forma humana, com balonização hepatocelular, esteatose macro e microvesicular em zona III (veia centrolobular), infiltrado de polimorfonuclear e satelitose (Figura 2 A e B).

Figura 2. Histologia hepática de esteato-hepatite em camundongos ob/ob submetidos à dieta DCM (2A). Histologia hepática de esteato-hepatite em camundongos ob/ob submetidos à dieta H (2B)

Esses resultados estão de acordo com dados descritos na literatura de que a introdução de um segundo estímulo em camundongos portadores de síndrome metabólica e esteatose hepática induz a progressão da esteatose para esteato-hepatite.

1.4. Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK)

Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK, Kyotsujigyo Inc. Japão) (<http://www.kyotsujigyo.com>) é um tradicional remédio herbáceo usado há milhares de anos na China e Japão. Consiste em um produto derivado do Henshiko (erva milenar chinesa) composto por quatro ingredientes com propriedades farmacológicas: *Panax pseudo ginseng*, *Eucommia ulmoides*, *polygonati rhizoma* e *licorice root*, que apresentam propriedades

antioxidantes, hepatoprotetoras e hipolipemiantes. Como muitos medicamentos fitoterápicos disponíveis no mercado, a avaliação precisa de seus componentes não está disponível. Contudo, muitos destes componentes são usados no tratamento de várias doenças crônicas. O *Panax ginseng* contém panaxanos, substâncias que podem reduzir os níveis glicêmicos (Marotta et al., 2005). Similarmente, os derivados do *Eucommia* são conhecidos também pelos seus efeitos hipoglicêmicos mediados por fitoquímicos incluindo os polifenólicos, os flavonóides, e os triterpenos. Os derivados do *Polygonatum* possuem atividade antioxidante e de alteração na resistência insulínica (Lee et al., 2005). O mais conhecido deles, o licorice (o *Glycyrrhiza*) possui atividades antioxidante, mineralocorticóide, glicocorticóide, anti-androgênica e estrogênica.

O potencial efeito terapêutico do YHK na DHGNA ainda não foi extensivamente investigado, embora recentemente Chande et al. (2006) tenham demonstrado em pacientes com DHGNA redução das aminotransferases após o uso do YHK. Os possíveis mecanismos de ação da droga não foram totalmente elucidados.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- 1) Avaliar o efeito citoprotetor do YHK no modelo de esteato-hepatite não alcoólica (ENA) induzido por dieta deficiente em colina e metionina, em camundongos obesos (ob/ob).
 - 2) Avaliar o efeito citoprotetor do YHK no modelo de esteato-hepatite não alcoólica (ENA) induzido por dieta hiperlipídica, em camundongos obesos (ob/ob).
 - 3) Avaliar o efeito antioxidante do YHK em relação aos marcadores de estresse oxidativo no modelo de esteato-hepatite não alcoólica (ENA) induzido por dieta deficiente em colina e metionina em camundongos obesos (ob/ob).
-

- 4) Avaliar o efeito antioxidante do YHK em relação aos marcadores de estresse oxidativo no modelo de esteato-hepatite não alcoólica (ENA) induzido por dieta hiperlipídica em camundongos obesos (ob/ob).
-

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos obesos (ob/ob) com idade de 8 semanas, pesando 30-35g, provenientes de uma colônia da Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, EUA). Todos os animais foram mantidos em micro-isoladores acoplados em “rack” ventilado (Modelo-ALESCO), com temperatura controlada de 22 °C e ciclos de 12 horas de luz 12 horas de noite, recebendo água e dieta “*ad libitum*” por 4 semanas. Após este período, todos os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (dose-0,1mg/kg) e Xilazina (dose 0,1mg/kg) por via intraperitoneal. Depois de anestesiados, retirou-se por punção cardíaca sangue para as análises bioquímicas e, em seguida, foram retirados fragmentos de tecido hepático para avaliação histológica e análise do estresse oxidativo.

As preparações experimentais foram realizadas conforme normas publicadas pelo "US National Institute of Health-Guide for care and use of laboratory animals" (NIH Publication, nº 85-25, revisada em

1985) e aprovadas pela Comissão Ético-Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.2 Local

Os experimentos foram realizados no laboratório (LIM 07) da Disciplina de Gastroenterologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A análise histopatológica dos fragmentos foi realizada no Departamento de Anatomia Patológica (LIM 14) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por um único patologista que procedeu à avaliação do material, sem identificação dos dados. A análise da bioquímica hepática foi realizada no Laboratório Central do Hospital das Clínicas de São Paulo e os experimentos para determinação do estresse oxidativo hepático por meio da peroxidação lipídica foram realizados no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Emergência Médica (LIM 51).

3.3. Preparação e Delineamento Experimental

Foram utilizadas as dietas deficientes em colina e metionina (DCM) e hiperlipídica (H) para indução de ENA nos camundongos obesos. As dietas foram confeccionadas “in house” (Tabela 3).

Tabela 3 - Formulação das dietas utilizadas

Ingredientes	DCM (g/kg)	Hiperlipídica (g/kg)
Carboidratos	625,0	510,0
Caseína (79% de proteína)	214,0	214,0
Lipídios	180,0	
Gordura de coco		120,0
Óleo	66,0	47,5
Colesterol		12,5
Fibras	50,0	50,0
Vitaminas	10,0	10,0
Minerais	35,0	30,0
L-Cistina		3,0
Metionina		
Bitartarato de colina		2,5
Tertbutilhidroquinona	0,014	0,014

3.3.1. Composição das dietas

Deficiente em colina e metionina: Carboidratos (62,5%, divididos entre amido, amido dextrinizado, sacarose); Proteínas (17%); lipídios (7%); fibra (5%); mistura vitamínica (1%); mistura mineral (3,5%).

Hiperlipídica: Carboidratos (51,0%); Proteínas (17%); lipídios (18%, divididos entre gordura de coco, óleo de soja e colesterol); fibra (5%); mistura vitamínica (1%); mistura mineral (3,5%).

Grupos

Os animais foram todos com 8 semanas de vida, distribuídos aleatoriamente por meio de tabela de classificação seqüencial randomizada em 5 grupos com 5 animais cada grupo:

1º Grupo DCM (n=5): receberam diariamente 0,3 mL de solução fisiológica por meio de gavagem e dieta em pó deficiente em colina e metionina por um período de 4 semanas.

2º Grupo DCM tratado com YHK (n=5): submetidos à dieta deficiente em colina e metionina por um período de 4 semanas + solução de YHK (Kyotsu, Yokyo, Japan) (20mg/kg/dia diluída em 0,3 mL H₂O) administrados diariamente por gavagem.

3º Grupo H (n=5): submetidos à dieta hiperlipídica em pó por 4 semanas e mais 0,3 mL de solução fisiológica diariamente por meio de gavagem.

4º Grupo H tratado com YHK (n=5): submetidos à dieta hiperlipídica por um período de 4 semanas + solução de YHK (Kyotsu, Yokyo, Japan) (20mg/Kg/dia diluída em 0,3 mL H₂O) administrados diariamente por gavagem.

5º Grupo C (n=5): camundongos obesos ob/ob com 8 semanas de vida, submetidos à dieta padrão NUVILAB CR1 (NUVITAL Indústria Brasileira Ltda.), alimentos completo para camundongo e rato, por um período de 4 semanas + 0,3 mL de solução fisiológica diariamente por meio de gavagem.

3.4 Avaliação da Lesão Hepatocelular

3.4.1 Bioquímica

Após anestesia, foi retirado 1mL de sangue em seringa heparinizada por meio de punção cardíaca para a determinação das concentrações séricas de aspartatoaminotransferase (AST), alaninoaminotransferase (ALT), colesterol e triglicérides. Posteriormente,

as amostras séricas foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min (centrífuga Excelsa Baby II modelo 206-R) e, analisadas a UV (ultravioleta).

3.4.2. Avaliação Histológica

Fragmentos de tecido hepático foram fixados em formol salino a 4% e submetidos a colorações hematoxilina-eosina (HE), Tricrômico de Masson, Perls para pigmentos e impregnação com Sais de prata (Reticulina), segundo a rotina adotada na divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP.

