



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

RENAN DA CUNHA FERNANDES

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM A ASSOCIAÇÃO NALTREXONA/BUPROPIONA
EM FÍGADOS DE RATOS OBESOS: aspectos histomorfométricos**

Recife
2019

RENAN DA CUNHA FERNANDES

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM A ASSOCIAÇÃO
NALTREXONA/BUPROPIONA EM FÍGADOS DE RATOS OBESOS: aspectos
histomorfométricos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia

Orientadora:

Prof^a Dr^a Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Recife
2019

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

F363e Fernandes, Renan da Cunha.
Efeitos do tratamento com a associação naltrexona/bupropiona em fígados de ratos obesos: aspectos histomorfométricos / Renan da Cunha Fernandes. – 2019.
81 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Manuela Figueiroa Lyra de Freitas.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2019.
Inclui referências e anexos.

1. Obesidade. 2. Naltrexona. 3. Bupropiona. 4. Estereologia. 5. Histologia. I. Freitas, Manuela Figueiroa Lyra de (Orientadora). II. Título.

616.07

CDD (20.ed.)

UFPE (CCS2020-099)

RENAN DA CUNHA FERNANDES

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM A ASSOCIAÇÃO
NALTREXONA/BUPROPIONA EM FÍGADOS DE RATOS OBESOS: aspectos
histomorfométricos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Aprovada em 12/09/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o Dr^o Jaciel Benedito de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a Dr^a Lisiane dos Santos Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^oDr^o Mario Ribeiro de Melo-Júnior
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico a Creuza, minha melhor amiga, e incentivadora. Te amo mãe!

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, por me ajudar a chegar até aqui, sem Ele nada sou!

Aos meus pais Creuza e Valdemir, por não medirem esforços para que meus sonhos fossem realizados, sou e serei eternamente grato a vocês, meus maiores exemplos de honestidade, força e amor. Amo vocês!

Ao meu sobrinho Cauã que aos 3 anos, me traz alegria ao falar: “titio, te amo” enchendo meu coração de amor, mesmo em dias mais tristes.

A Matheus, meu grande amigo que sempre traz as palavras corretas nas horas precisas e que divide as maiores risadas, alegrias e brincadeiras, desde a graduação até os dias atuais, obrigado meu amigo, te amo!

A Thaisa e Gabriela que mesmo na distância se fazem presentes dedicando sempre as melhores conversas, alegrias, tristezas e torcida que começou em 2011 ao ingressarmos nesta casa, a UFPE, amo vocês!

Aos meus companheiros de turma durante esta jornada que foi o mestrado: Pedro, Fábio, Cléssia, Heverton, Janaina, Lívia, Jaciane, Elaine e Natalice, vocês fizeram toda a diferença, sem vocês não teria sido tão incrível, muito obrigado!

Aos professores que compõe o Programa de Pós-Graduação em Patologia, por cada aula, discussão e ensinamento. Obrigado!

A Professora Doutora Manuela Figueiroa Lyra de Freitas, por todas as palavras, carinho, atenção e dedicação ao me orientar durante boa parte desta jornada, me lembrarei de todas as palavras, puxões de orelha, interesse, incentivo, preocupação e principalmente pela confiança depositada, sempre com muito carinho. Aprendi com ela que pra ensinar, devo ter a humildade de aprender, observar e enxergar o que há de melhor nas pessoas, devo esses e outros tantos aprendizados a você, muito obrigado por contribuir de maneira ímpar na construção de um sonho.

Aos funcionários que compõe a PPG de Patologia da UFPE, por todo apoio, dedicação, educação e carinho que recebi durante esses dois anos de mestrado, muito obrigado por tudo.

A CAPES pelo recurso financeiro disponibilizado

E a todos que contribuíram para o bom desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da associação Bupropiona/Naltrexona sobre o peso, aspectos bioquímicos e histomorfométricos em ratos *wistar* obesos. Foram utilizados ratos da linhagem *wistar* divididos em dois grupos de acordo com a dieta oferecida: n=10 normonutrido (dieta padrão de biotério) e n=10 obeso (dieta de indução a obesidade) e posteriormente subdivididos em 4 grupos, onde n=5 normonutridos sem tratamento, n=5 normonutridos com tratamento da associação NAL/BUP, n=5 obesos sem tratamento e n=5 obesos com tratamento com a associação NAL/BUP. Foram analisados: Peso corporal; Consumo alimentar; Índice de Lee; IMC; Perfil bioquímico e hematológico, Análise morfométrica e histológica dos fígados dos animais experimentais, após o período de tratamento com a associação Bupropiona/Naltrexona. O uso combinado de NAL (1mg/kg) BUP (20mg/kg) promoveu em animais obesos, redução nas medidas da ingestão alimentar ($5,74 \pm 0,36$ vs. $4,25 \pm 0,23$); do peso corporal ($461,5 \pm 38,1$ vs. $418,4 \pm 43,7$), dos índices de Lee Lee ($344,4 \pm 13,7$ vs. $321,7 \pm 12,2$) e o IMC ($0,91 \pm 0,07$ vs. $0,77 \pm 0,08$), redução do peso ($5,22 \pm 1,96$ vs. $4,15 \pm 0,120$), aumentando o volume do lobo médio hepático ($13,01 \pm 0,755$ vs. $14,00 \pm 0,508$), reduzindo a densidade de volume do núcleo de hepatócitos do lobo médio hepático ($0,65 \pm 0,030$ vs. $0,50 \pm 0,025$) e conseqüentemente, levando a uma redução do número de núcleos de hepatócitos do lobo médio hepático ($71,4 \pm 3,17$ vs. $54,6 \pm 2,69$). Aumentando índices bioquímicos da Fosfatase alcalina, AST e de plaquetas. Além destes resultados foi observado nos animais obesos uma redução do padrão de esteatose hepática por meio de análise histológica. Estes resultados indicam que o uso combinado de NAL/BUP promove redução do consumo de alimentos densamente energéticos o que contribui para a perda de peso, além de melhoria na glicemia, reduziu os índices de esteatose hepática e diminuiu as alterações morfométricas no tecido hepático.

Palavras-Chave: Obesidade. Naltrexona. Bupropiona. Estereologia. Histologia.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the action of Bupropion / Naltrexone association on weight, biochemical and histomorphometric aspects in obese wistar rats. Wistar rats were divided into two groups according to the diet offered: n = 10 normonutride (standard vivarium diet) and n = 10 obese (obesity-inducing diet) and then subdivided into 4 groups, where n = 5 normonutrients. no treatment, n = 5 normonutrients treated with NAL / BUP combination, n = 5 obese without treatment and n = 5 obese treated with NAL / BUP combination. The following were analyzed: body weight; Food consumption; Lee index; BMI; Biochemical and hematological profile, Morphometric and histological analysis of the livers of experimental animals after the treatment period with the Bupropion / Naltrexone combination. The combined use of NAL (1mg / kg) BUP (20mg / kg) promoted in obese animals a reduction in food intake measurements (5.74 ± 0.36 vs. 4.25 ± 0.23); body weight (461.5 ± 38.1 vs. 418.4 ± 43.7), Lee Lee indices (344.4 ± 13.7 vs. 321.7 ± 12.2) and BMI (0.91 ± 0.07 vs. 0.77 ± 0.08), weight reduction (5.22 ± 1.96 vs. 4.15 ± 0.120), increasing the volume of the hepatic middle lobe (13.01 ± 0.755). 14.00 ± 0.508), reducing the volume density of the hepatic middle lobe hepatocyte nucleus (0.65 ± 0.030 vs. 0.50 ± 0.025) and consequently leading to a reduction in the number of hepatocyte nuclei in the liver. hepatic middle lobe (71.4 ± 3.17 vs. 54.6 ± 2.69). increasing biochemical indices of alkaline phosphatase, AST and platelets. In addition to these results, a reduction in hepatic steatosis pattern was observed in obese animals through histological analysis. These results indicate that the combined use of NAL / BUP promotes a reduction in the consumption of densely energetic foods, which contributes to weight loss. improved glycemia, reduced hepatic steatosis rates and decreased morphometric changes in liver tissue.

Keywords: Obesity. Naltrexone. Bupropion. Stereology. Histology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Prevalência mundial de obesidade em mulheres maiores de 18 anos.....	16
Figura 2 –	Prevalência mundial de obesidade em homens maiores de 18 anos.....	16
Figura 3 –	Patogênese da doença hepática gordurosa alcoólica	23
Figura 4 –	Organograma demonstrando a formação dos grupos experimentais	31
Figura 5 –	Etapas da análise morfométrica e da análise histológica do tecido hepático do lobo médio hepático de ratos Wistar	39
Figura 6 –	Demonstração do uso do ImageJ para a contagem de hepatócitos binucleados no lobo médio hepático	40
Figura 7 –	Demonstração do uso do ImageJ para a determinação da Densidade de Volume (Vv) do lobo médio hepático	41

ARTIGO ORIGINAL

Figura 1 –	Evolução do peso corporal durante 11 semanas antes do início do tratamento	59
Figura 2 –	Efeito da combinação de NAL/BUP sobre o peso corporal (inicial e final) em ratos wistar normonutridos e obesos	60
Figura 3 –	Efeito da combinação de NAL/BUP sobre o índice de Lee antes e após tratamento em ratos wistar normonutridos e obesos	60
Figura 4 –	Efeito da combinação de NAL/BUP sobre o índice de Massa Corporal (IMC) antes e após tratamento em ratos wistar normonutridos e obesos	61
Figura 5 –	Efeito da combinação de NAL/BUP sobre a glicemia capilar em ratos wistar machos normonutridos e obesos	62
Figura 6 –	Peso do lobo médio hepático	62
Figura 7 –	Comprimento do lobo médio hepático.....	63

Figura 8 –	Volume de referência do lobo médio hepático.....	63
Figura 9 –	Densidade de volume (Vv) dos núcleos dos hepatócitos do lobo médio	64
Figura 10 –	Contagem de hepatócitos Binucleados do lobo médio hepático de ratos wistar	64
Figura 11 –	Análise histológica dos grupos normonutridos (A) e (B)	65
Figura 12 –	Análise histológica dos grupos Obesos (A) e (B).....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação internacional da obesidade segundo o índice de massa corporal (IMC) e risco de doença (Organização Mundial da Saúde) que divide a adiposidade em graus ou classes	21
Tabela 2 –	Classificação internacional da obesidade segundo o índice de massa corporal (IMC) e risco de doença (Organização Mundial da Saúde) que divide a adiposidade em graus ou classes	32
Tabela 3 –	Ingredientes da dieta de indução a obesidade utilizada nos experimentos	32
Tabela 4 –	Composição de macronutrientes segundo o Valor Energético Total (VET) da dieta de indução a obesidade de Crescimento e Manutenção oferecida aos animais experimentais	33

ARTIGO ORIGINAL

Tabela 1 –	Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre o perfil bioquímico..	65
Tabela 2 –	Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre o perfil hematológico	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CKK	Colecistocinina
DA	Dopamina
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Hepática
DIO	Dieta de Indução da Obesidade
EHGNA	Esteato hepatite não alcoólica
IMC	Índice de Massa Corporal
NA	Noradrenalina
NAL/BUP	Associação naltrexona e bupropiona
NASH	Esteatohepatite Não Alcoólica
NCT	Normonutrido com tratamento pela associação de NAL/BUP
NST	Normonutrido sem tratamento pela associação de NAL/BUP
OCT	Obeso com tratamento pela associação de NAL/BUP
OST	Obeso sem tratamento pela associação de NAL/BUP
POMC	Peptídeo pró-ópiomelacortina
VRef	Volume de Referência
Vv	Densidade de Volume
α -MSH	α -Melanocyte-stimulating hormone (Hormônio estimulante de alfa – melanócitos)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	OBESIDADE	16
2.2	CAUSAS DA OBESIDADE	17
2.3	DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DA OBESIDADE	20
2.4	CONSEQUÊNCIAS DA OBESIDADE	21
2.5	DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (DHGNA)	22
2.6	TRATAMENTO DA OBESIDADE	25
2.6.1	Tratamento não farmacológico da obesidade	25
2.6.2	Tratamento farmacológico da obesidade	26
2.6.3	Naltrexona/Bupropiona em associação para o tratamento da obesidade	27
3	OBJETIVOS	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	30
4.2	OBTENÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	30
4.3	DIETAS EXPERIMENTAIS	31
4.4	EXPERIMENTOS	34
4.4.1	Análise da evolução ponderal	34
4.4.2	Análise do consumo alimentar antes do tratamento pelo uso combinado de NAL/BUP	34
4.4.3	Análise do consumo alimentar durante o tratamento pelo uso combinado de NAL/BUP	35
4.4.4	Índice de LEE	35
4.4.5	Índice de massa corporal (IMC)	36
4.5	ESTUDOS	36
4.5.1	Análise de Parâmetros Metabólicos: Níveis de Glicose capilar	36
4.5.2	Coleta de amostras para realização de estudos	36

4.5.3	Análise dos parâmetros bioquímicos	36
4.5.4	Análise dos parâmetros hematológicos	37
4.5.5	Análise histológica, morfométrica e estereológica dos fígados.	37
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	41
5	RESULTADOS	42
6	CONCLUSÕES	74
6.1	PERSPECTIVAS.....	74
	REFERÊNCIAS	75
	ANEXO A - Ofício da Comissão de Ética em Experimentação Animal – CB/UFPE	81

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o sobrepeso e a obesidade vêm aumentando significativamente, onde em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos apresentavam excesso de peso, sendo definida como acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal, a obesidade apresenta uma série de fatores de riscos para a saúde desencadeando doenças crônicas, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (WHO 2017).

As consequências advindas com a obesidade são preocupantes, pela presença de morbidades e comorbidades associadas, como as dislipidemias, diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão arterial, doenças dermatológicas, além da Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (BRASIL, 2015).

A doença hepática gordurosa não alcoólica é problema clínico emergente em obesos, atingindo uma prevalência alta em países desenvolvidos e com aumento em países em desenvolvimento (BROWNING; SZCZEPANIAK; DOBBINS, 2004). Uma condição clínico-patológica a DHGNA é caracterizada por depósito de lipídios no hepatócito do parênquima hepático, que ocorre em indivíduos que não utilizam álcool (SASS; CHANG; CHOPRA, 2005). Variando de esteatose macrovesicular simples (acúmulo de gordura nos hepatócitos) para esteato-hepatite/EHNA (esteatose associada à atividade necroinflamatória), fibrose avançada e cirrose (CARVALHEIRA; SAAD, 2006).

O tratamento clínico da DHGNA, apresenta propostas de tratamento como: medidas nutricionais que visam à redução de peso, estímulo à detoxicação hepática, controle da resistência insulínica, melhora do perfil lipídico plasmático, mobilização de lipídios hepáticos e o incentivo à introdução de alimentação saudável (MAZZA; SANTANA; OLIVEIRA, 2009). Bem como, a terapêutica dos componentes da síndrome metabólica, que incluem: incentivo à atividade física, drogas para reduzir peso e a resistência insulínica (OLIVEIRA; MELLO; ALVES, 2009).

Para o tratamento da obesidade, devido sua complexidade, é necessário um engajamento multidisciplinar, incluindo assim intervenções medicamentosas e não medicamentosas. Mudança no estilo de vida é essencial para eficácia do tratamento não medicamentoso que inclui: reeducação alimentar e atividade física (ABESO, 2009).

Quanto ao tratamento medicamentoso da obesidade, existem várias opções, entre elas: os anorexígenos – sibutramina, sendo esse o mais utilizado. Inibidores da recaptção de

serotonina e a associação de bupropiona e naltrexona, sendo essa uma das mais recentes opções para o tratamento farmacológico da obesidade, que apresenta vantagens e desvantagens. Sendo importante o entendimento de que a obesidade é uma doença crônica, assim o tratamento não cura a obesidade, mas traz um certo controle e diminui as comorbidades associadas a obesidade (ABESO, 2010).

A combinação de Bupropiona com Naltrexona (Contrave[®]) é estudada há anos pela empresa farmacêutica *Orexigen Therapeutics Inc.* como potencial droga para o tratamento da obesidade. A Naltrexona usada comumente para o tratamento de dependência aos opiáceos e, posteriormente, de dependência de álcool, por ser um antagonista de receptor opioide foi testada quanto a sua eficácia no tratamento monoterápico da obesidade e apresentou pouca ou nenhuma redução do peso corporal. (ABESO, 2010).