A avaliação histopatológica baseou-se na classificação padronizada por meio da revisão pelo “Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network”, que designou e validou as características histológicas e um sistema de escore de atividade para DGNHA para estudos clínicos. As variáveis histopatológicas para atividade foram graduadas de acordo com o escore da atividade da DGHNA – NAFLD Activity Score (NAS) recentemente definida pelo “Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network”, que inclui apenas características da lesão ativa e que reverte em curto espaço de tempo. O escore é definido pela soma dos graus de esteatose (0 a 3), inflamação lobular (0 a 3), e balonização (0 a 2). Os valores variam de 0 a 8. Os valores NAS ≥ 5 correlacionam-se com o diagnóstico de NASH e o escore menor 3 não é considerado ENA, e os valores de 3 e 4 podendo ser variáveis alocadas

nas categorias de presença ou provável ENA. A fibrose não está incluída no escore. A separação da fibrose das outras variáveis histológicas facilita a compreensão quanto ao estadiamento (“grau de fibrose”) e o que indica a atividade necro-inflamatória (“escore”) na esteato-hepatite não alcoólica. Além disso, este modelo não apresenta fibrose, sendo o escore bastante adequado para comparação entre os grupos.

3.4.3. Avaliação do Estresse Oxidativo Hepático

A detecção direta de espécies reativas de oxigênio em sistemas biológicos são técnicas difíceis e cuja metodologia está além do alcance da maioria dos laboratórios. Assim, diversos métodos são utilizados rotineiramente na tentativa de analisar a produção de EROS. Estes métodos são válidos e úteis para o melhor entendimento do papel das EROS em sistemas biológicos, embora deva haver interpretação cautelosa dos resultados,

O MDA é um produto da reação de EROS com lipídeos de membrana e, portanto, um marcador indireto da geração de estresse oxidativo. Embora sofra críticas pelo seu caráter indireto, é amplamente utilizado como indicador de peroxidação lipídica e tem a vantagem de poder ser usado utilizado como indicador de peroxidação lipídica e tem a vantagem de poder ser usado tanto em tecido como em plasma, o que possibilita seu emprego em experimentos “in vivo”.

3.4.3.1. Determinação do Malondialdeído (MDA)

A formação do MDA é usada para quantificar a peroxidação lipídica em tecidos a materiais reativos com o ácido tiobarbitúrico. O fígado foi homogenizado (100 mg/mL) em solução de KCl a 1,15%. Foi adicionada aos homogenatos uma mistura de 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico a 0,8%, 200 mL de SDS a 8,1% (vol/vol), 1,5 mL de ácido acético (pH 3.5) a 20% (vol/vol) 600 mL de H₂O destilada. As amostras foram aquecidas a 90 °C por 45 min. Após resfriamento até temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (10,000X g por 10 min) e sua absorbância foi medida por leitura espectrofotométrica a 532 nm usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Gênios, Tecan Switzerland). Os valores dos lipoperoxídeos foram expressos em nanomoles MDA/ miligramas de proteína.

3.4.3.2. Determinação da Glutathiona (GSH) Hepática

O fígado dos animais foi homogenizado (100 mg/ ml) em ácido sulfosalicílico a 5% (vol/vol). Os homogenatos foram centrifugados a 10,000 X 3g por 20 min, e uma alíquota do sobrenadante (20ml) foi combinada ao Na₂HPO₄ (160ml) a 0.3 M e 0.04% 5,59-ditiobis-(2-acido nitrobenzóico) em 1% citrato de sódio (20 ml). Após 10 min de incubação em temperatura ambiente, a absorbância foi lida em um leitor a 405 nm

“Spectramax microplate” (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). As concentrações do GSH foram calculadas utilizando uma curva padrão construída com concentrações conhecidas de GSH reduzido e os valores expressos em μg GSH por mg de proteína (Gênios Tecan Switzerland)

ANÁLISE ESTATÍSTICA

4. Análise Estatística

Os dados foram expressos em médias e desvio-padrão. Diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas utilizando Método Não Paramétrico de Univariância (ANOVA) e Random Permutation Test para comparação das variáveis histológicas. Foi considerado significativo valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Efeitos do YHK na Composição Corpórea dos Animais

Observou-se perda de peso significativa nos camundongos tratados com o YHK em ambas as dietas empregadas (DCM e H) ($p < 0,05$) (Figura 3), embora a ingestão alimentar não tenha sido diferente entre os grupos. Observou-se também, redução importante da gordura visceral do animal após o uso do YHK (Figura 3).

Figura 3 Variação do peso dos camundongos ob/ob submetidos as dietas deficiente em colina e metionina e hiperlipídica, com ou sem a adição do YHK.

Figura 4 Efeito do Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK) na adipocidade visceral. Observa-se intensa redução na adiposidade visceral após o uso de 4 semanas do YHK em relação ao animal que utilizou apenas a dieta deficiente de colina e metionina (DCM).

5.2. Efeitos do YHK nas Concentrações das Aminotransferases (AST/ALT) e Lípides Plasmáticos em Camundongos ob/ob submetidos à dieta DCM ou ou dieta hiperlipídica.

No que se refere à bioquímica hepática, as aminotransferases reduziram-se significativamente em ambos os grupos tratados com o YHK. Além disso, o YHK reduziu também os níveis séricos dos lipídios no grupo que foi submetido à dieta DCM (Tabela 4). Essas mudanças foram associadas à perda de peso no grupo DCM + YHK e uma diminuição no ganho de peso no grupo H + YHK.

Tabela 4 Concentrações séricas de alaninoaminotransferase (AST), aspartato aminotransferase (ALT), colesterol total e triglicérides em camundongos obesos ob/ob que foram alimentados com uma dieta deficiente em colina/metionina ou uma dieta hiperlipídica com ou sem tratamento com YHK

<i>Grupo</i>	<i>AST (U/L)</i>	<i>ALT (U/L)</i>	<i>Triglicérides (mg/dL)</i>	<i>Colesterol (mg/dL)</i>
DCM	623,7±460,8*	230,0±165,2*	93,0±27,0*	105,0±48,6*
DCM+YHK	217,3±97,9	38,7±9,1	65,7±25,5	80,0±15,1
H	3405,5±1334,0*	527,6±121,0*	46,0±6,7	123,3±26,4
H+YHK	2050,2±642,6	366,6±33,1	43,4±7,2	138,6±16,5

Valores Normais: AST: 10-34; ALT: 10-44 U/L; mg/dl: colesterol e triglicérides: 45-89 mg/dL.

DCM: Animais submetidos à dieta deficiente em colina e metionina + soro fisiológico

DCM+YHK: Animais submetidos à dieta deficiente em colina e metionina mais administração do YHK

H: Animais submetidos à dieta hiperlipídica + soro fisiológico.

H+YHK: Animais submetidos à dieta hiperlipídica mais administração do YHK

5.3 Efeitos do YHK sobre Aspectos Morfológicos em Camundongos obesos ob/ob submetidos à dieta deficiente em colina e metionina ou dieta hiperlipídica

As mudanças no peso corporal dos camundongos obesos foram associadas à significativa mudança na histologia hepática, com o tratamento concomitante com o YHK, especialmente no grau de esteatose. Podemos ver na tabela 5 e na figura 5 que em ambas as dietas, ocorreu uma substancial redução da esteatose. O grupo que recebeu a dieta DCM e o grupo que recebeu a dieta H desenvolveram esteatose macro e microvesicular difusa moderada, balonização hepatocelular e um infiltrado inflamatório difuso. Contudo, na dieta H, a esteatose microvesicular foi mais intensa. Com a adição de YHK, ocorreu uma redução na esteatose em ambos os grupos. Embora o número seja limitado para comparação estatística, havia uma tendência clara em ambos os grupos tratados com YHK comparados com os grupos com dieta DCM e dieta H. Por exemplo, YHK reduziu a macroesteatose em ambos os grupos ($p=0,06-0,07$), comparação pelo método “Random Permutation Test”. A inflamação lobular representada pelo infiltrado misto (mononuclear e polimorfonuclear) foi observada em ambas as dietas. Com o YHK, a inflamação reduziu-se, contudo sem diferença estatística significativa. A balonização não apresentou mudanças importantes com a utilização da droga, ou seja, manteve-se inalterada.

Tabela 5 Variáveis histológicas nos diversos grupos de camundongos obesos

	Identificação	Inflamação	Balonização	Esteatose	<i>Index activity score</i>
Ob/ob	1	0	2	0	2
	2	0	2	0	2
	3	1	1	1	3
	4	0	2	0	2
	5	0	2	0	2
Dieta DCM	1	1	2	3	6
	2	1	2	2	5
	3	1	2	2	5
	4	1	2	3	6
	5	1	2	3	6
Dieta Hiperlipídica	1	2	2	2	6
	2	1	1	3	5
	3	1	1	3	5
	4	1	1	3	5
	5	2	2	2	6
Dieta DCM + YHK	1	0	2	0	2
	2	0	2	0	2
	3	0	2	0	2
	4	0	2	0	2
	5	0	2	0	2
Dieta Hiperlipídica + YHK	1	1	1	0	2
	2	1	1	1	3
	3	1	1	0	2
	4	1	1	0	2
	5	1	1	0	2

DCM: os animais receberam uma dieta deficiente em colina-metionina + soro fisiológico

DCM+YHK: os animais receberam uma dieta deficiente em colina-metionina associada a administração do YHK

H: animais receberam uma dieta hiperlipídica.+ soro fisiológico

H+YHK: animais receberam uma dieta hiperlipídica associada à administração do YHK

Figura 5 Redução da esteatose macro/microvesicular e do infiltrado inflamatório lobular misto, presentes nos animais submetidos às dietas hiperlipídica (Figura 5A) e deficiente em colina-metionina (Figura 5C), com a utilização do YHK (Figura 5B e 5D).

5.4. Efeitos do YHK sobre Parâmetros de Estresse Oxidativo em Camundongos obesos ob/ob submetidos à dieta deficiente em colina e metionina ou dieta hiperlipídica

A redução da esteato-hepatite e dos níveis de aminotransferases associou-se à redução do estresse oxidativo hepático, avaliado pela diminuição na lipoperoxidação no tecido hepático (redução do MDA-Malonaldeído) (Figura 6). Contudo, a glutathiona reduzida (GSH) só sofreu redução significativa no grupo da dieta DCM que usou o YHK. Na dieta H associada ao YHK, não houve redução das concentrações de GSH. (Figura 7).

Figura 6 Redução dos níveis hepáticos de MDA nos camundongos submetidos às dietas DCM e hiperlipídica associadas ao YHK.

Figura 7 Redução dos níveis hepáticos de GHS nos camundongos submetidos à dieta DCM associadas ao YHK.

DISCUSSÃO

6. Discussão

Embora os camundongos ob/ob desenvolvam esteatose hepática espontaneamente, o desenvolvimento de uma lesão mais significativa, como a esteato-hepatite, requer um segundo estímulo, que pode ser a administração de uma dieta hiperlipídica (H) ou uma dieta deficiente em colina e metionina (DCM) (Antee e Goldin, 2006).

A dieta DCM é um modelo clássico de DHGNA, no qual os animais desenvolvem esteatose macrovesicular e esteato-hepatite sem fibrose. No presente estudo, camundongos ob/ob receberam DCM ou H rica em gordura saturada e desenvolveram ENA com esteatose macro e microvacuolar, balonização hepatocelular e infiltrado lobular misto. Provavelmente, mecanismos diferentes devem estar envolvidos na gênese da ENA nestes dois modelos. A dieta DCM pode alterar o sinal transmembrana e o transporte de ácidos graxos dentro do hepatócito, reduzindo a exportação dos triglicérides sob a forma de VLDL, tendo como consequência acúmulo de gordura nos hepatócitos (Ikura et al., 2006). Já a dieta hiperlipídica, exacerba o aumento da resistência insulínica, situação já presente nestes camundongos obesos,

aumentando a síntese de ácidos graxos e o influxo destes para os hepatócitos (Antee e Goldin, 2006).

Baseando-se na teoria dos dois “hits”, observamos nestes modelos que o primeiro estímulo foi caracterizado pelo acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos, que suplantou sua capacidade de metabolização e exportação, resultando no aumento excessivo da quantidade de ácidos graxos para o fígado, favorecendo a infiltração gordurosa hepática (McCullough et al., 2006). Por outro lado, o excesso de ácidos graxos nos hepatócitos estimula a oxidação mitocondrial, aumentando a geração de EROS (Oliveira et al., 2006), o segundo estímulo para o desenvolvimento de inflamação e fibrose.

Vários estudos têm demonstrado que as EROS estão aumentadas na ENA, enquanto os níveis de antioxidantes (vitamina E e glutathione) estão diminuídos (Chitturi e Farrell, 2001; Grattalio et al., 2000). Entretanto, o uso de antioxidantes na prevenção da DHGNA ainda não está bem estabelecido. Estudos prévios desenvolvidos por nosso grupo, demonstraram a redução da esteatose hepática e do estresse oxidativo com a administração de vitamina C ou do *S-nitroso-N-acetilcisteína* (SNAC) em ratos submetidos a uma dieta deficiente em colina (Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., 2003). No presente estudo, nossa proposta foi avaliar os efeitos do YHK na inibição da esteato-hepatite induzida por dieta DCM ou DH em camundongos ob/ob, assim como, avaliar a ação desta droga no estresse oxidativo hepático e na proteção da lesão hepatocelular. Observou-se que o YHK inibiu o desenvolvimento da ENA,

reduzindo a esteatose macro e microvesicular, a balonização hepatocelular e o infiltrado inflamatório misto em ambos os modelos. Esse efeito foi associado a uma significativa redução do estresse oxidativo comprovado pelo teste de MDA e com a melhora da inflamação hepática evidenciada pela normalização das concentrações séricas das enzimas hepáticas. Estes fatos ratificam o efeito antioxidante do YHK, abolindo os efeitos citotóxicos das EROS descritos nestes modelos animais. Efeitos similares na melhora da histologia hepática e na redução do estresse oxidativo em ratos, já vem sendo descrita com outros agentes, inclusive pelo nosso grupo (Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., 2003).

Um aspecto relevante observado em nosso estudo e ainda não descrito na literatura, foi o efeito anti-obesidade do YHK. Este efeito foi evidenciado pela redução significativa na massa corpórea destes animais após a administração da droga, independente do tipo de dieta utilizada. Embora esta redução na massa corpórea não possa ser explicada completamente, a mesma parece estar associada com a diminuição da adiposidade visceral, suscitando a hipótese que o efeito do YHK poderia ser mediado por receptores dos PPARs, como demonstrado recentemente em um estudo realizado pelo nosso grupo (Stefano et al., 2007). Embora não tenhamos investigado a via de sinalização da insulina, não podemos descartar a hipótese de que o YHK promova mudanças nesta via. Alternativamente, o ganho de peso observado nos animais que receberam H e a redução significativa após o uso do YHK pode sugerir que este agente exerça um efeito sistêmico no metabolismo de lipídios,

embora nenhuma mudança tenha sido observada na concentração plasmática dos lipídios no grupo de dieta hiperlipídica. Estudos futuros serão necessários para avaliar a ação anti-obesidade do YHK, uma vez que este dado foi um achado inesperado e não fazia parte do planejamento do presente estudo.

O presente estudo apresenta algumas limitações inerentes à utilização de modelos animais e, o fato de não podermos realizar uma análise farmacológica completa da composição do YHK. No entanto, esta não é uma limitação relacionada apenas ao nosso estudo, mas é um problema comum em estudos os quais utilizam compostos ativos de medicamentos derivados de ervas. Contudo, baseados nas propriedades dos seus principais ingredientes, acredita-se que as propriedades antioxidantes atribuídas a este agente tenham sido importantes na prevenção na ENA.