A bupropiona utilizada em monoterapia para o tratamento da cessação do tabagismo por ser um inibidor da recaptção de dopamina e norepinefrina, foi também testada em monoterapia para o tratamento de redução de medidas em casos de obesidade, obtendo resultados modestos, mesmo na presença de mudanças de hábitos de vida (ABESO, 2010).

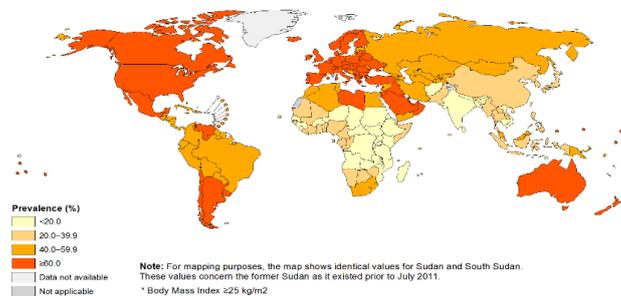
Nesse contexto, diante da necessidade de opções alternativas para o tratamento das alterações hepáticas desenvolvidas pela obesidade, o presente estudo, visa avaliar os benefícios da terapia com a associação Naltrexona/Bupropiona em fígados de ratos obesos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OBESIDADE

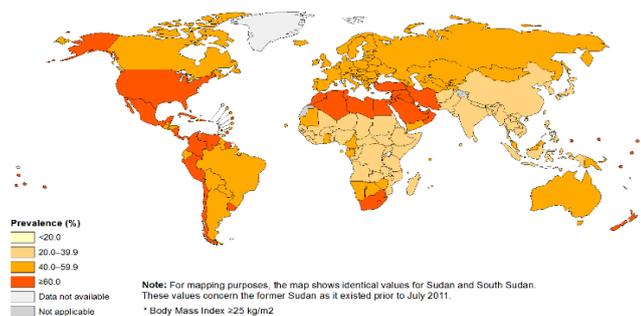
Definida pela OMS (Organização Mundial da Saúde) como um acúmulo excessivo de gordura, a obesidade advém de uma desigualdade energética e da interação de genes, ambiente e estilo de vida, onde as causas principais são o excesso de alimentos calóricos, podendo ou não estar associadas a falta de atividade física. O excesso de peso em adultos é definido pela OMS através do índice de massa corporal (IMC) que apresenta os seguintes valores: $\geq 25,0$ kg/m², a obesidade como tendo uma IMC de $\geq 30,0$ kg/m² e sobrepeso como tendo um IMC de 25,0-29,9 kg/m² (WHO, 2017). Segundo dados atuais da OMS, a prevalência da obesidade quase triplicou entre 1975 e 2016. Em 2016, cerca de 1,9 bilhão de adultos tinham excesso de peso (Figuras 1 e 2).

Figura 1 - Prevalência mundial de obesidade em homens maiores de 18 anos (IMC ≥ 30 kg/m²).



Fonte: World Health Organization, ano de referência: 2016. (WHO, 2017)

Figura 2 - Prevalência mundial de obesidade em mulheres maiores de 18 anos (IMC ≥ 30 kg/m²).



Fonte: World Health Organization, ano de referência: 2016. (WHO, 2017).

Em 1975 pelo menos 1% das crianças e adolescentes entre 5 e 19 anos eram obesos, já em 2016 esse número chega a mais de 124 milhões de crianças e adolescentes, representando respectivamente 6% das meninas e 8% dos meninos com obesidade. As crianças menores de 5 anos, representam 41 milhões de indivíduos com excesso de peso ou obesidade (WHO, 2017).

Considerado anteriormente como um problema de país desenvolvido, o excesso de peso e a obesidade estão aumentando gradativamente em países de pouco ou em desenvolvimento, particularmente em ambientes urbanos. Na Ásia, por exemplo, estima-se que metade das crianças com menos de 5 anos apresentaram sobrepeso ou obesidade em 2016 (WHO, 2017).

A obesidade e o excesso de peso assumiram proporções epidêmicas na região das Américas, que agora tem a maior prevalência de todas as regiões acompanhadas pela OMS, onde, cerca de 62% dos adultos são obesos ou tem sobrepeso. Esta epidemia não poupou crianças e adolescentes e cerca de 20% a 25% são afetadas por excesso de peso (WHO, 2017).

Entre 2011 e 2014 a prevalência de obesidade foi de 36,5% entre adultos dos Estados Unidos da América (EUA). Geralmente a prevalência de obesidade entre mulheres (38,3%) foi maior do que em homens. (CRAIG et al, 2017). Em mais de 20 países da América Latina e Caribe, a taxa de obesidade feminina é 10% maior que a dos homens (OPAS, 2017).

No Brasil, segundo dados divulgados do relatório da Organização das Nações Unidas e da Organização Pan-americana de Saúde (OPAS), Panorama da Segurança Alimentar e Nutricional na América Latina e Caribe, atualmente mais da metade da população brasileira está com sobrepeso e a obesidade já atinge mais de 20% das pessoas adultas. Quanto ao sobrepeso em adultos, em 2010 passou de 51,1%, para 54,1% em 2014. A análise aponta a mesma tendência em relação a obesidade, que passou de 17,8% da população adulta em 2010 para 20% em 2014, com uma maior prevalência em mulheres, chegando a 22% (OMS; OPAS, 2017).

Dados da Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas vinculados ao Ministério da Saúde em todas as capitais do Brasil por 10 anos, mostraram a prevalência da obesidade e descobriram que ela passou de 11,8% em 2006 para 18,9% em 2016, atingindo quase um em cada cinco brasileiros maiores de 18 anos (BRASIL, 2017).

2.2 CAUSAS DA OBESIDADE

O principal causador do acúmulo de gordura e conseqüentemente da obesidade, é o balanço energético positivo. A diferença entre a quantidade de energia consumida e a quantidade de energia gasta nas diversas funções vitais e de atividades define o balanço energético. Geralmente é determinado pela ingesta de macronutrientes, pelo gasto energético e pela termogênese dos alimentos, portanto, o consumo excessivo de alimentos calóricos, ou mesmo um baixo gasto energético, podem ser agentes causais da obesidade (BOUCHARD, 2000; WANDERLEY; FERREIRA, 2010).

Os elementos que determinam esse desequilíbrio são complexos e podem ter origem genética, metabólica, ambiental e comportamental (BRANDÃO; SILVA, 2012).

Ao longo dos anos a sociedade desenvolveu-se socioeconomicamente e com isso, novos hábitos foram modificados. A industrialização ofereceu uma maior facilidade na obtenção e no preparo dos alimentos em geral, o padrão de vida passou a ser mais sedentário e com todos outros fatores envolvidos com o desenvolvimento da sociedade, as pessoas passaram a se alimentar mais e exercitar cada vez menos, levando a um superávit calórico, favorecendo a obesidade nas pessoas predispostas geneticamente. (MENDONÇA; ANJOS, 2004; REPETTO et al, 2003).

Comodidades presentes em nosso ambiente, como a utilização de televisão, videogames, computadores, entre outros, conduzem a um estilo de vida cada vez mais sedentário. Existe uma associação significativa entre o aumento da prevalência de obesidade e a quantidade de horas desperdiçadas, como o hábito de assistir televisão. Essa relação pode ser explicada pela natureza sedentária de tal atividade, bem como o consumo de lanches com altos teores de gordura e/ou açúcar durante o período em frente à TV (MUST et al, 1992; ALMEIDA et al, 2002; FISBERG; OLIVEIRA, 2003).

Os fatores genéticos podem determinar a suscetibilidade do indivíduo para o ganho de peso, porém não são determinantes, visto que os fatores ambientais e de estilo de vida, tais como sedentarismo e hábitos alimentares inadequados, podem levar a um balanço energético positivo, favorecendo o surgimento do excesso de peso e conseqüentemente da obesidade. (BRAY; POPKIN, 1998; US, 2001; WHO, 2004).

A síndrome de Prader-Willi, de Laurence-Moon-Biedl, ou mutações no gene produtor e/ou receptor de leptina são doenças específicas que provocam cerca de 20 a 25% dos casos de obesidade. (HARISON et al., 2008).

A leptina atua no sistema nervoso central, no hipotálamo especificamente e integra o complexo fisiológico que regula o armazenamento, equilíbrio e o gasto energético pelo organismo, modulando assim o estado nutricional do organismo para outros sistemas fisiológicos causando inibição sobre o conjunto de alterações neuroendócrinas secundárias a privação alimentar. Modifica a expressão e a atividade de inúmeros peptídeos hipotalâmicos que regulam o apetite e o gasto energético (LICINO; NEGRÃO, 2000).

A leptina, descoberta em 1994 por Jeffrey Friedman, é uma proteína com 167 resíduos de aminoácidos, com uma massa molecular de aproximadamente 16 kDa (ZHANG, 1994). Embora a principal ação da leptina consista numa modulação a longo prazo, uma ação a curto prazo também parece possível, esta última com a colaboração de outros peptídeos responsáveis pela sensação de saciedade. A sua secreção é estimulada pela insulina e outros peptídeos gástricos, como a grelina, logo após a ingestão alimentar (LÓPEZ, 2007).

A leptina foi considerada um hormônio determinante para o desenvolvimento da obesidade. Esta evidência emergiu quando se identificaram mutações no gene da leptina em camundongos obesos e se observou que crianças obesas portadoras de deficiência congênita de leptina revertiam o seu peso corporal quando tratadas com este hormônio. As mutações no gene da leptina ou nos seus receptores podem resultar em obesidade mais ou menos grave, dependendo da perda da sua função (MONTAGUE, 1997)

Vale salientar outros fatores que estão envolvidos na gênese da obesidade, por exemplo a colecistocinina (CCK), a grelina, o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo YY que são substâncias envolvidas no controle da ingestão alimentar (DUARTE et al, 2005; GUILÁ, 2006).

O peptídeo YY e a CCK são liberados pelo trato gastrointestinal e ao nível cerebral, inibindo a ingestão alimentar, promovendo a saciedade após uma refeição. O NPY é sintetizado no SNC e estimula a ingestão. A ativação de neurônios produtores de NPY no hipotálamo, fica por conta da leptina e insulina. A leptina inibe a síntese dos produtores de NPY. A grelina é um hormônio gastrointestinal estimulador do apetite e faz parte dos sistemas de regulação do peso corporal. A produção excessiva de grelina pode levar à obesidade. Se acontece alguma alteração em alguma destas vias citadas, nas quais regulam o balanço energético, provocam disfunções nos sistemas de regulação do peso corporal por retroalimentação, podendo levar a obesidade. (DUARTE et al., 2005).

A grelina é um hormônio composta por 28 resíduos de aminoácidos, descoberta em 1999, como sendo um ligando para o receptor secretagogo do hormônio do crescimento do tipo

1 (GHSR) (HOWARD, 1996). Embora seja predominantemente expresso no estômago, também pode ser expresso no fígado, pâncreas, coração e sistema nervoso central (DELPORTE, 2013).

Apresentando valores circulantes mais elevados na fase de jejum que baixam imediatamente após a ingestão alimentar. A sua ação ocorre através da ligação a receptores específicos no núcleo arqueado hipotalâmico, provocando o aumento da atividade dos neurônios NPY/AgRP e inibindo os neurônios POMC (OLSZEWSKI PK, 2003; TSCHÖP M, 2001)

Enquanto o formato acilado de ghrelina parece estimular a ingestão alimentar, adiposidade e a homeostase da glicose, o formato não acilado, parece induzir um balanço energético negativo, suprimindo a liberação de glicose pelos adipócitos e diminuindo as concentrações de insulina circulantes (ASAKAWA., 2005; GAUNA., 2005). Se, por um lado, os dados relativos à sua associação com o índice de massa corporal são consensuais, o mesmo não acontece relativamente à sua ação no metabolismo dos glicídios. Nos obesos têm sido referidos valores elevados de grelina acilada e mais baixos de grelina não acilada quando comparados com indivíduos normoponderais (DELHANTY, 2013; PACIFICO., 2009).

Além destes fatores citados, maus hábitos alimentares e diminuição da realização de exercícios físicos, associados a fatores genéticos poligênicos são as causas das maiorias dos casos de obesidade. À medida que a sociedade se torna mais desenvolvida e mecanizada, a demanda por atividades físicas diminui, reduzindo o gasto energético diário (FRANCISCH et al., 2000).

2.3 DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DA OBESIDADE

O diagnóstico da obesidade é feito através da aferição do Índice de Massa Corporal (IMC) e foi estabelecido pela OMS em 1997 e até hoje, permanece inalterado. O IMC (calculado através da divisão do peso em kg pela altura em metros elevada ao quadrado, kg/m^2) é o cálculo mais usado para avaliação da adiposidade corporal. Apesar de não representar a composição corporal, o IMC vem sendo utilizado como uma medida aproximada de gordura total, visto que é altamente correlacionado com a gordura corporal (NIH, 2012). Vale salientar que o IMC não mede diretamente a proporção de gordura no corpo, mas é o parâmetro mais

utilizado para o diagnóstico de excesso de peso e obesidade, por ser um método de fácil execução, prático e simples. (HERNANDES e PEREIRA, 2010).

Tabela 1 - Classificação internacional da obesidade segundo o índice de massa corporal (IMC) e risco de doença (Organização Mundial da Saúde) que divide a adiposidade em graus ou classes.

IMC (KG/M ²)	CLASSIFICAÇÃO	OBESIDADE GRAU/CLASSE	RISCO DE DOENÇA
<18,5	Magro ou baixo peso	0	Normal ou elevado
>18,5 e <24,9	Normal ou eutrófico	0	Normal
>25 e <29,9	Sobrepeso ou pré- obeso	0	Pouco elevado
>30 e <34,9	Obesidade	I	Elevado
>30 e <39,9	Obesidade	II	Muito elevado
>40 kg/m ²	Obesidade grave	III	Muitíssimo elevado

(Fonte da tabela: ABESO, 2016)

Além do IMC, outras medidas também são importantes e devem ser levadas em consideração, como: razão cintura-estatura, ultrassonografia, ressonância magnética, condutividade elétrica total, análise de bioimpedância elétrica, espessura de dobras cutâneas e o perímetro da cintura (PELEGRINI et al., 2015).

2.4 CONSEQUÊNCIAS DA OBESIDADE

Estudos sobre o aumento da prevalência da obesidade revelam dados preocupantes, principalmente quando tem o entendimento que este problema frequentemente não se apresenta de forma isolada, mas como fator favorável para o surgimento de outras doenças, as chamadas, doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como diabetes mellitus tipo II, hipertensão arterial, dislipidemias, doença hepática gordurosa, doenças coronarianas, entre outras (ENES, 2010; CDC, 2017).

Estimativas globais da OMS revelam que as DCNT são responsáveis por 58,5% das mortes e por 45,9% da carga de doença no mundo (WHO, 2011). No Brasil, as DCNT concentram 72% do total de óbitos, e 75% dos gastos com atenção à saúde no Sistema Único de Saúde (SUS), segundo dados de 2009 do Sistema de Informação de Mortalidade – Percentual que representa mais de 742 mil mortes por ano. As doenças cardiovasculares são responsáveis por 31% do total de óbitos por causas conhecidas no Brasil, e seus fatores de risco (hipertensão

arterial, triglicerídeos e Lipoproteína de Alta Densidade (LDL) elevados, Lipoproteína de Baixa Densidade (HDL) baixo, entre outros) estão associados ao sobrepeso e obesidade (RECH et al., 2007; SCHMIDT et al., 2011).

Neoplasias malignas podem ser causados pela obesidade, como por exemplo, o câncer de endométrio, fígado e rim, e também a alterações dermatológicas, como estrias, dermatites, entre outros. Podendo também ser a causa de distúrbios psicossociais e implicações, como aumento do risco cirúrgico (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017).

Além das doenças, existem os problemas econômicos, que não se limitam a fatores médicos, mas também a fatores sociais como: perda da produtividade, diminuição da qualidade de vida, entre outros (BAHIA, 2014).