Outra limitação relacionada ao nosso estudo é que não utilizamos gaiolas metabólicas para controlar de forma precisa a ingesta alimentar dos camundongos. Contudo, medindo a quantidade de dieta ingerida e a quantidade de sobra da mesma para cada animal, pôde observar que não houve diferença entre os grupos. Este fato sugere que o YHK não apresenta efeitos inibitórios sobre o apetite, mas talvez aumente o gasto calórico nos animais tratados. A escassez de dados na literatura, tanto de estudos experimentais como estudos em humanos, abordando outros aspectos e os diferentes efeitos do YHK é outra restrição associada a

nosso estudo, pois nos impossibilita correlacionar nossos achados com outros apresentados na literatura.

Existem inúmeros trabalhos utilizando os componentes do YHK de forma isolada, como por exemplo, a *Eucommia ulmoides* e a *Polygonati rizoma*, que possuem efeitos hipoglicemiantes e efeitos benéficos na hipercolesterolemia (Lee et al., 2005; Chen et al., 2001). Outro exemplo é o extrato de Licorice que apresenta efeitos antilipemiantes e reduz pressão sangüínea sistólica em pacientes hipercolesterolêmicos (Furhran et al., 2002). De forma semelhante os flavonoides do Licorice são utilizados para suprimir o acúmulo de gordura visceral e alterar a sinalização de insulina (Nakagawa et al., 2004).

Embora todos estes efeitos atribuídos ao YHK não possam ainda ser completamente explicados, seus efeitos nos hepatócitos e na peroxidação lipídica são claramente evidentes. Houve melhora dos parâmetros de estresse oxidativo e atividade inflamatória da ENA nestes camundongos submetidos às dietas DCM e H com o uso do YHK. Recentemente, Marota et al. (2006) evidenciaram em modelo experimental o efeito quimioprotetor do YHK associado à supressão da peroxidação lipídica nos estágios precoces da hepatocarcinogênese química. O mesmo grupo demonstrou ação antioxidante do YHK em modelos de isquemia-reperfusão e de lesão hepática por CCl₄. Por outro lado, Chande et al. (2006), observaram em estudo placebo-controlado melhora das aminotransferases em pacientes portadores de ENA que utilizaram o YHK. Assim, estes fatos indicam que o YHK desempenha

importante ação antioxidante e hepatoprotetora, contudo, estudos futuros fazem-se necessários para elucidar e determinar a utilidade clínica deste agente inovador.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- 1) O YHK inibiu o desenvolvimento da esteato-hepatite não alcoólica (ENA) induzida pelas dietas hiperlipídica e deficiente em colina e metionina em camundongos obesos (ob/ob);
 - 2) O YHK reduziu significativamente as concentrações das aminotransferases no modelo de esteato-hepatite não alcoólica (ENA) induzido pelas dietas hiperlipídica e deficiente em colina e metionina em camundongos obesos (ob/ob);
 - 3) O YHK reduziu significativamente os parâmetros histológicos relacionados à esteato-hepatite não alcoólica (ENA) no modelo induzido pelas dietas hiperlipídica e deficiente em colina e metionina em camundongos obesos (ob/ob);
-

- 4) O YHK reduziu marcadores de estresse oxidativo hepático, verificado pela diminuição das concentrações hepáticas do malonaldeído (MDA) e da glutathiona reduzida (GSH) no modelo de esteato-hepatite não alcoólica (ENA) induzido pela dieta deficiente em colina e metionina;
 - 5) O YHK reduziu significativamente as concentrações hepáticas de malonaldeído (MDA) no modelo de esteato-hepatite não alcoólica (ENA) induzido pela dieta hiperlipídica. Não houve diferença nas concentrações hepáticas da glutathiona reduzida (GSH) neste modelo.
-

ANEXOS

BASIC STUDIES

Yo Jyo Hen Shi Ko, a novel Chinese herbal, prevents nonalcoholic steatohepatitis in ob/ob mice fed a high fat or methionine–choline-deficient diet

Vicência Mara Rodrigues de Lima¹, Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira¹, Letícia Yumi Sawada¹, Hermes Vieira Barbeiro², Evandro Sobroza de Mello³, Francisco Garcia Soriano², Venâncio Avancini Ferreira Alves³, Stephen H. Caldwell⁴ and Flair José Carrilho¹

¹ Department of Gastroenterology (LIM 07), University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

² Department of Emergency (LIM 51), University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

³ Department of Pathology (LIM 14), University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

⁴ Division of Gastroenterology and Hepatology, University of Virginia, Charlottesville, VA, USA

Keywords

Henshiko – nonalcoholic steatohepatitis – oxidative stress – Yo Jyo Hen Shi Ko

Correspondence

C. P. M. S. Oliveira, MD, PhD, Departamento de Gastroenterologia, Universidade de São Paulo Av. Dr Enéas de Carvalho Aguiar n° 255 ICHC, 9 andar, sala 9159 05403000 São Paulo, Brazil.
Tel: +55 11 30696447/30617301
Fax: +55 11 30697830
e-mail: cpm@usp.br

Received 23 June 2006

accepted 17 October 2006

DOI:10.1111/j.1478-3223.2006.01405.x

Abstract

Background: Oxidative stress plays a role in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK) is a complex compound purported to reduce reactive oxygen species (ROS) by blocking the propagation of radical-induced reactions. The aim of this study was to evaluate the role of the effect of YHK in experimental NASH. **Methods:** NASH was induced in male ob/ob mice by a high-fat (HF) diet or methionine/choline-deficient (MCD) diet for 4 weeks. YHK-treated animals received YHK solution orally (20 mg/kg/day) in both experimental diets ($n = 6$; each group) while control animals received only vehicle. **Results:** The MCD and HF groups developed moderate diffuse macrosteatosis, hepatocellular ballooning, and a diffuse inflammatory infiltrate. With the addition of YHK, there was a marked reduction in macrosteatosis in both groups. This was associated with decreased lipoperoxide and reduced glutathione–GSH concentrations as well as reduced serum aminotransferases and improved histological markers of inflammation. These changes were also associated with weight loss in the MCD+YHK group and diminished weight gain in the HF+YHK group. **Conclusion:** YHK therapy blunts the development of macrosteatosis in these models of NASH and significantly reduces markers of oxidative stress. YHK also diminishes weight gain in this obesity prone model. Our findings warrant further study on the mechanisms involved with these effects.

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is an important form of liver disease that may progress to cirrhosis and liver failure (1–3). The mechanisms that mediate the transition from steatosis to NASH remain unknown. The ‘two-hit’ hypothesis has been proposed to explain the pathogenesis of NASH, with an initial metabolic disturbance causing steatosis and a second pathogenic stimulus promoting oxidative stress, increased generation of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and resultant NASH (4–6). Thus, oxidative stress appears to play a central role in the pathogenesis of NASH. The increased production of ROS is known to cause lipid peroxidation, followed by an inflammatory response, and activation of stellate cells, leading to fibrosis (7, 8).

Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK), derived from Henshiko (Kyotsujigyo Inc., Japan), has four major ingredients

(Panax pseudo ginseng, Eucommia ulmoides, Polygonati rhizoma, and Licorice root) that are reported to react with ROS, thus blocking the propagation of radical reactions in a wide range of oxidative stress situations (9–11). Naturally derived herbal medicines, often imported from Asia, have experienced an increasing degree of scientific scrutiny in the past 20 years in the West. Although sometimes subject to variation in growth patterns and often limited by the lack of availability for technical analysis from the manufacturers, there is an emerging body of literature in this field.

The potential therapeutic efficacy of YHK in NASH has not been extensively explored especially in terms of its possible mechanism although we are aware of one recent small clinical trial showing reduction of the aminotransferases in NASH patients treated with a

short course of this substance (12). The aim of this pilot study was to evaluate the role of YHK in NASH prevention in ob/ob mice submitted to a high-fat (HF) diet or a methionine/choline-deficient (MCD) diet. These animal models provide somewhat different perspectives on the potential activity of YHK: the MCD provokes injury by several mechanisms including altered transmembrane signaling and interference with lipid-cholesterol transport, while the HF diet exacerbates overall liver fat loading of the liver in this obesity-prone animal predisposing to oxidative stress through the accumulation of free fatty acids (13).