2.5 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (DHGNA)

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é caracterizada pelo depósito de lipídeos nos hepatócitos de indivíduos que não consomem álcool, podendo evoluir para esteatohepatite não alcoólica (NASH), fibrose, cirrose e, em casos mais graves, carcinoma hepatocelular, além de aumentar o risco de doenças metabólicas (BRUNT et al., 2011; MCPHERSON et al., 2015; YANG et al., 2016). A DHGNA é prevalente em todo o mundo e é uma parte da síndrome metabólica, na obesidade 80% dos indivíduos obesos podem apresentar a DHGNA, além dos indivíduos que são afetados pela hiperlipidemia e diabetes. (YOUNOSSI et al., 2016).

Estima-se que cerca de 40 a 50% da população com peso normal, sejam portadores de DHGNA, razão essa que vem tornando a doença do fígado da atualidade. Ocorrendo em qualquer idade, sem predomínio de sexo, diferente da esteatose causada por consumo de álcool, onde a prevalência é maior no sexo masculino, sendo relacionada a diversos fatores de risco. Dados do ministério da saúde adverte que cerca de 60% da população com excesso de peso, apresenta a DHGNA (BRASIL, 2013).

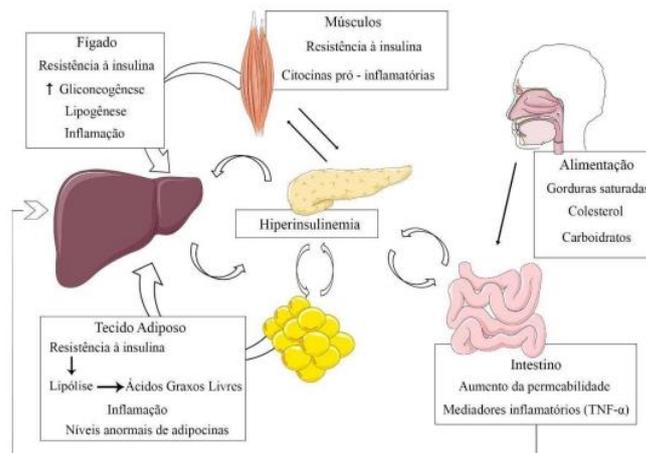
Sabe-se que a DHGNA envolve uma complexa interação entre múltiplos fatores ainda não completamente elucidada. Dentre esses fatores, destacam-se a resistência à insulina, acúmulo de lipídeos nos hepatócitos, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (CARR; ORANU; KHUNGAR, 2016). A contribuição do padrão dietético para o desenvolvimento da doença é considerável, além de outros fatores como: gravidez, sedentarismo, perda ou ganho

de peso de forma muito acelerada e inflamações crônicas no fígado. É comum que os pacientes com DHGNA, apresentem um elevado consumo de gorduras saturadas, carboidratos e menores teores de ácidos graxos poli-insaturados, fibras e antioxidantes (PIMENTEL; LAI, 2016).

O excesso de depósito de lipídeos em mais de 5% dos hepatócitos, é considerado o episódio que desencadeia a doença. Esse acúmulo acontece através de alguns mecanismos principais: lipólise excessiva de depósitos de gordura superficial e visceral, aumento da síntese hepática, comprometimento da beta oxidação de ácidos graxos, secreção reduzida de VLDL e aumento da ingesta dietética. O excesso de carboidratos, a partir de fontes alimentares ou de gliconeogênese, também estimula a síntese hepática de ácidos graxos. (PIMENTEL; LAI, 2016; BASARANOGLU; ORMECI, 2014).

O aumento da deposição lipídica induz, eventualmente, a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), dando origem ao estresse oxidativo. Esse aumento da produção de ROS, provoca peroxidação lipídica, cujos produtos intermediários, como malondialdeído e 4-hidroxinonenal, são agentes pró-inflamatórios e ativam fibroblastos, favorecendo a fibrogênese. Assim, estresse oxidativo induz inflamação e fibrose, responsáveis pela evolução das lesões hepáticas (BASARANOGLU; ORMECI, 2014; KATSIKI; MIKHAILIDIS; MANTZOROS, 2016; ROLO; TEODORO; PALMEIRA, 2012). A figura 3 ilustra a patogênese da DHGNA.

Figura 3 - Patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica.



Fonte: Adaptado de Carr; Oranu; Khungar (2016).

A DHGNA não apresenta sinais clínicos ou sintomas de doença hepática, embora muitos pacientes relatem fadiga. O diagnóstico de DHGNA, classificação e estadiamento é histológico, porém a biópsia do fígado é um procedimento invasivo e não realizado inicialmente. A hepatomegalia leve ou moderada é um dos sinais mais frequentes. A avaliação dos parâmetros

bioquímicos se torna eficaz e geralmente apresentam hiperlipidemia, hiperglicemia, hiperinsulinemia, menor sensibilidade à insulina. Além disso, as concentrações séricas das enzimas aspartato amino transferas (AST), alanina amino transferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gamma-glutamil transferase (GGT) encontram-se aumentadas. Geralmente, a relação AST/ALT é < 1 , mas a inversão dessa relação para AST/ALT > 1 pode sugerir progressão da DHGNA para cirrose (BASARANOGLU; ORMECI, 2014; CHARATCHAROENWITTHAYA; LINDOR; ANGULO, 2012). Os pacientes com DHGNA podem, ainda, apresentar o espectro completo de anormalidades histopatológicas da doença, variando de esteatose benigna à cirrose, e níveis séricos normais de aminotransferases, acompanhados da elevação em 1,5 vezes nas concentrações de fosfatase alcalina (BASARANOGLU; ORMECI, 2014; NEUMAN; COHEN; NANAU, 2014). Já foi demonstrado também que os níveis séricos de ALT flutuam durante o curso da doença (CHARATCHAROENWITTHAYA; LINDOR; ANGULO, 2012).

O teste mais utilizado para demonstrar a esteatose hepática é a ultrassonografia abdominal. Apresenta uma sensibilidade aproximada em 93%, alta o suficiente para diagnosticar um fígado com mais de 33% de esteatose. Tomografia também pode ser usada para diagnóstico de DHGNA demonstrando 82% de sensibilidade e 100% de especificidade para detectar esteatose acima de 30%. Com relação as transaminases, a ALT tem uma relação causal mais forte com DHGNA do que a AST (OH et al., 2016).

O estilo de vida do indivíduo portador da DHGNA, baseada em hábitos saudáveis, dietas equilibradas e atividade física regular tem sido levada em conta como o tratamento mais eficaz desses pacientes. O controle de fatores metabólicos, como a diabetes, dislipidemias e a própria obesidade são recomendados, utilizando como coadjuvante e quando necessário medicamentos no tratamento específico de cada condição metabólica a cima citada. Deve-se levar em consideração que a redução deve ser ponderal, haja visto que a perda de peso acelerada pode produzir efeitos reversos, levando a uma maior agressão hepática. Os exercícios físicos parecem modificar a estrutura dos músculos esqueléticos e reduzir assim a insulina. Entretanto, estima-se que apenas um terço dos pacientes conseguem redução somente com exercícios. Medicamentos antioxidantes, como a Vitamina E, N acetilcisteína, S adenosil-metionina e alguns suplementos dietéticos ou probióticos também tem sido utilizado no tratamento de DHGNA. Drogas usadas para tratamento de diabetes, como a metformina, pioglitazona e rosiglitazona, têm sido utilizadas nos pacientes com níveis elevados de glicemia, além do

Orlistat (Xenical) que não atua na esteatose hepática, mas auxilia no controle do peso corporal (COTRIM, 2006).

2.6 TRATAMENTO DA OBESIDADE

Sabendo que a redução do peso corporal e da obesidade que é uma das principais causas da DHGNA, o tratamento utilizado na obesidade pode ajudar a tratar a esteatose hepática não alcoólica, e que a obesidade pode ser tratada por diversos meios, entre eles os não farmacológicos, os farmacológicos e de forma cirúrgica. O tratamento deve objetivar a melhoria do bem-estar e da saúde metabólica do indivíduo. Os meios terapêuticos disponíveis para o tratamento da obesidade englobam as mudanças do estilo de vida, com reeducação alimentar e atividade física regular, somando ao apoio medicamentoso de fármacos e pode ser indicada a cirurgia bariátrica (FORTES et al, 2006; HAFEEZ e AHMED; PADWAL et al., 2013; SARKHOSH et al., 2017).

Estudos vêm demonstrando que o sucesso do tratamento está associado a perdas ponderais de 5% a 10%. Tal emagrecimento tende a melhorar significativamente os níveis de pressão arterial, número de apneias durante o sono e o controle de dislipidemias e do diabetes. (WANNMACHER; SALZANO; CORDÁS, 2004; FORTES et al, 2006).

2.6.1 Tratamento não farmacológico da obesidade

O tratamento nutricional recomendado vai além das dietas tradicionais, que frequentemente fracassavam em manter a perda de peso; está baseado principalmente em um planejamento de reeducação alimentar, ao mesmo tempo em que enfatiza a importância da atividade física. Além disso, tendo em vista fatores cognitivos e emocionais associados ao aumento do consumo de alimentos, as técnicas de terapia cognitivo comportamental foram consideravelmente aperfeiçoadas, contribuindo de forma efetiva para a mudança dos hábitos de vida do paciente obeso (ABESO, 2010).

É importante ressaltar que mesmo com mudanças de hábitos alimentares e estilo de vida sedentária, cerca de 2% dos pacientes não conseguem os resultados desejados somente com estas mudanças, este fato é justificado pela presença de influências endógenas (GAGLIARDI, 2001).

2.6.2 Tratamento farmacológico da obesidade

O tratamento da obesidade pode ser feito também com auxílio farmacológico e é indicado quando o tratamento não farmacológico não for o suficiente em pacientes com IMC igual ou superior a 30kg/m²; com IMC igual ou superior a 25 kg/m² associado a fatores de risco, como a hipertensão arterial, DM tipo 2 (Diabetes Mellitus), entre outras (WHO, 1998; FORTES et al., 2006; KHAN et al., 2012; ABESO, 2016).

Os medicamentos comumente utilizados no tratamento da obesidade são os anorexígenos, os inibidores da lipase pancreática e os inibidores da recaptção de serotonina e norepinefrina, entre outros (WANNMACHER, 2004).

A utilidade do tratamento medicamentoso para o tratamento da obesidade deve seguir algumas características: demonstrar efeito em reduzir o peso corporal e levar a melhora de doenças que tem alicerce no excesso de peso, ter efeitos colaterais toleráveis e/ou transitórios, não ter propriedades de adição, apresentar eficácia e segurança mantidas a longo prazo, possuir mecanismo de ação conhecido, idealmente ter um custo razoável. (GUY-GRAND, 1989).

A sibutramina é um inibidor da recaptção da serotonina e da noradrenalina nas terminações nervosas do SNC, e esta ação tem efeitos anorexígenos. É eficaz em melhorar parâmetros da síndrome metabólica, como glicemia de jejum, triglicérides e HDLc. Os pacientes diabéticos também se beneficiam com o uso da medicação. Em pacientes hipertensos, sua administração deve ser acompanhada com controles constantes dos níveis pressóricos e da frequência cardíaca, portanto, é contraindicada em pacientes com história de doença cardiovascular, incluindo doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral ou ataque isquêmico transitório, arritmia cardíaca, insuficiência cardíaca congestiva, doença arterial periférica ou hipertensão não controlada (acima de 145/90 mmHg) (ABESO, 2016).

O orlistate tem ação intestinal, age inibindo lipases pancreáticas, reduzindo em 30% a absorção das gorduras ingeridas, que são eliminadas com a excreção fecal. Menos do que 1% do medicamento é absorvido e não há ação em SNC. É um medicamento seguro para o tratamento da obesidade, sobrepeso e síndrome metabólica. A medicação não deve ser utilizada em pacientes com síndrome de má absorção crônica, colestase, ou em pacientes em uso de amiodarona, varfarina ou ciclosporina. Pode ser utilizado em associação com a sibutramina. Qualquer associação entre medicações antiobesidade com ação central está contraindicada, sendo esta prática vedada pelo Conselho Federal de Medicina (ABESO, 2016).

De forma indireta quanto ao tratamento da obesidade, temos alguns inibidores seletivos da recaptção de serotonina como a fluoxetina e sertralina, usados para o tratamento da depressão, esses podem proporcionar efeito de perda de peso, embora não tenham indicação formal no tratamento de obesidade (ABESO, 2016).

2.6.3 Naltrexona/bupropiona em associação para o tratamento da obesidade

Naltrexona é um antagonista de receptor opioide μ , utilizado no tratamento de dependentes em opiáceos e álcool. A bupropiona, por sua vez é um inibidor da dopamina (DA) e noradrenalina (NA), utilizado para o tratamento de depressão e também auxiliando na cessação tabágica (FARIA et al., 2010; POWELL et al., 2011).

A FDA (*Food and Drug Administration*) indica a naltrexona/bupropiona como adjuvante a dieta hipocalórica e aumento de atividade física para o controle de peso crônico em adultos obesos (IMC de 30 kg / m² ou maior) ou em indivíduos com sobrepeso (IMC de 27 kg / m² ou maior) com pelo menos uma condição de comorbidade relacionada ao peso, como hipertensão, diabetes tipo 2 ou dislipidemia e é comercializada com o nome de Contrave® fabricado pela Orexigen (Illinois, 2014)

A associação Naltrexona/Bupropiona não tem um mecanismo de ação totalmente compreendido ainda. No entanto, a partir de dados de estudos pré-clínicos, acredita-se que a combinação funcione sinergicamente no hipotálamo e no circuito de dopamina mesolímbica para promover a saciedade, reduzir a ingestão de alimentos e consequentemente aumentar o gasto energético (SHERMAN et al, 2016).

A bupropiona, aumenta a produção de células POMC e a liberação de alfa-MSH e beta-endorfina *in vitro*. A naltrexona, um antagonista opióide, bloqueia o MOP-R (receptor μ opioide), interrompendo, assim, o feedback inibitório da beta-endorfina nas células POMC. A combinação naltrexona/bupropiona aumenta o efeito da sinalização da POMC mais do que qualquer outra droga isolada (Greenway et al., 2009; Billes et al., 2011).

As células da pró-opiomelanocortina (POMC) encontradas no núcleo arqueado do hipotálamo produzem hormônio estimulador de melanócito (alfa-MSH) e beta-endorfina, um opióide endógeno. O alfa-MSH ativa o receptor de melanocortina-4 (MC4R), levando à diminuição da ingestão de alimentos, aumento do gasto de energia e perda de peso, beta-

endorfina reduz a atividade das células POMC pela ligação ao MOP-R (Liotta et al., 1984; Brady et al., 1990; Fan et al., 2005; Cone et al., 2006; Pennock et al., 2011)

Além disso, um estudo pré-clínico em ratos mostrou que a injeção direta de naltrexona e bupropiona na área tegumentar ventral do circuito mesolímbico produziu uma redução na ingestão de alimentos. Esta redução foi notavelmente maior do que a redução observada com o agente isolado, sugerindo que essas drogas têm ações independentes, porém sinérgicas, no circuito de dopamina mesolímbica (Sinnayah et al., 2007).

Após 12 semanas de tratamento com naltrexona/bupropiona, o paciente deve ter atingido pelo menos uma perda de peso de 5% desde o início da terapêutica. Se este resultado não for atingido dentro de 12 semanas, a NAL/BUP (Naltrexona/Bupropiona) deve ser descontinuada porque é improvável que o paciente obtenha benefícios com a mesma (Illinois. 2014).

A associação NAL/BUP ainda não foi avaliada em pacientes com insuficiência renal ou hepática. As recomendações de dosagem do fabricante são baseadas em dados para naltrexona e bupropiona individualmente e é aconselhado o monitoramento desses pacientes. Além disso a associação pode apresentar efeitos colaterais como, náusea, prisão de ventre, dor de cabeça, vômito, insônia, etc (Illinois. 2014).