Materials and methods

Materials

YHK was provided from Kyotsujigyo Inc., Japan (<http://www.kyotsujigyo.com>). This preparation contains four different botanical derivatives (Panax pseudo ginseng, Eucommia ulmoides, Polygonati rhizome, and Licorice root), which may have antioxidant properties. As with many commercially available herbal medications, precise compositional analysis of this proprietary was not available to us. Based on existing literature, its contents are likely to be active in a number of respects. For example, Ginseng contains quinquefolans that may mediate its hypoglycemic effects (14, 15). Similarly, derivatives of Eucommia are also known to have hypoglycemic effects thought to be mediated by phytochemicals including polyphenolics, flavonoids, and triterpenes although the biochemical pathways have not, to our knowledge, been resolved (16). Derivatives of the Polygonatum are also known to have significant physiological activity. This includes reports of antioxidant effects and altered insulin signaling mediated by steroidal glycosides and steroidal saponins (17, 18). Much more is known about licorice derivatives (the Glycyrrhiza) compared with the other major ingredients of YHK. The most active compound, glycyrrhizic acid, possesses mineralocorticoid, glucocorticoid, antiandrogenic, and estrogenic activity (19). The most relevant property, however, may be mediated by carbenoxolone antagonism of 11 β -hydroxy-steroid-dehydrogenase, which appears to improve hepatic insulin sensitivity (20).

Animals

Male ob/ob mice (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME), 8 week old, weighing 30–40 g, were housed in temperature- and humidity-controlled rooms, kept on a 12 h light/dark cycle, and provided unrestricted amounts of food and water. All procedures for animal

Table 1. Experimental diets (g/kg): methionine/choline diet (MCD); high-fat diet(HF)

Ingredient	MCD diet (g/kg)	HF diet (g/kg)
Carbohydrates	625	510.5
Casein (79% de protein)	214	214
Lipid	180	
Coconut oil	–	120
Soybean oil	66	47.5
Cholesterol	–	12.5
Fiber	50	50
Vitamins	10	10
Minerals	35	30
L-cysteine	–	3
Methionin	–	–
Choline bitartrate	–	2.5
Tertbutylhydroquinone	0.014	0.014

Composition of diets:

Methionine–choline deficient diet: carbohydrates (62.5% – corn starch and sucrose); protein (17%), lipid (7%), fiber (5%), mix vitamins (1%), mix mineral (3.5%).

High-fat diet: carbohydrates (51.0%), protein (17%), lipid (18%, e coconut oil, soybean oil is cholesterol), fiber (5%); mix vitamins (1%), mix minerals (3.5%).

experimentation were in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and the Guidelines of Animal Experimentation from the University of Sao Paulo School of Medicine. The ob/ob mice control group ($n=6$) was provided with a standard diet (Nuvilab[®] Nutrientes Ltda, Colombo, Brazil) *ad libitum*. NASH was induced in the ob/ob mice by MCD group ($n=6$) or HF group ($n=6$) (Rhostrer Ltda, São Paulo, Brazil) 5 g/day for each ob/ob mice for 4 weeks (Table 1).

The ob/ob mice were divided into a control group fed a standard diet and four experimental groups that were fed as follows: Group 1: MCD group ($n=6$) fed MCD diet plus vehicle (physiologic Ringer's solution), Group 2: HF group ($n=6$) fed saturated HF plus vehicle (physiologic Ringer's solution), Group 3: YHK+MCD group ($n=6$) fed MCD diet plus YHK solution (20 mg/kg), and Group 4: YHK+HF group ($n=6$) fed HF diet plus YHK solution (20 mg/kg) both daily by gavage. After 4 weeks of treatment with YHK or vehicle associated with both diets, ob/ob mice were killed (12 week old). Plasma samples and the livers were collected for biochemical, histological and oxidative stress examination. During the study period, food intake was estimated by daily observation of residual food at the time of feeding (Table 2).

Serum biochemical analysis

Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), cholesterol, and triglyceride

levels were measured by standard methods using automated techniques.

Histological analysis

Liver tissue was fixed in 4% formaldehyde and processed for hematoxylin–eosin (HE) and Masson Trichrome staining for histological analysis. Histological variables were blindly scored by an experienced hepatopathologist (V. A. F. A.) using a scoring system adapted from the NASH activity score (21): macrosteatosis (0–3), lobular inflammatory changes (0–3), and hepatocyte ballooning (0–2). Fibrosis was minimal in all of the samples and was therefore not scored.

Oxidative stress analysis

Malondialdehyde (MDA) assay

MDA formation was used to quantify the lipid peroxidation in tissues and measured as thiobarbituric acid-reactive material (TBARS). Tissues were homogenized (100 mg/ml) in 1.15% KCl buffer, and centrifuged at 14 000g for 20 min. The supernatant was then stored at -70°C until assay. An aliquot of supernatant was added to a reaction mixture of 1.5 ml 0.8% thiobarbituric acid, 200 μl 8.1% (vol/vol) SDS, 1.5 ml 20% (vol/vol) acetic acid (pH 3.5), and 600 μl distilled H_2O and heated to 90°C for 45 min. After cooling to room temperature, the samples were cleared by centrifugation ($10\,000 \times g$ for 10 min), and their absorbance was measured at 532 nm using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as an external standard (Genios, Tecan, Switzerland). The quantity of lipid peroxides was expressed as nanomoles MDA per milligram of protein.

Reduced glutathione (GSH) assay

Tissues were homogenized (100 mg/ml) in 5% (vol/vol) sulfosalicylic acid. The homogenates were centrifuged at $10\,000 \times g$ for 20 min, and an aliquot of the clear supernatant (20 ml) was combined with 0.3 M Na_2HPO_4 (160 ml) and 0.04% 5,59-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) in 1% sodium citrate (20 ml). After a 10 min incubation at room temperature, absorbance was read at 405 nm in a Spectramax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Concentrations of GSH were calculated from a standard curve constructed with known concentrations of GSH and expressed as μg GSH per mg protein (Genios).

Statistical analysis

The data were expressed as means $\pm$ standard deviation (SD). Groups were compared using univariate

Fig. 1. Effects of Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK) on the body weights in ob/ob mice submitted to standard, methionine–choline deficient (MCD) or high fat (HF) experimental diets for four weeks: Shown is the relative change in weight in the ob/ob control group fed standard chow compared to the study groups: (MCD, $n = 6$) fed MCD diet plus vehicle, MCD+YHK (MCD+YHK, $n = 6$) fed MCD diet plus YHK solution (20 mg/day), the High Fat diet group fed saturated high-fat diet plus vehicle (HF, $n = 6$), and the High Fat diet plus YHK group (HF+YHK, $n = 6$) fed saturated high-fat diet plus YHK solution (20 mg/day). Data expressed as mean $\pm$ SD; * $P < 0.05$ diets $\times$ YHK.

analysis (ANOVA) and by the random permutation test for comparison of histological variables (a P value below 0.05 was considered to be significant).

Results

Total body weight

YHK therapy was associated with significant favorable changes in total body weight in both treated groups compared with controls on a standard diet and with each of the untreated experimental diet groups. Figure 1 shows the variation of weight in the study animals relative to those fed a standard diet. YHK blunted weight gain in the HF diet group and produced relative weight loss in the MCD group compared with the experimental diet without YHK. Comparing each YHK-treated diet group with its respective diet only group, food intake was not appreciably different between by daily inspection of the residual food.

Liver histology

These changes in total body weight were associated with significant changes in hepatic histology, especially in the degree of macrosteatosis with YHK therapy. As can be seen in Table 3 and in Fig. 2, both the MCD and HF diets induced substantial steatosis. Although the small N limited statistical comparisons, there was a clear trend in macrosteatosis in both YHK-treated

Fig. 2. (a) Histological features on ob/ob livers that were fed a methionine–choline-deficient diet (MCD group) showed diffuse macrosteatosis, hepatocellular ballooning, and lobular inflammation, H&E, $\times 100$. (b) Histological features on ob/ob livers that were fed high-fat diet (HF group) showed a more mixed steatosis and slight inflammatory infiltrate, H&E, $\times 400$. (c) Histological features on ob/ob livers that were fed the MCD diet plus YHK showing marked reduction in steatosis, H&E, $\times 200$. (d) Histological features on ob/ob livers that were fed the high fat diet plus YHK showing marked reduction in steatosis, H&E, $\times 400$.

groups comparing the ob/ob plus either MCD or HF diet with YHK therapy. For example, YHK markedly reduced macrosteatosis in both groups ($P = 0.06$ – 0.07 , comparison by random permutation test). Lobular inflammation consisting of mixed mononuclear and polymorphonuclear cells was observed with both diets. With YHK, the inflammation scores appeared to improve but the change did not reach statistical significance. Ballooning scores also appeared unchanged. We did not observe more than minimal fibrosis in any of the animals and thus this parameter was not further analyzed (Table 3).

Serum aminotransferases and lipids

Measurement of the aminotransferases revealed significant improvement in both treated groups but this

was most striking in the MDC+YHK group where YHK was associated with an eight-fold reduction in ALT. Serum lipid levels were not dramatically abnormal with either diet; however, serum triglyceride and cholesterol levels were significantly reduced in the YHK-treated animals on the MCD diet. In contrast, triglyceride and cholesterol levels were not different with YHK in the HF diet group (Table 2).

Markers of oxidative stress

Evidence of oxidative stress was significantly reduced by YHK in both treated groups as measured by the MDA assay. Compared with the untreated animals on each of the experimental diets, hepatic lipoperoxide concentrations MDA were significantly decreased with administration of YHK. Similarly, reduced glutathione

Table 2. Levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), cholesterol and triglycerides in the serum of ob/ob mice fed with methionine–choline-deficient diet or high-fat diet with or no YHK

Group	AST (U/l)	ALT (U/l)	Triglycerides (mg/dl)	Cholesterol (mg/dl)
MDC	623.7 ± 460.8*	230.0 ± 165.2*	93.0 ± 27.0*	105.0 ± 48.6*
MDC+YHK	217.3 ± 97.9	38.7 ± 9.1	65.7 ± 25.5	80.0 ± 15.1
HF	3405.5 ± 1334.0*	527.6 ± 121.0*	46.0 ± 6.7	123.3 ± 26.4
HF+YHK	2050.2 ± 642.6	366.6 ± 33.1	43.4 ± 7.2	138.6 ± 16.5

Data expressed mean ± SD.

* $P < 0.05$ Diets × YHK.

Normal values in U/l for AST: 10–34; ALT: 10–44; mg/dl: cholesterol and triglyceride: 45–89. Groups: MCD, animals fed methionine-choline deficient diet; MCD+YHK, animals fed methionine-choline deficient diet and treated with YHK administration; HF, animals fed high-fat diet; HF+YHK, animals fed high-fat diet and treated with YHK administration.

Table 3. Major scored histological variables

	Inflammation (0–3)	Ballooning (0–2)	Steatosis (0–3)
Ob/ Ob+chow	0.2	1.8	0.2
MCD diet	1	2	2.6
HF diet	1.4	1.4	2.6
MCD+YHK	0	2	0
HF+YHK	1	1	0.2

Each histological variable was semi-quantitated according to Kleiner *et al* (21).

was significantly decreased after YHK in the MCD diet animals. However, YHK did not significantly alter reduced glutathione, except in the HF diet group (Fig. 3).

Discussion

Although ob/ob mice develop spontaneous liver steatosis, the development of a more significant injury

requires the administration of a so-called ‘second metabolic hit’ (22). MCD is a classical model of NAFLD, where Cyp2E1 is upregulated (23) and the animals develop steatosis and steatohepatitis without fibrosis. In the present study, ob/ob mice received either a HF diet enriched with lard and egg yolk (saturated fatty acid) or an MCD diet. Both models produced patterns typical of NASH, although different mechanisms are likely to be involved. The MCD diet alters transmembrane signaling and lipid-cholesterol transport, causing increased fat accumulation while the HF diet exacerbates the predisposition of the ob/ob mouse to accumulate hepatic fat. A number of studies have shown that markers of oxidative stress are increased in NASH (24, 25), while levels of endogenous antioxidants (vitamin E and glutathione) are decreased (26). However, the use of antioxidants in the prevention of NAFLD is not yet well established. In previous studies conducted by our group, we observed reduction of liver steatosis and oxidative stress by vitamin C in rats submitted to a choline-deficient diet

Fig. 3. Effects of YHK on TBARS–malondialdehyde (MDA) equivalents and glutathione assay in liver samples of ob/ob mice submitted to normal chow, MCD or HF experimental diets for 4 weeks lipid peroxides are reported as nmol MDA/mg protein. Glutathione concentrations are reported per µgGSH per mg protein. Data expressed as mean ± SD. * $P < 0.05$ diets × YHK.

(27). The purpose of the current study was to evaluate the effects of YHK in established models of NASH – the ob/ob mice with NASH induced by a MCD diet or a HF diet.

Our results have shown an inhibitory effect of YHK on the development of NASH in this animal model. Specifically, YHK macrosteatosis declined to nearly zero in both groups of treated animals. This effect was associated with significantly reduced markers of oxidative stress (MDA) and improved markers of inflammation including serum aminotransferases and to a lesser extent on inflammatory scores. The effects are similar to those that we reported for ascorbic acid but much more effective than vitamin E, which we previously found to be ineffective (27). However, we did observe some differences in the effects of this agent in the two different diets. Total body weight in the YHK-treated animals was less than the untreated diet groups although the magnitude of this effect was greater in the MCD model. In addition, we could not detect an effect of YHK on reduced glutathione in the HF diet animals. The exact explanation for these differences remains to be determined. However, because the MCD diet favors accumulation of small droplet fat in the endoplasmic reticulum due to inhibition of VLDL formation, we speculate that the effect of YHK may be at the level of droplet formation or perhaps in the peroxidation that has recently been observed in the phospholipid monolayer surrounding these droplets (28). Although measures of blood lipids were not dramatically changed, the significant reduction in triglyceride levels with YHK in the MCD diet group further suggests the possibility that the effect is related to small droplet metabolism in the liver. Alternatively, this could indicate a change in insulin signaling although we have not yet investigated this possibility.

There may also be other significant but less readily apparent effects of this agent on fatty acid metabolism mediated by PPAR- α receptors as we recently observed in a separate study of this agent (29). Alternatively, we also observed blunted weight gain in the HF diet group and actual weight loss in the MCD group, suggesting that there may be as yet unexplained systemic effects on fat metabolism related to this agent. Additionally, mitochondrial dysfunction occurs concomitantly with lipid peroxidation and increased mitochondrial ROS formation in these animal models (30, 31). It can be conjectured that the antioxidant effect of YHK results from abrogation of the cytotoxic effects of ROS and lipid peroxides, preventing mitochondrial injury.

Our study has several inherent limitations. As with many herbal remedies, we could not provide a formal analysis of composition of the YHK. This is a common

problem in the study of potentially active native or herbal medications and remains to be fully resolved. However, based on known properties of the main ingredients and the significant effects observed in markers of lipid peroxidation, we suspect that the antioxidant properties attributed to this agent were actually being observed. We also cannot fully explain the changes in weight observed in the treated animals. This appears to be associated with decreased visceral adiposity but formal measurements of this unanticipated finding were not included in the prestudy planning. We did not observe a difference in the food intake between the groups based on assessment of residual food at each feeding but further study is needed to assess this possibility and the possible effects of increased activity (increased calorie expenditure) in the treated animals.

In summary, YHK demonstrated antioxidant effects supporting the significance of the antioxidant effect attributed to this agent. It is not clear whether this represents a more systemic or primarily local effect on fat metabolism. A variety of possible mechanisms can be evoked based on existing literature. For example, *Eucommia ulmoides* and *Polygonati rhizome* are reported to have hypoglycemic effects (32, 33) and may have beneficial effects in hypercholesterolemia (34). In addition, licorice extract is reported to reduce plasma lipid levels and systolic blood pressure in hypercholesterolemic patients (35) and licorice flavonoides are reported to suppress visceral fat accumulation and to alter insulin signaling (36). Although these effects cannot yet be fully explained, the effects of YHK on liver fat accumulation and indices of lipid peroxidation are clearly evident. Future studies are needed to elucidate these findings and to determine the possible clinical utility of this novel agent.