Em 2011, a FDA se recusou a aprovar o Contrave devido a preocupações com o perfil de segurança cardiovascular de longo prazo (Pollack. 2011). Todavia, em 2014 sendo comercializada com o nome de Contrave ® fabricado pela Orexigen, a associação entre bupropiona e naltrexona, foi aprovada depois de 3 fases de estudos clínicos que demonstraram sua segurança e eficácia, para o tratamento da obesidade (FDA, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação da associação Bupropiona/Naltrexona sobre os aspectos bioquímicos, histomorfométricos e histológicos em ratos *wistar* obesos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da combinação Bupropiona/Naltrexona em animais normnutridos e obesos sobre:

- Peso corporal;
- Índice de LEE;
- Índice de Massa Corpora;
- Perfil bioquímico e hematológico
- Análise histomorfométrica dos fígados dos animais experimentais, após o período de tratamento com a associação Bupropiona/Naltrexona;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo, ratos da linhagem Ratos *Wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Após o desmame os animais foram submetidos à dieta padrão de laboratório. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em condições padrão de biotério seguindo recomendação ética do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Os procedimentos foram aprovados de acordo com a Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA) do Centro de Biociências (CB) da UFPE (nº 23076.053208/2014-57) (Anexo A).

4.2 OBTENÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os grupos experimentais foram formados por 20 filhotes machos (Figura 4):

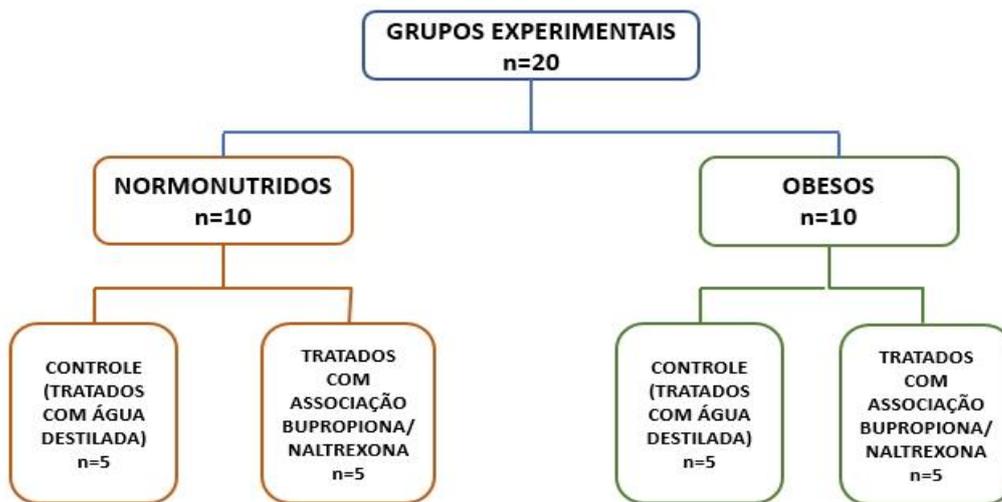
- **Grupo dieta padrão:** constituído de 10 filhotes machos que após o desmame foram alimentados com ração padrão de biotério (Presence®);
- **Grupo dieta de indução a obesidade:** constituído de 10 filhotes machos que após o desmame foram alimentados com ração palatável (dieta de indução a obesidade).

Dos grupos dieta padrão e dieta de indução a obesidade foram formados os seguintes subgrupos:

- **NST:** constituído de 5 filhotes machos que após o desmame foram alimentados com ração padrão de biotério e submetidos ao tratamento com aplicação de 1ml/kg de água destilada por via subcutânea dorsal.
- **NCT:** constituído de 5 filhotes machos que após o desmame foram alimentados com ração padrão de biotério e submetidos ao tratamento com aplicação diária de naltrexona/bupropiona na dose combinada de 1mg/20mg/kg (Sigma-Aldrich® Toronto), por via subcutânea dorsal.

- **OST:** constituído de 5 filhotes machos que após o desmame foram alimentados com dieta de indução a obesidade e submetidos ao tratamento com administração de 1ml/kg de água destilada por via subcutânea dorsal.
- **OCT:** constituído de 5 filhotes machos que após o desmame foram alimentados com dieta de indução a obesidade e submetidos ao tratamento com aplicação diária de naltrexona/bupropiona na dose combinada de 1mg/20mg/kg (Sigma-Aldrich® Toronto), por via subcutânea dorsal.

Figura 4 - Organograma demonstrando a formação dos grupos experimentais. Grupo normonutrido: (dieta padrão Presence®); Grupo obeso: (dieta de indução a obesidade). Os animais dos grupos normonutrido não tratado e obeso não tratado receberam administração de 1ml/kg.



Fonte: O autor, (2019)

4.3 DIETAS EXPERIMENTAIS

A ração padrão foi fornecida *ad libitum*, todos os dias ao grupo normonutrido, e consistiu de ração comercial Presence® desenvolvida para ratos e camundongos de laboratório (Agribands Purina do Brasil, LTDA) com fornecimento calórico de 3,3 kcal/g. (Informações fornecidas pelo fabricante), conforme a tabela 2.

Tabela 2 - Informações da composição centesimal da ração comercial para ratos e camundongos de laboratório foram obtidas no rótulo do produto fornecido pela empresa Evialis Presence® Ração Animal, 2017 e são baseadas em recomendações do National Research Council e National Institute of Health – USA.

Componentes	(g/100%)	(%/Kcal)
Proteína	24,30	29,0
Carboidratos	56,00	62,0
Lipídios	3,20	9,0
Fibras	5,00	0,0
VET (kcal/g)	3,30	3,30

A ração palatável (dieta de indução a obesidade) fornecida aos animais com objetivo de induzir obesidade para formação do grupo experimental obeso foi baseada em Calvalcante et al (2013) e para produção, foram utilizados ingredientes purificados/semipurificados industrializados (Laboratório Rhoster Indústria e Comércio) e alimentos naturais, e foi preparada no Departamento de Nutrição da UFPE, para as fases de crescimento e manutenção dos ratos conforme a fase do ciclo da vida do rato., com fornecimento calórico de 4,0 kcal/g. Estes ingredientes foram moídos, misturados e oferecidos na forma de pellets aos animais experimentais (Tabela 3).

Tabela 3 - Ingredientes da dieta de indução a obesidade utilizada nos experimentos

Componentes	Crescimento (g/kg)	Manutenção (g/kg)
Maisena	117,00	157,00
Ração padrão	80,00	80,00
Biscoito Maisena Chocolate	50,00	50,00
Farinha de Soja	40,00	40,00
Caseína	200,00	150,00
Celulose	40,00	40,00
Óleo de Milho	10,00	15,00
Óleo de Soja	20,00	25,00
Banha (Banha Sadia)	53,00	53,00

Manteiga	40,00	40,00
Margarina (85% de lipídeos)	40,00	40,00
Creme de Leite (20% de lipídeos)	40,00	40,00
Açúcar	220,00	220,00
Mix Mineral	25,00	25,00
Mix Vitamínico	7,00	7,00
Colina	2,50	2,50
Metionina	2,50	2,50
BHT = 0,14mg	0,14	0,14
NaCl (39,34%)	3,00	3,00
Grutamato Monossódico (12,3% de Na)	10,00	10,00
TOTAL	1000,14	1000,14

Dieta palatável hiperlipídica (dieta de indução a obesidade) previamente descrita e padronizada por Estadella *et al* (2004), utilizada por Santos *et al*, (2010) e analisada por Oliveira *et al* (2011) e modificada por Cavalcante *et al* (2013).

O conteúdo energético da dieta de indução a obesidade, foi determinado em um calorímetro adiabático IKA-C400 no Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos/Universidade Federal de Pernambuco (LEAAL/UFPE) (Tabela 4).

Tabela 4 - Composição de macronutrientes segundo o Valor Energético Total (VET) da dieta de indução a obesidade de Crescimento e Manutenção oferecida aos animais experimentais

Componentes	Crescimento		Manutenção	
	(g/100%)	(%/Kcal)	(g/100%)	(%/Kcal)
Proteína	18,00	18,00	14,00	14,00
Carboidratos	44,00	44,00	47,00	47,00
Lipídios	17,20	38,0	18,00	39,0
Fibras	5,20	0,0	5,20	0,0
VET (kcal/g)	4,03	4,03	4,06	4,06

Análises realizadas no Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos/Universidade Federal de Pernambuco (LEAAL/UFPE) com base nas informações fornecidas pelo fabricante

dos ingredientes da dieta de indução a obesidade para Crescimento (Rhooster indústria e Comércio 2017).

4.4 EXPERIMENTOS

4.4.1 Análise da evolução ponderal

O peso corporal dos animais foi verificado no 21º dia pós-natal (desmame) e logo após o período de adaptação ao ambiente e a dieta (8 dias), passou a ser verificado duas vezes por semana até completar o período de 77 dias de ingestão das dietas experimentais pelos grupos normonutrido e obeso e conseqüentemente 106 dias de vida. Após o período de 77 dias de ingestão das dietas, deu-se início ao tratamento farmacológico, e o peso dos animais passou a ser verificado diariamente até completar 14 dias do tratamento, ou seja, até o 121º dia de vida dos animais.

Para as medidas foi utilizada balança eletrônica com capacidade para 4 Kg e sensibilidade 0,1g (Marte, modelo S-4000®).

4.4.2 Análise do consumo alimentar antes do tratamento pelo uso combinado de NAL/BUP

A análise do consumo alimentar antes do tratamento farmacológico foi realizada do 29º ao 106º dia de vida (11 semanas). Neste período os animais foram alojados em gaiolas com no máximo 3 animais e formaram dois grupos experimentais: **normonutrido** (n=10) que receberam ração comercial padrão de biotério Presence® e **obeso** (n=10) que receberam dieta de indução a obesidade. A quantidade de alimento ingerido foi obtida diariamente, no período da fase escura do ciclo invertido de 12/12 horas (claro/escuro). O alimento foi removido e pesado para obtenção do consumo por diferença entre a quantidade oferecida e a rejeitada. Para a pesagem foi utilizada balança eletrônica com capacidade para 4 Kg e sensibilidade 0,1g (Marte, modelo S-4000®).

4.4.3 Análise do consumo alimentar durante o tratamento pelo uso combinado de NAL/BUP

A análise da ingestão alimentar durante o período do tratamento farmacológico foi realizada do 107° ao 121° dia de vida. Neste período os animais dos grupos normonutrido (n=10) e obeso (n=10) foram alojados em gaiolas individuais e formaram quatro subgrupos (Figura 4): normonutrido sem tratamento (NST) (n=5) que receberam ração comercial padrão de biotério Presence® e aplicação diária de injeção subcutânea de água destilada na dose de 1ml/kg; normonutrido com tratamento (NCT) (n=5) que receberam ração comercial padrão de biotério Presence® e aplicação diária de injeção subcutânea de naltrexona/bupropiona na dose combinada de 1mg/20mg/kg (Sigma-Aldrich® Toronto); obeso sem tratamento (OST) (n=5) que receberam ração dieta de indução a obesidade e aplicação diária de injeção subcutânea de água destilada na dose de 1ml/kg; obeso com tratamento (OCT) (n=5) que receberam dieta de indução a obesidade e aplicação diária de injeção subcutânea de NAL 1mg/kg e BUP 20mg/kg (Sigma-Aldrich® Toronto). A quantidade de alimento ingerido foi obtida diariamente, no período da fase escura do ciclo invertido de 12/12 horas (claro/escuro). O alimento foi removido e pesado para obtenção do consumo por diferença entre a quantidade oferecida e a rejeitada. Para a pesagem, foi utilizada balança eletrônica com capacidade para 4 Kg e sensibilidade 0,1g (Marte, modelo S-4000).

4.4.4 Índice de Lee

O índice de obesidade para roedores (Lee Index) foi calculado através do comprimento naso-anal e o peso corporal, onde: Índice de Lee = (raiz cúbica ($3\sqrt{\text{ }}$) do peso corporal (g) /comprimento naso-anal (cm) x 1000) (adaptado BERNARDIS e PATTERSON, 1968). Essas medidas foram realizadas antes do início e depois do término do tratamento farmacológico, ou seja, primeira ao 100° dia de vida (após início do consumo das dietas) a segunda feita após 121° dia de vida (após término do tratamento farmacológico) e antes da eutanásia dos animais. Foi utilizado papel milimetrado para registro do comprimento naso-anal e fita métrica antropométrica (inextensível) para medidas perimétricas.

4.4.5 Índice de massa corporal (IMC)

Índice de adiposidade muito usado em ratos e que guarda relação positiva com o índice de Lee (NERY et al., 2011). Foi determinado através da relação entre peso corporal (g) e o quadrado do comprimento nasoanal (cm²) (NOVELLI et al., 2007).

4.5 ESTUDOS

4.5.1 Análise de Parâmetros Metabólicos: Níveis de Glicose capilar

A coleta de amostras sanguíneas foi realizada com os animais dos diferentes grupos experimentais antes do início do tratamento e após o término do tratamento farmacológico. Amostra (aproximadamente 2µL) de sangue foi obtida na extremidade da cauda do animal e depositado numa fita teste (Roche Diagnostics®). Os níveis de glicose foram determinados usando um glicosímetro automático (Accutrend GCT, Roche Diagnostics®) (LAGE, GUERRA, PELOGIA, 2014).

4.5.2 Coleta de amostras para realização de estudos

Ao 122º dia de vida, os animais dos dois grupos experimentais foram eutanasiados. Os ratos foram previamente pesados e anestesiados com Isoflurano por via inalatória e eutanasiados, e os fígados foram retirados. O sangue foi acondicionado em tubos Vacutainer® sem anticoagulante para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos e em tubos contendo EDTA, para avaliação hematológica.

4.5.3 Análise dos parâmetros bioquímicos

As análises bioquímicas foram realizadas em amostras séricas usando um analisador automatizado para bioquímica clínica CMD 800iX1 (Wiener Lab Group). O soro foi obtido por centrifugação do sangue em microtubos contendo acelerador de coagulação e sem

anticoagulantes, a 3500 rpm por 5 minutos. Kits de diagnóstico padronizados (Labtest®) foram utilizados para as avaliações espectrofotométricas dos seguintes parâmetros bioquímicos: Lipase, Fosfatase alcalina (ALP), Creatinina, Ureia, Ácido úrico, Alanina transaminase (ALT), Aspartato transaminase (AST), Albumina, Glicose, Proteínas totais, Triglicerídeos, Colesterol total, Colesterol HDL e Gama GT (BRANCO et al., 2011).

4.5.4 Análise dos parâmetros hematológicos

As análises hematológicas foram realizadas em amostras de sangue total coletado em tubos contendo EDTA, utilizando um analisador automatizado hematológico Sysmex XT-4000i (Roche®). Foram avaliados os seguintes parâmetros: Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$); Hemoglobina (g/dL); Hematócrito (%); volume corpuscular médio - fL (VCM), hemoglobina corpuscular média - pg (CHM), concentração da hemoglobina corpuscular média - g/dL (CHCM), Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$); Neutrófilos (%); Linfócitos (%); Monócitos (%); Eosinófilos (%); Basófilos%. MPV (%), RDW (%), RBC (%) (BRANCO et al., 2011).

4.5.5 Análise histológica, morfométrica e estereológica dos fígados

Os fígados foram fixados em formol a 10% por 24 horas, após esse período, o lobo médio foi separado dos demais e selecionados e parâmetros morfométricos foram analisados. Houve pesagem do lobo médio hepático, sendo utilizado para essa medida balança digital da marca Kmach®, com capacidade máxima 700g e mínima 1g. para aferição do peso foi analisado o comprimento e para medir o comprimento foi utilizado um paquímetro da marca Lee Tools® (Figura 5B). Posteriormente, o lobo foi seccionado transversalmente em várias fatias que mediam 2mm cada (Figura 5C). Sendo desprezado sempre a primeira fatia de cada lobo, após esta etapa foi aplicado uma fração de $\frac{1}{2}$ para seleção das fatias a serem estudadas (Figura 5D). Após as etapas de secção, as fatias foram selecionadas e fotografadas e as fotos foram inseridas ao programa imageJ (versão 1.3.4.67) para que através do princípio de Cavalieri, fosse obtida a quantificação estereológica de volume, que consiste em um sistema de teste quadrático para cálculo de volumes e áreas. Sendo este princípio empregado nos cortes macroscópicos, dispostos em fatias transversais utilizando-se a seguinte fórmula: $V = \sum P \times (a/p) \times t$. Onde, $\sum P$

corresponde ao somatório de pontos do sistema teste que tocam a estrutura desejada (área seccional de qualquer órgão), (a/p) é a área associada a cada ponto do sistema teste, e t é a espessura de cada fatia (GARAVELLO, 2013).

Em seguida cada fatia foi seccionada em 6 fragmentos (Figura 5E) e todos os fragmentos foram colocados em uma superfície plana do menor para o maior fragmento e deste para o menor novamente em formato de “U” (Figuras 5F e 5G), onde uma fração de $\frac{1}{3}$ foi aplicada, em seguida, fragmentos selecionados foram analisados.

Entre 10 e 12 fragmentos foram selecionados e inseridos em cassetes histológicos e dispostos para processamento em um aparelho Histotécnico automatizado OMA modelo CM 69 (Figura 5J), onde o material foi submetido a uma série de graduação de etanol à 70%, 80%, 90% e três sequências de etanol a 100%, por sessenta minutos, duas sequências de xilol por sessenta minutos em cada, e duas sequências de parafina aquecida a 56°C por sessenta minutos cada. Após este processo, o material foi emblocado em parafina.

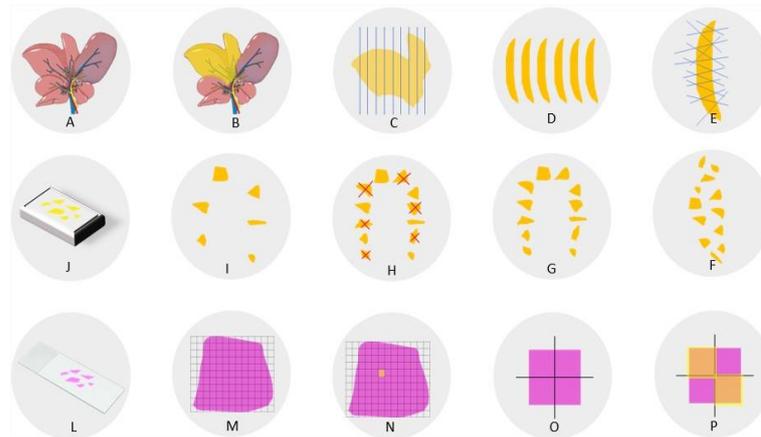
Para a realização dos cortes na espessura de 5µm foi utilizado o micrótomo marca Leitz modelo 1512. Para a observação dos aspectos histomorfológicos, os fígados foram corados com hematoxilina-eosina (Figura 5L). O preparo das lâminas obedeceu aos seguintes passos: os cortes foram desparafinizados em duas passagens pelo xilol (5 minutos cada), hidratados em duas passagens por álcool 100%, seguidos por álcool 90% por 3 minutos cada, lavados em água por 5 minutos e corados por 2 minutos com hematoxilina de Harris (responsável pela coloração do núcleo da célula). Em seguida foram lavados novamente com água corrente por 5 minutos e corados pela eosina (responsável pela coloração do citoplasma e tecido conjuntivo) por 1 minuto; na sequência desidratados na bateria de desidratação por duas vezes de 3 minutos cada, passando por sequência de álcool sendo 70%, 80%, 90%, 100%, após foram lavados com xilol 2 vezes de 3 minutos cada, secados e montados com lamínula de vidro.

Posteriormente, as amostras foram analisadas por um patologista. Das lâminas obtidas, foram selecionados cinco campos através de uma randomização e fotografados pela câmera (Moticam 1000 1.3 MP) acoplada ao microscópio da marca Labomed por meio de um *software* Motic Image Plus 2.0, disponível no Laboratório de Microscopia do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco. Cada campo estava sobreposto a uma grade transparente com quadrados de 1mm² (Figura 4M). Através de uma nova randomização foi selecionado apenas um quadrado por cada campo (Figura 4N). Esse quadrado foi dividido em quatro quadrantes que foram fotografados na objetiva de 400x através

do software Motic Image Plus 2.0 (Figura 4O). Posteriormente foi aplicado uma nova fração de $\frac{1}{2}$ para a seleção de duas fotos por quadrado (Figura 4P). No total foram analisadas 300 fotos, 10 fotos de cada animal, dos 150 campos selecionados.

Através de parâmetros morfométricos foi quantificado o número de hepatócitos binucleados. Das lâminas de cada animal foram realizadas fotomicrografias de 5 campos como descrito anteriormente, totalizando 25 campos fotomicrografatos para cada grupo.

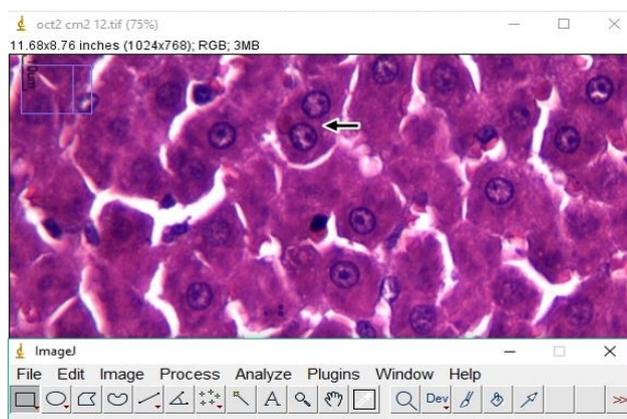
Figura 1 - Etapas da análise morfométrica e da análise histológica do tecido hepático do lobo médio hepático de ratos Wistar normonutridos e obesos, com e sem tratamento com a associação NAL/BUP.



Fonte: O autor, (2019)

Para a contagem numérica de hepatócitos binucleados, foi utilizado o programa ImageJ (versão 1.3.4.67) de forma semi-automática, utilizando o plugin para contagem do programa (Figura 4).

Figura 2 - Demonstração do uso do ImageJ (versão 1.3.4.67) para a contagem de hepatócitos binucleados no lobo médio hepático de ratos Wistar. Animais normonutridos e obesos, com e sem tratamento com a associação NAL/BUP.

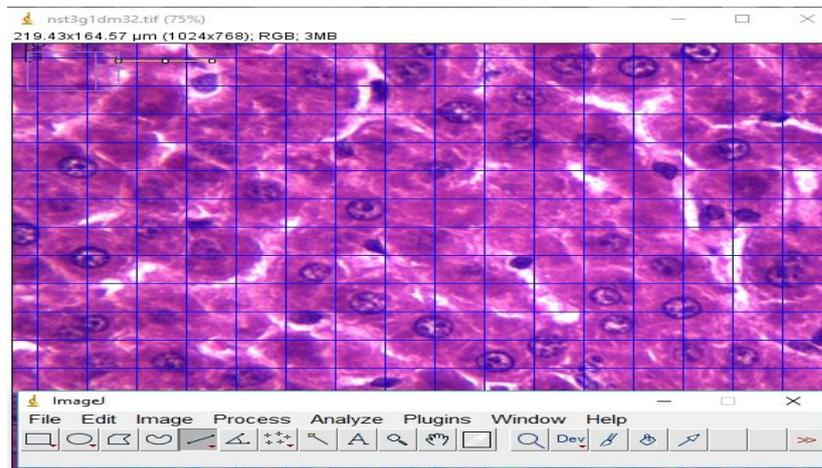


Fonte: O autor, (2019)

Foi investigado por meio dos parâmetros estereológicos a Densidade de Volume (V_v) dos componentes hepáticos: núcleo dos hepatócitos e sinusóides. Onde foram fotomicrografados 5 campos por animal, com aumento de 400x, totalizando 25 campos por grupo. Assim, determinou-se a ocupação relativa da área-teste pela área de imagens da estrutura estudada já que a lei básica da estereologia é de que a quantidade relativa de pontos que tocam a estrutura (LACERDA, 2000). A Densidade de Volume (V_v) foi calculada de acordo com a fórmula: $V_v[\text{estrutura}] = \frac{P[\text{estrutura}]}{P_T}$, em que $P[\text{estrutura}]$ é o número de pontos que cruzam a estrutura testada e P_T o número total de pontos-teste do sistema-teste. O $V_v[\text{estrutura}]$ pode ser multiplicado por 100 para expressar o resultado em percentagem (LACERDA, 2000).

Para a análise foi utilizado um sistema-teste de 352 pontos disponível no programa ImageJ (versão 1.3.4.67). Os pontos foram sobrepostos às imagens (Figura 7) e pela contagem de pontos foi possível determinar a Densidade de volume (V_v) das estruturas. Os dados foram organizados em planilhas e depois submetidos à análise estatística.

Figura 3 - Demonstração do uso do ImageJ (versão 1.3.4.67) para a determinação da Densidade de Volume (Vv) do lobo médio hepático em ratos obesos e normonutridos, com e sem tratamento com a associação NAL/BUP.



Fonte: O autor, (2019)

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estatísticas, foi utilizado no peso corporal índice de Lee, IMC, glicose capilar e demais testes ANOVA de duas vias, seguido por Bonferroni pós-teste. O nível de significância foi considerado p igual ou menor que 0,05. Todos os dados foram analisados usando o programa GraphPad PRISM[®] versão 6,0 (California, USA).

5 RESULTADOS (Artigo original que será submetido a Obesity – quails B2 na área Medicina II)

ASSOCIAÇÃO NALTREXONA/BUPROPIONA REDUZ PESO CORPORAL E ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS OBESOS

NALTREXONE/BUPROPIONA ASSOCIATION REDUCES BODY WEIGHT AND HEPATIC STEATOSIS IN OBESE RATS

Resumo

Objetivo: Avaliar a ação da associação Bupropiona/Naltrexona sobre o peso, aspectos bioquímicos e histomorfométricos em ratos *wistar* obesos. **Método:** Foram utilizados ratos da linhagem *wistar* divididos em dois grupos de acordo com a dieta oferecida: n=10 normonutrido (dieta padrão de biotério) e n=10 obeso (dieta de indução a obesidade). Foram analisados: Peso corporal; Consumo alimentar; Índice de Lee; IMC; Perfil bioquímico e hematológico, Análise morfométrica e histológica dos fígados dos animais experimentais, após o período de tratamento com a associação Bupropiona/Naltrexona. **Resultados:** O uso combinado de NAL (1mg/kg) BUP (20mg/kg) promoveu em animais obesos, redução nas medidas da ingestão alimentar, do peso corporal, dos índices de Lee e IMC, redução do peso e comprimento do lobo médio hepático, aumentando o volume do lobo médio hepático, reduzindo a densidade de volume do núcleo de hepatócitos do lobo médio hepático, e aumentando índices bioquímicos da Fosfatase alcalina, AST e de plaquetas. **Conclusões:** Estes resultados indicam que o uso combinado de NAL/BUP promove redução do consumo de alimentos densamente energéticos o que contribui para a perda de peso, além de melhoria na glicemia, reduziu os índices de esteatose hepática e diminuiu as alterações morfométricas no tecido hepático.

Palavras-Chave: Obesidade. Naltrexona. Bupropiona. Estereologia. Histologia

Introdução

O aumento de indivíduos com excesso de peso significou uma mudança no perfil da população mundial adulta nas últimas décadas, mesmo sendo considerado um problema de países desenvolvidos, é possível observar um aumento do número de indivíduos com excesso de peso ou obesos em países subdesenvolvidos. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2016 foi estimado que cerca de 1,9 bilhões de adultos estavam com excesso de peso, e desses, mais de 650 milhões eram obesos [1].

Nos últimos 30 a 40 anos, em países ocidentais, ocorreram mudanças significativas em relação aos padrões alimentares, destacando-se o grande consumo de bebidas e alimento com alto teor calórico, sendo essas as principais causas da obesidade atual [2].

Outro componente responsável por esse aumento da obesidade é o sedentarismo, haja visto que com o avanço de diversas tecnologias, o sedentarismo tornou-se um fator determinante para o desenvolvimento da obesidade, devido ao favorecimento do menor gasto energético [3].

Com esses fatores ambientais presentes na sociedade, a prevalência da obesidade tem aumentado progressivamente ao longo dos últimos 30 anos. Só no Brasil, o último inquérito domiciliar realizado, constatou que mais da metade da população (cerca de 53,8%) adulta das capitais está com excesso de peso e quase 19% desta está clinicamente obesa [4].

Esses quadros apresentados se tornam cada vez mais preocupantes, pois a obesidade é um fator que predispõe outras doenças crônico-degenerativas, como a diabetes mellitus tipo II, doenças cardiovasculares, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), entre outras [5].

A DHGNA é definida como um acúmulo de gordura no fígado na ausência de ingestão de álcool [6]. Sendo descrita somente há 40 anos [7] e nos dias atuais a principal causa de doenças hepáticas em países desenvolvidos e em países subdesenvolvidos, como é o caso do Brasil, com estimativa entre 20% e 30% da população brasileira [8]. A ocorrência de DHGNA é fortemente associada a obesidade e conseqüentemente dislipidemias. Podendo advir de uma esteatose macrovesicular nos hepatócitos, para uma esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA – Presença de infiltrado inflamatório e possivelmente fibrose) podendo evoluir para uma completa fibrose ou uma cirrose e mais tarde para um carcinoma hepatocelular [9].

O tratamento da DHGNA é semelhante ao tratamento da obesidade e pode estar associado ao tratamento da obesidade, onde o foco está na mudança de hábitos, sejam eles alimentícios com baixo teor de carboidratos, e gordura em associação com a redução da sedentariedade, onde existe uma busca por atividades físicas [10]. Contribuindo assim para a manutenção de uma saudável distribuição da gordura corporal, cujo acúmulo, principalmente abdominal é um fator de risco para a esteatose hepática e outras doenças crônico-degenerativas associadas a gordura corporal em excesso [11].

Vale salientar que a mudança de hábitos no tratamento da DHGNA, bem como na obesidade pode se tornar um obstáculo para que o sucesso do mesmo seja garantido, com isso faz-se necessário a participação de uma equipe multiprofissional, incluindo: nutricionista,

medico endocrinologista, educador físico, psicólogo entre outros [12]. Além disso, uma abordagem farmacológica poderia auxiliar de forma significativa a terapêutica da doença, como acontece na Diabetes Mellitus tipo II. E não há nenhum fármaco, direcionado para o tratamento da DHGNA até o momento que tenha sido liberado pelos órgãos de regulamentação como a FDA (*Food and Drug Administration* – FDA, EUA). Porém diversos estudos clínicos tem avançado para que sejam validados fármacos para o tratamento direcionado da DHGNA [13; 14].

Estima-se que apenas um terço dos pacientes conseguem redução somente com exercícios. Medicamentos antioxidantes, como a Vitamina E, N acetilcisteína, S adenosil-metionina e alguns suplementos dietéticos ou probióticos também tem sido utilizado no tratamento de DHGNA [15].

Como o tratamento da DHGNA direto ainda não foi regulamentado pela falta de validação dos órgãos, e sabendo que o tratamento da obesidade é similar ao da DHGNA, medicamentos que são utilizados para a obesidade poderiam ser úteis para o tratamento da DHGNA, tendo como exemplo, a conhecida sibutramina e o orlistate que são medicamentos reconhecidos por diversas associações de validação de medicamentos, como agentes auxiliares na redução de medidas e possivelmente consequentes redutores de esteatose hepática[16].

A sibutramina é um inibidor da recaptção da serotonina e da noreadrenalina nas terminações nervosas do SNC, e esta ação tem efeitos anorexígenos e sacietógenos e orlistate que tem ação intestinal, age inibindo lípases pancreáticas, reduzindo em 30% a absorção das gorduras ingeridas, que são eliminadas com a excreção fecal. Menos do que 1% do medicamento é absorvido e não há ação em SNC [16].

A bupropiona, um inibidor fraco da recaptção de dopamina e norepinefrina, aumenta a produção de células da pró-opiomelanocortina (POMC) e a liberação de alfa-MSH e beta-endorfina *in vitro*. A naltrexona, um antagonista opióide, bloqueia o MOP-R, interrompendo, assim, o feedback inibitório da beta-endorfina nas células POMC. A combinação naltrexona/bupropiona aumenta o efeito da sinalização da POMC mais do que qualquer outra droga isolada [17; 18].