Acknowledgements

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Grant 2004/04483-7 and Alves de Queiroz Family Fund For Research.

References

1. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990; **11**: 74–80.
2. Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis* 2001; **21**: 17–26.

3. Hui JM, Farrell GC. Clear messages from sonographic shadows? Links between metabolic disorders and liver disease, and what to do about them. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; **18**: 1115–7.
4. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: a tale of two 'hits'? *Gastroenterology* 1998; **114**: 842–5.
5. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999; **107**: 450–5.
6. Chitturi S, Farrell G. Ethio-pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; **21**(1): 27–41.
7. Curzio M, Esterbauer H, Dianzani MU. Chemotactic activity of hydroxyalkenals on rat neutrophils. *Int J Tiss Reac* 1985; **7**: 137–42.
8. Lee KS, Buck M, Houghlum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest* 1995; **96**: 2461–8.
9. Marotta F, Rouge A, Harada M, et al. Beneficial effect of a controlled Chinese herbal remedy, K-17-22, in CCl₄-induced liver toxicity: an in vivo and vitro study. *Biomed Res* 2001; **22**: 167–74.
10. Marotta F, Bertuccelli J, Albergati F, et al. Ischemia–reperfusion liver injury: effect of a nutritional approach with K-17-22 on antioxidant defense system. *Biomed Res* 2001; **22**: 221–7.
11. Sha S, Harada M, Yanaihara N. Effect of YHK, a new Chinese herb prescription, on serum ALT and AST levels in patients with hepatic diseases. June 2–7, 2000 IASL-APASL Joint meeting 200, New Insights of Hepatology in the 21st century. Fukuoka, Japan.
12. Chande N, Laidlaw M, Adams P, Marotta P. Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK) improves transaminases in nonalcoholic steatohepatitis: a randomized pilot study. *Dig Dis Sci* 2006; **51**: 1183–9.
13. Nanji AA. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2004; **8**: 559–74.
14. Oshima Y, Sato K, Hikino H. Isolation and hypoglycemic activity of quinquefolans A, B, and C, glycans of *Panax quinquefolius* roots. *J Nat Prod* 1987; **50**: 188–90.
15. Sotaniemi EA, Haapakoski E, Rautio A. Ginseng therapy in non-insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Care* 1995; **18**: 1373–5.
16. Lee MK, Kim MJ, Cho SY, et al. Hypoglycemic effect of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; **67**: 22–28.
17. Jeon SM, Lee MK, Park YB, Park HM, Choi MS. Polygonatum rhizoma affects antioxidant defense systems without changing mRNA expression in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. *J Medicinal Food* 2004; **7**: 358–65.
18. Choi SB, Park S. A steroidal glycoside from *Polygonatum odoratum* improves insulin resistance but does not alter insulin secretion in 90% pancreatectomized rats. *Biosci, Biotechnol Biochem* 2002; **66**: 2036–43.
19. Armanini D, Fiore C, Mattarello MJ, Bielenberg J, Palermo M. History of the endocrine effects of licorice. *Exp Clin Endocrinol Diab* 2002; **110**: 257–61.
20. Walker BR, Connacher AA, Lindsay RM, Webb DJ, Edwards CR. Carbenoxolone increases hepatic insulin sensitivity in man: a novel role for 11-oxosteroid reductase in enhancing glucocorticoid receptor activation. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; **80**: 3155–9.
21. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta ML, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histologic scoring system for NAFLD. *Hepatology* 2005; **41**: 1313–21.
22. Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 2001; **21**: 89–104.
23. Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; **281**: G1135–9.
24. Yang SQ, Zhu H, Li Y, Gabrielson K, Trush MA, Diehl AM. Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys* 2000; **378**: 259–68.
25. Oliveira CPMS, Gayotto LCD, Tatai C, et al. Oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, in rats fed with a choline-deficient diet. *J Cell Mol Med* 2002; **6**: 399–406.
26. Grattagliano I, Vendemiale G, Caraceni P, et al. Starvation impairs antioxidant defense in fatty livers of rats fed a choline-deficient diet. *J Nutr* 2000; **130**: 2131–6.
27. Oliveira CPMS, Gayotto LCD, Tatai C, et al. Vitamin C and vitamin E in prevention of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in choline deficient diet fed rats. *Nut J* 2003; **2**: 9–11.
28. Ikura Y, Ohsawa M, Suekane T, et al. Localization of oxidized phosphatidylcholine in nonalcoholic fatty liver disease: impact on disease progression. *Hepatology* 2006; **43**: 506–14.
29. Stefano JT, Oliveira CPM, Lima VMR, et al. Protective effect of Yo Jyo Hen Shi Ko in nonalcoholic steatohepatitis (NASH): increased PPAR- α gene expression. *Gastroenterology* 2006; **130**: A-826.
30. Hensley K, Kotake Y, Sang H, Pye QN, Wallis GL, Kolker LM. Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H₂O₂ generation in liver mitochondria. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 983–9.
31. Rushmore TH, Lim YP, Farber E, Ghoshal AK. Rapid lipid peroxidation in the nuclear fraction of rat liver induced by a diet deficient in choline and methionine. *Cancer Lett* 1984; **24**: 251–5.
32. Lee MK, Kim MJ, Cho SY, et al. Hypoglycemic effect of Do-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diab Reas Clin Pract* 2005; **67**: 22–28.
33. Chen H, Feng R, Guo Y, Sun L, Jiang J. Hypoglycemic effects of aqueous extract of Rhizoma Polygonati Odorati in mice and rats. *J Ethnopharmacology* 2001; **74**: 225–9.

34. Nakasa T, Yamaguchi M, Okinaka O, Metori K, Takashi S. Effects of DU-zhong leaf extract on plasma and hepatic lipids in rats feed a high fat plus high cholesterol diet. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 1995; **69**: 1491–8.
35. Fuhrman B, Volkova N, Kaplan M, *et al.* Antiatherosclerotic effects of licorice extract supplementation on hypercholesterolemic patients: increased resistance of LDL to atherogenic modifications, reduced plasma lipid levels, and decreased systolic blood pressure. *Nutrition* 2002; **18**: 268–73.
36. Nakagawa K, Kishida H, Arai N, Nishiyama T, Mae T. Licorice flavonoids suppress abdominal fat accumulation and increase in blood glucose level in obese diabetic KK-A Mice. *Biol Pharm Bull* 2004; **27**(11): 1775–8.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams LA, Lymp JF, Sauver JST, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: A population-based cohort study. *Gastroenterology* 2002; 129:113-121.

Adams LA, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med.* 2005; 22:1129-33.

Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease steatohepatitis research. *Int.J.Exp.Pathol.* 2006;87(1) 1-16.

Baratta M. Leptin – from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. *Med Sci Monit* 2002; 8(12):RA282-92.

Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40(6):1387- 95.

Brunt EM. Nonalcoholic Steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2004; 24(1):3-20.

Brunt EM. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis: *Hepatol Res.* 2005; 33(2):68-71.

Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic cirrhosis: Clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* 1999; 29(3):664-9.

Chande N, Laidlaw M, Adams P, Marotta P. Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK) improves Transaminases in nonalcoholic steatohepatitis: A randomized pilot study. *Dig Dis Sci* 2006; 51(7):1183-9.

Chen H, Feng R, Guo Y, Sun L, Jiang J. Hypoglycemic effects of aqueous extract of *Rhizoma Polygonati Odorati* in mice and rats. *J Ethnopharmacol.* 2001; 74(3):225-9.

Chitturi S, Farrell G. Etiopathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2001; 21(1): 27-41.

Chitturis S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific

association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology*. 2002; 35(2): 373-9.

Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin. Gastroenterol* 2006; 40(1):S5-S10.

Clark, JM; Brancati, FL; Diehl, AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122:1649-1657.

Copaci I, Micu L, Voiculescu. The role of cytokines in non-alcoholic steatohepatitis a systematic review. *J.Gastrointestin Liver Dis* 2006;(15) 363-373.