As células POMC's encontradas no núcleo arqueado do hipotálamo produzem hormônio estimulador de melanócito (alfa-MSH) e beta-endorfina, um opióide endógeno. O alfa-MSH ativa o receptor de melanocortina-4 (MC4R), levando à diminuição da ingestão de alimentos, aumento do gasto de energia e perda de peso, beta-endorfina reduz a atividade das células

POMC pela ligação ao receptor mu-opioide inibitório (MOP-R), levando a redução de medidas e sendo indicada para uso em indivíduos onde o IMC é igual ou superior a 30 kg / m² [19; 20; 21; 22; 23].

Sendo o o objetivo deste trabalho a avaliação da ação da associação Bupropiona/Naltrexona sobre o peso e medidas associadas a medidas corpóreas, aspectos bioquímicos, morfométricos e histológicos em Ratos *Wistar* obesos.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados ratos da linhagem *wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Após o desmame os animais foram submetidos à dieta padrão de biotério ou dieta de indução a obesidade conforme grupo experimental. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em condições padrão de biotério seguindo as recomendações éticas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório - SBCAL e das normas estabelecidas no *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* e todos os procedimentos foram aprovados de acordo com a Comissão de Ética de Uso Animal - CEUA da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE (nº 23076.053208/2014-57).

Peso corporal e consumo alimentar

O peso corporal dos animais foi verificado no 21º dia pós-natal (desmame) e logo após o período de adaptação ambiental e a dieta (experimental) que durou 8 dias, passou a ser verificado duas vezes por semana durante 77 dias após o início da ingestão das dietas experimentais pelos grupos normonutrido e obeso. Após este período, deu-se início ao tratamento farmacológico, e o peso dos animais passou a ser verificado diariamente pelo período de 14 dias, quando completaram 121 dias de vida.

O consumo alimentar diário, durante o tratamento, foi medido entre o 107º ao 121º dia de vida. Os animais dos grupos normonutrido (n=10) e obeso (n=10) foram alojados em gaiolas com no máximo 3 animais e formaram quatro subgrupos: normonutrido sem tratamento (NST) (n=5) que receberam ração comercial padrão de biotério Presence[®] e aplicação diária de injeção subcutânea de água destilada na dose de 1ml/kg; normonutrido com tratamento (NCT) (n=5) que receberam ração comercial padrão de biotério Presence[®] e aplicação diária de injeção subcutânea de NAL 1mg/kg e BUP 20mg/kg (Sigma-Aldrich[®] Toronto); obeso sem tratamento

(OST) (n=5) que receberam dieta de indução a obesidade e aplicação diária de injeção subcutânea de água destilada (1ml/kg); obeso com tratamento (OCT) (n=5) que receberam dieta de indução a obesidade e aplicação diária de injeção subcutânea de NAL 1mg/kg e BUP 20mg/kg (Sigma-Aldrich® Toronto). O consumo alimentar foi obtido durante todo o experimento para cada tipo de dieta oferecida de acordo com cada grupo experimental e verificado pela diferença entre a quantidade de alimento oferecido e o rejeitado. Para as medidas do peso corporal e do consumo alimentar foi utilizada balança eletrônica com capacidade para 4 Kg e sensibilidade 0,1g (Marte, modelo S-4000®).

Índice de Lee e índice de Massa Corporal (IMC)

O índice de obesidade para roedores (Lee Index) foi calculado através do comprimento nasoanal e o peso corporal, onde: Índice de Lee = (raiz cúbica ($3\sqrt{\text{ }}$) do peso corporal (g) /comprimento nasoanal (cm) x 1000) [25]. O IMC, Índice de Massa Corporal muito usado em ratos e que guarda relação positiva com o índice de Lee, foi determinado através da relação entre peso corporal (g) e o quadrado do comprimento nasoanal (cm^2) [24]. Essas medidas foram realizadas antes do início e após o término do tratamento farmacológico, ou seja, aos 106° dias de vida e aos 121° dias de vida (após término do tratamento farmacológico) e antes da eutanásia dos animais.

Análise de Parâmetros Metabólicos: Níveis de Glicose capilar

A coleta de amostras sanguíneas foi realizada com os animais dos diferentes grupos experimentais antes do início do tratamento e após o término do tratamento farmacológico. Amostra (aproximadamente 2 μ L) de sangue foi obtida na extremidade da cauda do animal e depositado numa fita teste (Roche Diagnostics®). Os níveis de glicose foram determinados usando um glicosímetro automático (Accutrend GCT, Roche Diagnostics®) valores expressos em mg/dL [25].

Análise do perfil histopatológico do Fígado

Foram analisados quanto à presença de lesão, hipertrofia e acúmulo de gordura. Foi separado um lobo do fígado dos animais para fixação em formol a 10% tamponado e mantidos durante 24 h à temperatura ambiente. Em seguida foram feitos cortes do tecido, inseridos nos cassetes histológicos e dispostas para processamento em um aparelho Histotécnico automatizado OMA modelo CM 69, onde o material foi submetido a uma serie de graduação de etanol à 70%, 85%, 95% e três sequências de etanol a 100% (100%1, 100%2, 100%3), por sessenta minutos, duas sequências de xilol por sessenta minutos em cada, e mais duas

sequências de parafina aquecida a 56°C por sessenta minutos cada. Após este processo, o material foi emblocado em parafina. Para a realização dos cortes na espessura de 5µm foi utilizado o micrótomo marca LEITZ modelo 1512. Consequentemente as lâminas foram analisadas e determinada as alterações presentes em cada grupo estudado.

Esses tecidos foram corados usando a técnica de coloração com Hematoxilina-eosina, montados em Entellan para observação dos aspectos histomorfológicos do tecido. Após este procedimento, as amostras foram encaminhadas para a leitura histológica, onde foi avaliado por microscopia óptica se houve dano histológico nos fígados dos animais, comparando-se os grupos.

Análise morfométrica do fígado

Foi realizada uma análise macroscópica completa dos fígados coletados, quanto ao aspecto geral (coloração, presença de tecido fibroso, presença de nódulos) com a finalidade de se comparar a macroestrutura entre animais de todos os grupos. Foi medido os seguintes parâmetros macromorfométricos do lobo médio hepático: comprimento e peso. Estes parâmetros foram obtidos com a utilização de paquímetro digital (Digimess®) e a balança analítica Q-500L210C (Quimis®).

Volume referência (Vref)

O volume referência é definido como sendo o volume global de um órgão ou de uma região de interesse. Para a estimativa do volume referência do lobo médio hepático foi utilizado o princípio de Cavalieri [26; 27]. O lobo médio hepático foi seccionado seriadamente em fatias de 2 mm de espessura. Sobre estas fatias foi sobreposto um sistema de pontos e quantificado os pontos para a determinação do volume. Em cada fatia foi contado o número de pontos que tocavam o lobo hepático médio. Para se estimar o volume do fígado, a partir do princípio de Cavalieri, que consiste na aplicação de um sistema teste quadrático nos cortes macroscópicos em fatias transversais. A seguinte fórmula foi utilizada:

[Equação 1]

Onde $\sum P$ é o somatório dos pontos do sistema teste que tocam a estrutura desejada (área seccional de qualquer órgão), $\left(\frac{a}{p}\right)$ é a área associada a cada ponto do sistema teste, e t é a espessura de cada fatia.

Densidade de volume (Vv)

A densidade de volume, Vv será estimada de acordo com a seguinte equação:

[Equação 2]

Onde, $\sum P(\text{interesse})$ é o número total de pontos (de um sistema teste) que tocam os adipócitos do fígado. E $\sum P(VT)$ é o número de pontos (do mesmo sistema teste que toca todas as estruturas da área seccional amostrada. Escolhendo para análise, o núcleo, sinusóide e parênquima hepático.

Contagem de células binucleadas

Foi feita a contagem de células binucleadas, através das mesmas imagens que foram feitas a densidade de volumes das estruturas. Obtendo assim uma média para determinação da multiplicação celular.

Coleta de amostras para realização de estudos

Ao 122º dia de vida, os animais dos dois grupos experimentais foram eutanasiados. Os ratos foram previamente pesados e anestesiados com Isoflurano por via inalatória e eutanasiados, e os fígados foram retirados. O sangue foi acondicionado em tubos Vacutainer® sem anticoagulante para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos e em tubos contendo EDTA, para avaliação hematológica.

Análise dos parâmetros bioquímicos

As análises bioquímicas foram realizadas em amostras séricas usando um analisador automatizado para bioquímica clínica CMD 800iX1 (Wiener Lab Group). O soro foi obtido por centrifugação do sangue em microtubos contendo acelerador de coagulação e sem anticoagulantes, a 3500 rpm por 5 minutos. Kits de diagnóstico padronizados (Labtest®) foram utilizados para as avaliações espectrofotométricas dos seguintes parâmetros bioquímicos: Lipase, Fosfatase alcalina (ALP), Creatinina, Ureia, Ácido úrico, Alanina transaminase (ALT), Aspartato transaminase (AST), Albumina, Glicose, Proteínas totais, Triglicerídeos, Colesterol total, Colesterol HDL e Gama GT [28].

Análise dos parâmetros hematológicos

As análises hematológicas foram realizadas em amostras de sangue total coletado em tubos contendo EDTA, utilizando um analisador automatizado hematológico Sysmex XT-4000i (Roche®). Foram avaliados os seguintes parâmetros: Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$); Hemoglobina (g/dL); Hematócrito (%); volume corpuscular médio - fL (VCM), hemoglobina corpuscular média - pg (CHM), concentração da hemoglobina corpuscular média - g/dL (CHCM), Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$); Neutrófilos (%); Linfócitos (%); Monócitos (%); Eosinófilos (%); Basófilos%. MPV (%), RDW (%), RBC (%) [28].

Análises estatísticas

Para as análises estatísticas, foi utilizado no peso corporal índice de Lee, IMC, glicose capilar e demais testes ANOVA de duas vias, seguido por Bonferroni pós-teste. O nível de significância foi considerado p igual ou menor que 0,05. Todos os dados foram analisados usando o programa GraphPad PRISM[®] versão 6,0 (California, USA).

Resultados

Avaliação do peso corporal antes do tratamento

Os resultados para o peso corporal dos animais obesos e normonutridos não apresentaram diferença, entre a 1^a, 2^a e 3^a semanas após o início do consumo de dietas especiais. A partir da 4^a semana os animais dos grupos obesos apresentaram diferença, com o peso corporal maior ($225,2 \pm 15,73$ versus $256,82 \pm 22,42$) também foi observada diferença na 5^a semana ($260,47 \pm 19,15$ versus $294,02 \pm 22,52$) com $p < 0,01$ e nas semanas subsequentes até a 11^a semana antes do início do tratamento ($347,05 \pm 27,06$ versus $421,98 \pm 48,57$) com $p < 0,0001$ [Fig. 1].

Efeito do uso combinado de NAL/BUP, após 14 dias de tratamento sobre o peso corporal e consumo alimentar

A associação de NAL/BUP levou a uma redução do peso corporal dos animais obesos OCT ($418,4 \pm 43,7$) quando relacionados ao peso inicial ($461,5 \pm 38,1$) $p < 0,05$. O peso corporal final dos animais obesos que não receberam tratamento OST ($467,5 \pm 24,8$) foi estatisticamente maior em comparação ao peso final dos animais OCT ($418,4 \pm 43,7$) $p < 0,05$. [Fig. 2] Não havendo assim alteração significativa no peso corporal inicial e final dos animais normonutridos com tratamento e sem tratamento.

O uso da associação de NAL/BUP trouxe uma redução do consumo médio total da dieta padrão dos animais pertencentes ao grupo normonutrido NCT ($4,52 \pm 0,39$) em relação ao grupo NST ($4,88 \pm 0,25$) $p < 0,05$. No grupo dos animais obesos o uso combinado de NAL/BUP conseguiu uma redução do consumo médio total da dieta de indução a obesidade nos animais do grupo OCT ($4,25 \pm 0,23$) em comparação aos animais do grupo OST ($5,74 \pm 0,36$) $p < 0,0001$.

Efeito do uso combinado de NAL/BUP após 14 dias de tratamento sobre o índice de Lee e o índice de Massa Corporal (IMC)

Quanto ao uso da associação de NAL/BUP, foi observada uma redução estatisticamente significativa no índice de Lee quanto aos animais do grupo NCT ($334,4 \pm 19,6$) em relação ao verificado após o tratamento NCT ($317,2 \pm 15,6$) $p < 0,05$ e do grupo OCT ($344,4 \pm 13,7$) em comparação ao verificado após o tratamento ($321,7 \pm 12,2$) $p < 0,01$. Foi também observada a

diferença estatística significativa nas medidas verificadas após o tratamento entre o grupo OCT ($321,75 \pm 12,16$) e OST ($343,76 \pm 11,28$) $p < 0,05$. Não foi observada alteração das medidas do índice de Lee nos animais do grupo NST ($330,6 \pm 5,7$ versus $323,5 \pm 11,9$) [Fig. 4].

Quanto ao IMC não foi observada diferença estatística significativa nas medidas, para com os animais dos grupos normonutridos (NST e NCT) [Fig. 5 A]. Entretanto, o uso da associação de NAL/BUP levou a uma redução significativa do IMC nos animais obesos OCT ($0,77 \pm 0,08$) em relação ao IMC verificado antes do tratamento OCT ($0,91 \pm 0,07$) $p < 0,01$. Também foi observada a diferença estatística significativa nas medidas de IMC verificadas após o tratamento entre os grupos OCT ($0,77 \pm 0,08$) e OST ($0,90 \pm 0,08$) $p < 0,05$ [Fig. 5 B].

Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre a glicemia capilar

A associação de NAL/BUP foi usada durante os 14 dias de tratamento, levando a uma redução significativa com $p < 0,05$ dos valores glicêmicos nos animais normonutridos NCT ($82,00 \pm 6,14$) em relação aos valores glicêmicos verificados antes do tratamento NCT ($92,63 \pm 6,30$). Não havendo assim diferença estatística significativa dos valores glicêmicos verificados antes do tratamento e após o tratamento no grupo normonutrido sem tratamento NST ($85,25 \pm 14,17$) vs ($85,38 \pm 6,59$) [Fig. 5 A]. Não houve também diferença estatisticamente significativa quando aos valores glicêmicos observados antes do tratamento e após o tratamento nos grupos obeso sem tratamento OST e obeso com tratamento OCT [Fig. 5 B].

Análise morfométrica do fígado

Análise macroscópica

Quanto a análise macroscópica do lobo coletado, foi possível observar de forma macroscópica, que a coloração se manteve adequada aos parâmetros de normalidade, bem como não foi observada a presença de tecido fibroso e nódulos.

Peso do lobo médio hepático

O peso do lobo médio hepático dos animais do grupo NST ($3,24 \pm 0,064$) estava reduzido quando comparados aos animais do grupo NCT ($3,75 \pm 0,218$). Quanto aos animais do grupo OST ($5,22 \pm 1,96$) apresentaram medidas maiores em relação aos animais OCT ($4,15 \pm 0,120$). As diferenças são estatisticamente significativas com $p < 0,05$ [Fig. 6]

Comprimento lobo médio hepático

Em relação as medidas de comprimento do lobo médio dos animais do grupo OST ($3,75 \pm 0,204$) em comparação aos do grupo OCT ($4,01 \pm 0,165$), foi observada uma diferença menor

e estatisticamente significativa com $p < 0,05$. Já o grupo NST ($3,34 \pm 0,056$) em relação ao grupo NCT ($3,43 \pm 0,047$) também apresentou diferença estatística significativa menor, onde o $p < 0,0045$ [Fig. 7].

Volume de Referência (Vref)

No volume de referência do lobo médio hepático, foi observado que os animais do grupo NST ($8,30 \pm 0,291$) apresentaram volumes menores, quando comparados ao grupo NCT ($10,88 \pm 0,43$), sendo significativo em $p < 0,05$. Em relação aos animais do grupo OST ($13,01 \pm 0,755$) houve uma leve diminuição quando comparado ao grupo OCT ($14,00 \pm 0,508$), porém sem diferenças significativas nos parâmetros de volume entre os grupos OCT vs OST experimentais. Valores expressos como média \pm erro padrão da média [Fig. 8].

Densidade de Volume (Vv)

Núcleo

Comparando os animais dos grupos NST ($0,47 \pm 0,027$) com os animais NCT ($0,52 \pm 0,035$) foi possível observar que não houve diferença significativa nos parâmetros de densidade de volume dos núcleos, no entanto, o que diferenciou bastante quando foi comparado os grupos OST ($0,65 \pm 0,030$) e o grupo OCT ($0,50 \pm 0,025$), onde houve uma redução do grupo obeso tratado com a associação NAL/BUP para o grupo obeso não tratado, apresentando assim, diferença estatística significativa, assumindo $p < 0,05$ [Fig. 9].

Sinusóide hepático

O sinusóide do lobo médio hepático do grupo NST ($0,82 \pm 0,128$) quando comparados com os animais do grupo NCT ($0,76 \pm 0,128$) não demonstraram diferenças significativas, bem como os animais do grupo OST ($0,85 \pm 0,14$) quando verificado ao grupo OCT ($0,91 \pm 0,13$) também não apresentaram diferenças significativas.

Contagem de células binucleadas

Foi feita a contagem de hepatócitos binucleados, onde a contagem nos mostrou que os animais do grupo NST ($44,6 \pm 1,4$) apresentou diferença estatística com significância $p < 0,0001$ quando comparados aos animais do grupo NCT ($59,8 \pm 1,39$). Resultados distintos foram observados no grupo dos animais obesos, havendo diminuição de células binucleadas no grupo que recebeu tratamento ($71,4 \pm 3,17$) vs. ($54,6 \pm 2,69$), assumindo o $p < 0,05$ [Fig. 10].

Análise histológica

Ao avaliar os animais do grupo NST e NCT, não foi observada alterações, sendo observada um padrão de normalidade bem preservado, relação núcleo/citoplasma adequada, sem resíduo inflamatório, parênquima e sinusóides preservados (Fig.11 A e Fig.11 B).

Os animais do grupo OST apresentou uma esteatose hepática bem evidenciada, sendo observado uma distribuição difusa dos vacúolos lipídicos nos hepatócitos, sendo os mesmos de tamanho variado, deslocando o núcleo dos hepatócitos para a periferia, porque sendo lipídeos (triglicerídeos) insolúveis em água, não se misturam com o citoplasma. Caracterizando uma degeneração gordurosa em todas as lâminas analisadas, sendo esses achados contribuintes para o diagnóstico de esteatose hepática (Fig.12 A). Bem como os animais do grupo OST, os animais do grupo OCT apresentaram sinais de esteatose, porém de forma leve quando comparada ao outro grupo (OST), sendo observada uma esteatose difusa e dispersa na maioria das lâminas analisadas, além de ter sido observada uma alteração no volume dos hepatócitos, comum a casos de esteatose hepática (Fig.12 B).

Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre o perfil bioquímico

Foi observado que os animais obesos do grupo OCT apresentaram os índices de Fosfatase alcalina superiores em relação aos animais OST ($303,09 \pm 0,39$) vs ($213 \pm 27,10$) $p < 0,0001$. Não havendo diferença nas medidas de Fosfatase alcalina entre animais normonutridos [tratado] vs [não tratado], nem entre animais normonutridos [não tratado] vs obesos [não tratado] ($p > 0,05$).

Os animais do grupo NCT apresentaram valores de AST superiores em relação aos animais NST ($228,27 \pm 17,92$) vs ($159,05 \pm 8,49$) $p < 0,0001$. Não sendo observada diferença nas medidas de AST entre animais obesos [não tratado] vs normonutridos [não tratado], nem entre animais obesos [tratado vs não tratado] ($p > 0,05$) [Tabela 1].

Os animais do grupo OCT mostraram medidas de Glicose inferiores em relação aos animais OST ($143,10 \pm 7,81$) vs ($198,07 \pm 12,16$) $p < 0,01$. Enquanto o grupo OST apresentou as medidas de Glicose superiores quando contrastado ao grupo NST ($198,07 \pm 12,16$) vs ($135,55 \pm 6,22$) respectivamente $p < 0,001$. Não havendo diferenças nas medidas de Glicose entre animais normonutridos [tratado vs não tratado] ($p > 0,05$), bem como não foi observada diferenças significativas nos outros parâmetros bioquímicos analisados entre os grupos experimentais [Tabela 1].

Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre o perfil hematológico

Quanto aos parâmetros hematológicos, os animais do grupo OCT apresentaram as medidas de Plaquetas superiores ($528,40 \pm 79,38$) em comparação aos animais OST ($405,70 \pm 50,59$) $p < 0,0001$. E o grupo OST ($405,70 \pm 50,59$) apresentou as medidas de Plaquetas superiores quando confrontados ao grupo NST ($310,54 \pm 31,98$) respectivamente $p < 0,0001$. Não houve diferenças nas medidas de Plaquetas entre animais normonutridos [tratado] vs [não tratado], nem entre animais normonutridos [não tratado] vs obesos [não tratado] ($p > 0,05$). Não houveram diferenças significativas nos outros parâmetros hematológicos analisados entre os grupos experimentais. Valores expressos como média \pm erro padrão da média [Tabela 2].

Discussão

A grande via que determina o aumento da prevalência da obesidade está diretamente ligado a uma mudança de dieta, onde existe um maior consumo de gordura [29]. A pesquisa experimental apoia esses estudos, estabelecendo uma relação de causalidade entre o consumo prolongado de uma dieta com altos níveis de gordura e açúcar e a adiposidade [30]. Contribuindo com este estudo, onde os resultados evidenciaram que uma dieta rica em gordura e açúcar utilizada para a indução da obesidade em ratos *Diet Induced Obesity* (DIO), mostrou-se bastante eficaz. Os animais do grupo obeso que se alimentaram com esse tipo de dieta apresentaram peso corporal estatisticamente maior quando comparados aos animais normonutridos. Esses resultados só atestam relatos da literatura, confirmando assim que animais quando expostos a este tipo de dieta, de forma crônica, contribui em um aumento no ganho de peso corporal [31]. E que dietas DIO são mais palatáveis [32], resultando em um aumento da gordura corporal [33].

Este estudo, investigou o efeito do uso combinado de NAL (1mg/kg) e BUP (20mg/kg), sobre o comportamento alimentar, analisando assim indicadores importantes para a ação de verificação dessa associação medicamentosa em ratos *Wistar* obesos.

Foi observado que a associação NAL/BUP durante os 14 dias de tratamento promoveu redução do peso dos animais obesos, bem como o peso final dos animais obesos tratados foi menor quando comparado ao peso final dos animais obesos não tratados. Não houve alteração no peso em animais normonutridos. A combinação de NAL/BUP também promoveu redução significativa no consumo alimentar (Kcal/g), tanto nos animais normonutridos quanto nos animais obesos em comparação a seus grupos controles.

Corroborando com investigações anteriores de Clapper e colaboradores [34], onde foi demonstrado em ratos DIO, que a combinação NAL/BUP reduziu a ingestão de alimentos, peso

corporal e adiposidade sem perda da massa magra. Uma possível explicação para esta descoberta é que a atividade basal dos neurônios POMC é consideravelmente menor em ratos obesos, supostamente devido à resistência à leptina que o quadro de obesidade apresenta em neurônios POMC [35, 36].

Animais obesos tratados com a associação NAL/BUP mostraram reduções significativas no índice de Lee e IMC comparados com as medidas verificadas antes do tratamento. Corroborando com os resultados de, Wright e Rodgers [35], onde foi relatado que, além da redução da ingesta de alimentos e do peso corporal, a combinação de NAL/BUP também promove perda de massa gordurosa em ratos DIO.

Os resultados deste trabalho só confirmam relatos anteriores da literatura, onde sugerem que a associação NAL/BUP gera uma perda de peso, conseqüentemente uma maior redução na gordura (NAL ou BUP). Ademais, a redução observada se mostrou proporcional à perda de peso, embora este emagrecimento com NAL/BUP não foi associada a uma maior redução relativa na massa magra do que o placebo ou as monoterapias [37].

Outros dados, de forma semelhante, nos mostram que a perda de peso a longo prazo (>8 semanas) produz uma redução na adiposidade total e visceral seguindo o padrão e grau de perda de peso geral [38]. Corroborando com este trabalho, a perda de peso através da associação NAL/BUP em adultos obesos, é atribuída em grande parte devido a uma redução na gordura corporal e adiposidade visceral e não devido à perda de tecido magro. Estes efeitos da NAL/BUP na adiposidade visceral provavelmente contribuem para as melhorias nas medidas de risco cardiológicas associados à combinação NAL/BUP [18, 39].

Em relação a glicemia em jejum, é de conhecimento a relação entre o aumento do tecido adiposo e dos níveis de glicemia após indução da dieta hiperlipídica [40,41,42,43]. Essa elevação dos valores glicêmicos estão provavelmente associados ao aumento da quantidade de gordura corporal e também do aumento de hormônios heperglicemiantes, alguns como: glucagon, adrenalina, cortisol e hormônio do crescimento [44,45].

Foi observado neste estudo que o uso combinado de NAL;BUP, diminui os índices glicêmicos capilar nos animais normonutridos (tratados e não tratados), enquanto que na análise bioquímica, foi revelado uma redução nos níveis séricos de glicose em animais obesos tratados (tratados e não tratados), sendo assim, esses achados corroboram com estudos anteriores, indicando que NAL/BUP melhoram o perfil glicêmico [46].

É de entendimento que a hipercolesterolemia, nos animais, também pode indicar doença hepática ou biliar, síndrome nefrótica, diabetes mellitus, enquanto a hipocolesterolemia pode estar associada, algumas vezes, à disfunção hepática grave [47,48,49].

Estudos anteriores mostraram que a combinação de NAL/BUP ocasionou aumento no colesterol HDL, e diminuiu níveis de triglicérides além de ocasionar melhorias sobre a taxa de glicose e insulina [46, 50, 51].

Em relação aos parâmetros bioquímicos, nosso trabalho evidenciou que o uso combinado de NAL/BUP aumentou as medidas de Fosfatase alcalina (FAL) em animais obesos com tratamento, mas não houve diferença entre animais normonutridos [tratado e não tratados] e aumentou também as medidas de AST e em animais normonutridos com tratamento, mas não houve diferenciação entre animais obesos [tratado e não tratados], embora tenha havido um aumento em obesos, porém sem importância estatística.

Em diversos estudos há um indicativo forte de que as intoxicações medicamentosas elevam consideravelmente os níveis de enzimas transaminases. A alanina aminotransferase (ALT) e a fosfatase alcalina são enzimas que se apresentam elevadas quando existe lesão das vias biliares. O fígado produz a bile, que é drenada pelas vias biliares [47, 48, 49, 52].

A avaliação das enzimas transaminases (ALT e AST) e de FAL são de suma importância para investigação de lesões nas células hepáticas [53, 54].

Em relação a FAL, é de conhecimento que qualquer hepatopatia ativa pode geralmente aumentar os valores da mesma, mas as maiores elevações nos níveis da enzima ocorrem nos casos de obstrução do trato biliar que pode ser induzida por xenobióticos, entre eles, medicamentos. Portanto, essa enzima pode ser um marcador importante da atividade da membrana plasmática e do retículo endoplasmático durante tratamentos farmacológicos como na combinação NAL/BUP e em algumas condições patológicas [55, 56, 57]. Não houve alterações significativas nos outros parâmetros bioquímicos analisados entre os grupos experimentais.

Quanto aos parâmetros hematológicos, o estudo em questão mostrou que houve um aumento do índice plaquetário, através do uso da associação NAL/BUP nos animais obesos [tratado vs não tratado], não apresentando diferenças entre animais normonutridos [tratado vs não tratado]. Não foi visto qualquer outro tipo de alteração nas demais linhagens dos padrões hematológicos analisados entre os grupos experimentais. Segundo Silva et al (2016) [58], os parâmetros hematológicos são de extrema importância para o estudo de toxicidade

medicamentosa, devido ao sistema hematopoiético ser altamente sensível as atividades dos agentes tóxicos, como aqueles com potencial mutagênico ou citotóxico. Esses agentes tóxicos podem resultar em várias alterações, como qualitativas ou quantitativas, transitórias ou permanente e ainda podem limitar a utilização de medicamentos.

O sistema hemostático normal resulta da interação entre componentes das paredes dos vasos, as plaquetas circulantes e proteínas do plasma. A ativação não regulada do sistema hemostático pode causar trombose, embolismo (tromboembolismo), reduzindo o fluxo sanguíneo a órgãos críticos como o cérebro ou o miocárdio [59].

O peso do lobo médio hepáticos foi maior no grupo normonutrido com tratamento e menor nos obesos com tratamento em relação ao grupo de obesos que não receberam tratamento, o que é justificado pelo trabalho de KLASCO [60], onde o mesmo relata que o uso de bupropiona pode reduzir o peso corporal, como aumentar com incidências distintas, sendo mais comum a redução de medidas, principalmente quando o paciente apresenta uma maior propensão a obesidade. CLAPPER e colaboradores [34], justificam a redução do peso do lóbulo hepático dos animais obesos que receberam tratamento quando comparados aos animais obesos que não receberam tratamento. Em estudos de monoterapia, foi observado que a Naltrexona quando usada para tratamento antiobesidade, mostrou que a mesma pouco ou não reduz o peso corporal [61].

Apesar do peso ter reduzido nos animais obesos que foram submetidos a tratamento com a associação com NAL/BUP, quando o parâmetro de medida foi comprimento foi observada uma alteração não pareada a pesagem, haja vista que os animais obesos com tratamento apresentaram um comprimento maior que os animais obesos sem tratamento. O que pode ser justificado com o trabalho de Clapper [34], onde o mesmo observou em pesquisa que, seus animais obesos tratados com a associação NAL/BUP apresentaram em sua maioria redução de peso corporal e da adiposidade, representando uma perda de 68% de massa gorda, consequentemente neste mesmo trabalho não foi observada a perda da massa magra, onde não houve redução do comprimento mas foi observada a redução do peso do lobo médio hepático, neste estudo.

Associado as duas medidas: peso e comprimento, sabendo que dois grupos que se apresentam obesos e que a DHGNA se faz presente em mais de 80% dos indivíduos obesos, é importante mencionar a presença de gordura no tecido hepático, que segundo dados do [62], onde afirma que a esteatose hepática não alcóolica é um problema de saúde na qual existe um

depósito de lipídeos nos hepatócitos, que podem levar a consequências graves, incluindo o câncer, relacionadas a esteatose hepática, e tendo o conhecimento que a DHGNA leva ao aumento do fígado.

Neste estudo quando analisamos o Volume de Referência do lobo médio hepático, através da técnica de Cavalieri, obtivemos que os animais dos grupos normonutridos apresentaram uma alteração quanto ao volume, sendo assim, os animais do grupo NCT, apresentaram um volume maior que os animais do grupo NST e é importante lembrar que esses dois grupos de animais apresentaram AST elevado, enzima essa sensível a qualquer dano hepático.

Tendo em vista que os animais do grupo obesos tratado com a associação NAL/BUP apresentaram uma elevação no volume, superior aos animais controle, sugere que a associação possa estar relacionada com alguma lesão hepática, contribuindo assim com dados de [62] que o uso de medicamentos, sejam eles: antidepressivos, corticoides, estrógeno, amiodarona, antirretrovirais, diltiazem e tamoxifeno podem estar associados a lesão hepática, conseqüentemente com hepatomegalia.

Dados de [63], sugerem que pacientes que apresentem insuficiência hepática devem ser monitorados durante o tratamento com uso de bupropiona, devido à possibilidade de efeitos adversos (insônia, sensação de boca seca, convulsões, entre outros) que podem indicar altos níveis do medicamento.

Neste trabalho em particular obtivemos o volume do lobo médio do fígado pelo princípio de Cavalieri. E podemos perceber que houve uma diferença estatística entre dois grupos analisados e estudados tamanha acurácia do método.

Neste estudo ao analisar a densidade de volume dos núcleos que compõe os hepatócitos, foi observado que não houve uma diferença com significância estatística ao compararmos os animais do grupo normonutrido tratado com os animais normonutrido não tratados. Porém ao analisarmos os animais obesos com e sem tratamento com a associação NAL/BUP, observamos uma redução do volume do núcleo dos hepatócitos referente aos animais que receberam tratamento quando comparados ao grupo de animais obesos que não receberam tratamento.