Cotrim HP, De Freitas LA, Freitas C, Braga L, Sousa R, Carvalho F, Paraná R, Santos-Jesus R, Andrade Z. Clinical and histopathological features of NASH in workers exposed to chemical with or without associated metabolic conditions. *Liver int*. 2004; 24(2):131-5

Cotrim HP, Andrade ZA, Parana R, Portugal M, Lyra **LG**, Freitas LAR. Nonalcoholic steatohepatitis: a toxic liver disease in industrial workers. *Liver* 1999; 19: 299-304.

Das UN . Metabolic syndrome X an inflammatory condition? (Review). *Exp Biol Med* (Maywood). 2002; 227(11):989-97.

Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two 'hits'? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.

Duncan BB, Schmidt MI, Chambless LE, Folsom AR, Carpenter M, Heiss G. Fibrinogen, other putative markers of inflammation, and weight gain in middle-aged adults – The ARIC study. *Atherosclerosis Risk in Communities*. *Obes Res*. 2000;8(4):279-86.

Diehl AM, Li ZP, Lin HZ, Yang SQ. Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54;303-306.

Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Cowley MA. Leptin resistance and obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2006; Suppl 5:254S-258S.

Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis*. 2001; 21(1):17-26.

Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006; 43(2 Suppl 1):S99-S112.

Fuhrman B, Volkova N, Kaplan M, Presser D, Attias J, Hayek T, Aviram M. Antiatherosclerotic effects of licorice extract supplementation on hypercholesterolemic patients: increased resistance of LDL to atherogenic

modifications, reduced plasma lipid levels, and decreased systolic blood pressure. *Nutrition* 2002; 18(3):268-73.

Gholam PM, Kotler DP, Flancbaum LJ. Liver pathology in morbidly obese patients undergoing Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Obes Surg* 2002; 12(1):49-51.

Grattagliano I, Vendemiale G, Caraceni P, Domenicali M, Nardo B, Cavallari A, Trevisani F. Starvation impairs antioxidant defense in fatty livers of rats fed a choline-deficient diet. *J Nutr.* 2000; 130(9):2131-6.

Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Full K, Omatsu T, Nakajima T, Sarui H, Shimazaki M, Kato T, Okuda J, Ida K. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. : *Ann Intern Med.* 2005; 143(10):722-8.

Ikejima K, Okumura K, Lang T, Honda H, Abe W, Yamashina S, Enomoto N, Takei Y, Sato N. The role of leptin in progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2005;(33):151-4.

Ikura Y, Ohsawa M, Suekane T, Fukushima H, Itabe H, Jomura H, Nishiguchi S, Ueda M. Localization of oxidized phosphatidylcholine in nonalcoholic fatty liver disease: Impact on disease progression. *Hepatology* 2006; 43:506-14.

Jimba S, Nakagami T, Takahashi M, Wakamatsu T, Hirota Y, Iwamoto Y, Wasada T. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabet Med.* 2005; 22(9):1141-5.

Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995; 95: 2111-9.

Koteish A, Diehl AM. Animals models of steatohepatitis *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2002; 16(5):679-90.

Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest.* 2000; 105(8):1067-75.

Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR. Leptina is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol.* 2002;37; 206-13.

Lee KS, Buck M, Houghlum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest.* 1995; 96(5):2461-8.

Lee MK, Kim MJ, Cho SY, Park SA, Park KK, Jung UJ, Park HM, Choi MS. Hypoglycemic effect of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005; 67(1):22-8.

Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Ott BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 1980; 55:434-8.

Madan K, Bhardwaj MSc, Thareja S, Gupta SD, Saraya A. Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) 2006; 40(10): 930-5.

Marchesini G, Bugianese E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37(4): 917-23.

Marchesini G, Forlani G. NASH: From liver diseases to metabolic disorders and back to clinical hepatology. *Hepatology.* 2002; 35(2):497-9.

Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale F, Melchionda N. A feature of the Metabolic Syndrome. *Diabetes.* 2001; 50(8):1844-50.

Marchesini G, Brizi M, Morselli-labate AM, Bianchi G, Burgianesi E, McCullough AJ, Forlani G, Melchionda N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999; 107:450-5.

Marotta F, Harada M, Goh KL, Lorenzetti A, Gelosa F, Minelli E. Phytotherapeutic compound YHK exerts an inhibitory effect on early stage of experimentally-induced neoplastic liver lesions. *Annals of Hepatology* 2006; 5(4):268-272.

Marotta F, Rouge A, Harada M, Anzulovic H, Idéo GM, Yanaihara N, Princess G, Idéo G. Beneficial effect of a controlled Chinese herbal remedy, K-17-22, in CCl₄- induced liver toxicity: an in vivo and vitro study. *Biomed Res* 2005; 22: 167-174.

McCullough AJ, Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2006; 40(3 Suppl 1):S17-29.

Nanji AA. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2004; 8(3):559-74.

Nakagawa K, Kishida H, Arai N, Nishiyama T, Mae T. Licorice flavonoids suppress abdominal fat accumulation and increase in blood glucose level in obese diabetic KK-A Mice. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(11): 1775–8.

National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002; 106:3143–421.

Oliveira CP, Coelho AM, Barbeiro HV, Lima VM, Soriano F, Ribeiro C, Molan NA, Alves VA, Souza HP, Machado MC, Carrilho FJ Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of experimental nonalcoholic fatty liver disease. *Braz J Med Biol Res*. 2006; 39(2):189-94.

Oliveira CP, Stefano JT, Lima VM, Sá SV, Simplicio FI, Mello ES, Correa-Giannella ML, Alves VA, Laurindo FR, Oliveira MG, Giannella-Neto D, Carrilho FJ. Hepatic gene expression profile associated with non-alcoholic steatohepatitis protection by S-nitroso-N-acetylcysteine in ob/ob mice. *J Hepatol*. 2006; 45: 725-33.

Oliveira CP, da Costa Gayotto LC, Tatai C, Della Bina BI, Janiszewski M, Lima ES, Abdalla DS, Lopasso FP, Laurindo FR, Laudanna AA. Oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, in rats fed with a choline-deficient diet. *J Cell Mol Med*. 2002; 6(3):399-406.

Oliveira CP, Faintuch J, Rascovski A, Furuya CK Jr, Bastos Mdo S, Matsuda M, Della Nina BI, Yahnosi K, Abdala DS, Vezozzo DC, Alves VA, Zilberstein B, Garrido AB Jr, Halpern A, Carrilho FJ, Gama-Rodrigues JJ. Lipid peroxidation in bariatric candidates with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) - preliminary findings. *Obes Surg.* 2005; 15(4):502-5.

Oliveira CP, Gayotto LC, Tatai C, Della Nina BI, Lima ES, Abdalla DS, Lopasso FP, Laurindo FR, Carrilho FJ. Vitamin C and vitamin E in prevention of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in choline deficient diet fed rats. *Nutr J.* 2003; 7;2:9.

Powell EE, Cooksley WGE, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW.. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology.* 1990; 11(1):74-80.

Saviano MC, Brunetti F, Rubino A, Franzese EA, Vajro P, Argenziano A, Puzziello A, Iannucci MP. Liver involvement in obese children. Ultrasonography and liver enzyme levels at diagnosis and during follow-up in an Italian population. *Dig Dis Sci.* 1997; 42(7):1428-32.

Stefano JT, Oliveira CPM, Correa-Giannella ML, de Lima VM, de Sa SV, de Oliveira EP, de Mello ES, Giannella-Neto D, Alves VA, Carrilho FJ. Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) in OB/OB Mice Treated with Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK): Effects on Peroxisome Proliferator-Activated Receptors

(PPARs) and Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP). Dig Dis Sci. 2007.

Stumvoll M. Thiazolidinediones - some recent developments. Expert Opin Investig Drugs. 2003; 12(7):1179-87.

Yang S, Zhu H, Li Y, Lin H, Gabrielson H, Trush MA, Diehl AM. Mitochondrial Adaptations to Obesity-Related Oxidant Stress. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2000; 378(2) 259–68.

Xiong MA, Zhiping Li. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Chin J Dig Dis. 2006; 7(1):7-11.

Zafrani ES. Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum. Virchows Arch. 2004; 444(1):3-12.

Zeisel SH, Choline: An essential nutrient for humans. Nutrition. 2000; 16: 7-8.