A obesidade interfere na síntese de DNA, e que contribui com o desenvolvimento de certos tipos de câncer, incluindo câncer de esôfago, pâncreas, fígado, cólon e mama devido as diversas interações com o meio intracelular [64, 65]. Os resultados deste estudo sugerem que alterações morfológicas dos núcleos dos hepatócitos após tratamento com a associação

NAL/BUP podem ser decorrentes de interferência na síntese de DNA. Estudos de [66] creem na hipótese de redução de tumor, haja vista que suas análises mostraram que uso de naltrexona ajudou na redução de tumor de pâncreas e o estudo de Donahue et al, [67], contribuiu também com este estudo na sugestão da interferência na síntese de DNA, pois o uso de naltrexona reduziu tumor de ovário.

LIEBER [68] diz que a terapêutica da esteatose e a progressão do dano hepatocelular, consiste em diversas medidas, como: controle da ingestão de alimentos ricos em ácidos graxos, redução do peso, uso de antioxidantes e de medidas que contribuam para a redução de medidas do indivíduo acometido com a DHGNA.

Todavia, as recomendações do fabricante dos medicamentos em estudo, indicam que é aconselhado o monitoramento de pacientes com insuficiência hepática, principalmente os que apresentam alguma alteração hepática grave, antes do uso da associação NAL/BUP, devido à falta de estudos mais complexos [69].

Os hepatócitos dificilmente entram em processo de divisão celular, justamente por serem de origem epitelial e altamente diferenciados. A cada 20.000 células um hepatócito entra em divisão entre 20.000 células, durante a vida do ser humano ou animal, e essa divisão ocorre no máximo duas vezes para cada hepatócito [70, 71]. Neste trabalho, foi possível observar que os animais normonutridos que receberam tratamento com a associação NAL/BUP apresentaram um número maior de hepatócitos binucleados, que os animais normonutridos que não receberam tratamento e isso pode ser justificado através do que Okano K. [72], onde ele afirma que a regeneração hepática é um evento que promove o crescimento tecidual altamente ordenado e organizado e que células hepáticas que passam por processos de tratamento farmacológico agudo, pode ou tende a desencadear algum tipo de processo regeneração, seja ele de hiperplasia que é quando existe o surgimento de novas células ou de hipertrofia, que é quando as células aumentam seu volume, até que a massa hepática seja restaurada, com uma variação de 5 – 10%.

Nos animais obesos que não receberam tratamento, observamos um número maior de células binucleadas quando comparado aos animais OCT, contribuindo com o entendimento de que a obesidade está envolvida no processo de síntese de Ácido Desorribonucleico, tendo em vista que contribui com o desenvolvimento de certos tipos de câncer, incluindo câncer de esôfago, pâncreas, cólon e mama, modificando assim estrutura do DNA e/ou auxiliando em interações com o meio intracelular [64, 65]. E levando a uma redução do número de células

binucleadas dos animais obesos que receberam tratamento com a associação NAL/BUP contribuindo com a hipótese de Berkson et al., [66], onde os estudos dele mostrou que uso de naltrexona ajudou na redução de tumor de pâncreas.

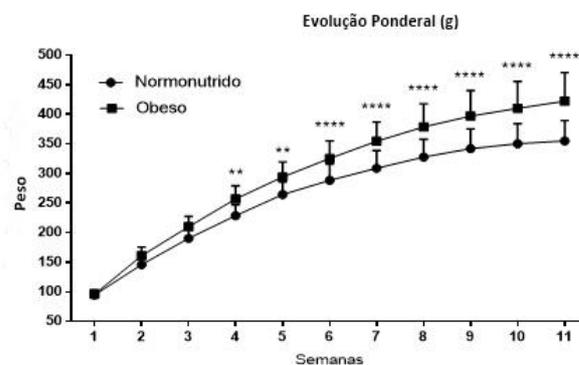
Equações:

$$\text{Equação 1: } V = \sum P \times \left(\frac{a}{p}\right) \times t$$

$$\text{Equação 2: } Vv_C := \frac{\sum P(\text{interesse})}{\sum P(VT)}$$

Figuras

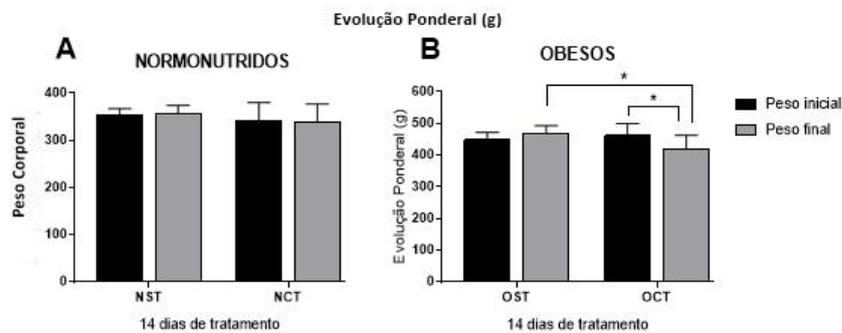
Figura 1 - Evolução do peso corporal durante 11 semanas antes do início do tratamento pela associação de naltrexona + bupropiona (1mg+20mg) em 20 animais do grupo normonutrido submetidos a dieta padrão (Presence®) e em 20 animais do grupo obeso submetidos a dieta de indução a obesidade (Palatável). Valores das medidas no peso corporal são apresentados como gramas e expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças no peso corporal entre o grupo normonutrido e grupo obeso não são estatisticamente significativas na 1ª, 2ª e 3ª semanas após início da ingestão das dietas experimentais. As diferenças são estatisticamente significativas com **P < 0,005 na 4ª e 5ª semana, e ****p < 0,0001 nas semanas subsequentes até a 11ª semana antes do início do tratamento. (two-way ANOVA para medidas repetidas seguido por Bonferroni pós-teste p < 0,05). g = grama.



Fonte: O autor, (2019)

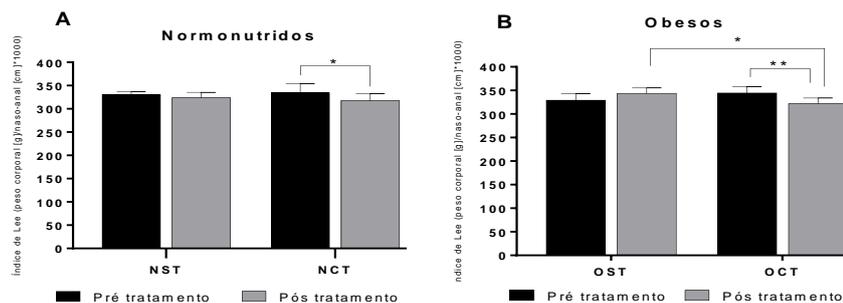
Figura 2 - Efeito da combinação de NAL/BUP sobre o peso corporal (inicial e final) em ratos wistar normonutridos e obesos. Os animais foram tratados com NAL (1mg/kg) e BUP

(20mg/kg) ou água destilada (1ml/kg). Os grupos normonutridos foram submetidos a dieta padrão (Presence®) e os grupos obesos submetidos a dieta de indução a obesidade. Valores apresentados em gramas e expressos como média \pm desvio padrão do peso corporal dos animais experimentais. **(A)** Não houve diferença significativa entre o peso inicial e peso final nos grupos experimentais. **(B)** As diferenças no peso final de OST são estatisticamente significativas com $*p < 0,05$) em relação ao peso final do grupo OCT. Houve diferença estatisticamente significativa com $*p < 0,05$), entre o peso inicial e final dos animais do grupo OCT. Two-way ANOVA para medidas repetidas seguido por Bonferroni pós-teste com valor de significância $*p < 0,05$. NST (normonutrido não tratado) n=10, NCT (normonutrido tratado) n=10, OST (obeso não tratado) n=10 e OCT (obeso tratado) n=10. g = grama.



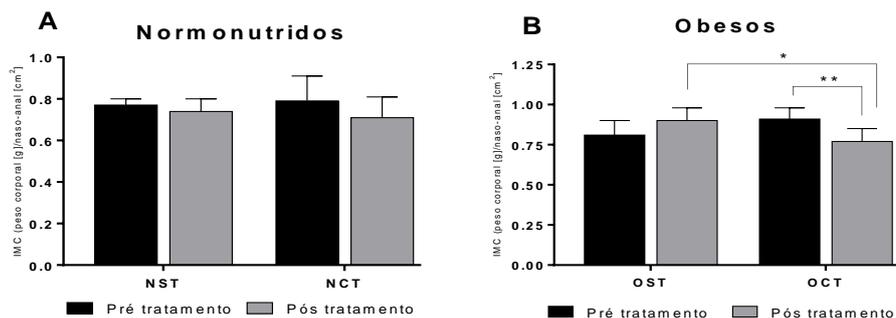
Fonte: O autor, (2019)

Figura 3 - Efeito da combinação de NAL/BUP sobre o índice de Lee antes e após tratamento em ratos wistar normonutridos e obesos. Os animais foram tratados com NAL (1mg/kg) e BUP (20mg/kg) ou água destilada (1ml/kg). Os grupos normonutridos foram submetidos a dieta de indução a obesidade. Valores do índice de Lee expressos como média \pm desvio padrão. **(A)** - Houve diferença estatisticamente significativa nas medidas verificadas antes do tratamento e após o tratamento no grupo NCT ($*p < 0,05$). **(B)** - Diferença estatisticamente significativa nas medidas verificadas antes do tratamento e após o tratamento no grupo OCT ($**p < 0,01$). Houve diferença estatisticamente significativa nas medidas verificadas após o tratamento entre os grupos OST e OCT ($*p < 0,05$) (two-way ANOVA para medidas repetidas seguido por Bonferroni pós-teste com valor de significância $p < 0,05$). NST (normonutrido não tratado) n=5, NCT (normonutrido tratado) n=5, OST (obeso não tratado) n=5 e OCT (obeso tratado) n=5. Índice de Lee = $(3\sqrt{\text{peso corporal [g]} / \text{nasoanal [cm]}^3} \times 1000$.



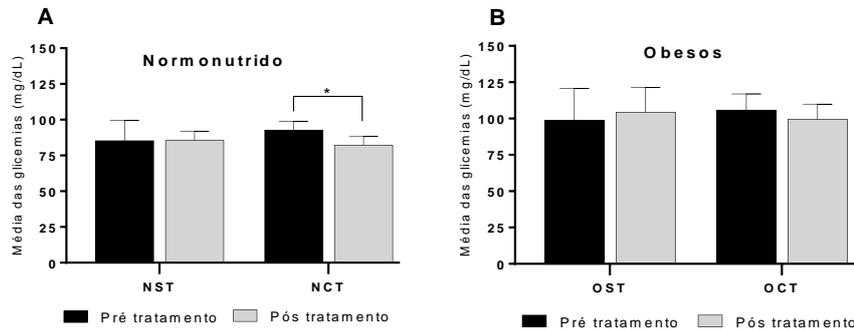
Fonte: O autor, (2019)

Figura 4 - Efeito da combinação de NAL/BUP sobre o índice de Massa Corporal (IMC) antes e após tratamento em ratos wistar normonutridos e obesos. Os animais foram tratados com NAL (1mg/kg) e BUP (20mg/kg) ou água destilada (1ml/kg). Os grupos normonutridos foram submetidos a dieta padrão e os grupos obesos submetidos a dieta de indução a obesidade. Valores do IMC expressos como média \pm desvio padrão. (**A**) - Não houve diferença estatisticamente significativa nas medidas verificadas antes do tratamento e após o tratamento nos grupos NST e NCT. (**B**) - Diferença estatisticamente significativa nas medidas verificadas antes do tratamento e após o tratamento no grupo OCT, $**p < 0,01$. Houve diferença estatisticamente significativa nas medidas verificadas após o tratamento entre os grupos OST e OCT, $*p < 0,05$. Two-way ANOVA seguido por Bonferroni pós-teste com valor de significância $p < 0,05$. NST (normonutrido não tratado) $n=5$, NCT (normonutrido tratado) $n=5$, OST (obeso não tratado) $n=5$ e OCT (obeso tratado). $n=5$. Índice de Massa Corporal = peso corporal (g) e o quadrado do comprimento nasoanal (cm^2).



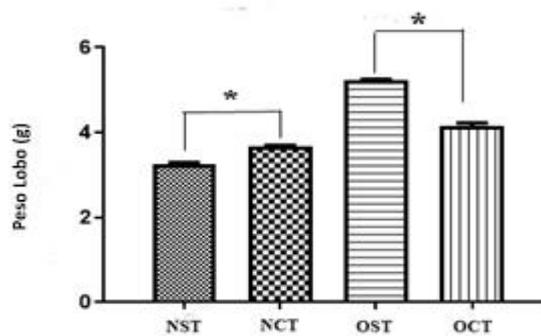
Fonte: O autor, (2019)

Figura 5 - Efeito da combinação de NAL/BUP sobre a glicemia capilar em ratos wistar machos normonutridos e obesos. Os grupos normonutridos foram submetidos a dieta padrão e os grupos obesos submetidos a Dieta Indução da Obesidade. (A) - As diferenças nos valores das glicemias no pré e pós tratamento, são estatisticamente significativas no grupo NCT com $*P < 0,05$. Não houve diferença estatisticamente significativa no pré e pós tratamento no grupo NST. (B) – Não houve diferenças estatisticamente significativas entre o pré tratamento e o pós tratamento nas glicemias verificadas nos grupos OST e OCT.. Valores apresentados como (mg/dL) e expressos como média \pm desvio padrão. Two-way ANOVA para medidas repetidas seguido por Bonferroni pós-teste com valor de significância $p < 0,05$. NST (normonutrido não tratado) $n=5$, NCT (normonutrido tratado) $n=5$, OST (obeso não tratado) $n=5$ e OCT (obeso tratado) $n=5$. mg/dL = Miligrama por decilitro.



Fonte: O autor, (2019)

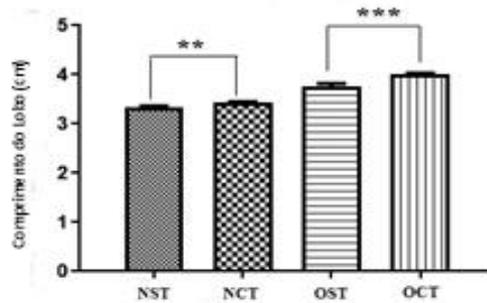
Figura 6 - Peso do lobo médio hepático. Os grupos normonutridos foram submetidos a dieta padrão e os grupos obesos submetidos a Dieta Indução da Obesidade. Havendo diferença estatística significativa entre os animais normonutridos que não foram tratados com a associação Nal/Bup quando comparados aos animais que receberam o tratamento com a associação Houve diferença estatisticamente significativa com (* $p < 0,05$). Bem como, com os animais obesos, os animais que receberam tratamento com a associação Nal/Bup, apresentaram uma redução do peso significativa (* $p < 0,05$). Valores apresentados como (g) e expressos como média \pm desvio padrão. Two-way ANOVA com valor de significância $p < 0.05$. NST (normonutrido não tratado) $n=5$, NCT (normonutrido tratado) $n=5$, OST (obeso não tratado) $n=5$ e OCT (obeso tratado) $n=5$. g = grama



Fonte: O autor, (2019)

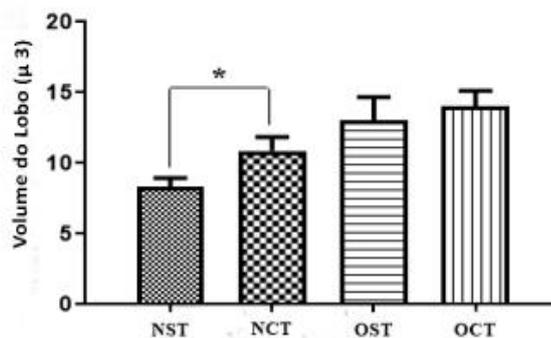
Figura 7 - Comprimento do lobo médio hepático. Os grupos normonutridos foram submetidos a dieta padrão e os grupos obesos submetidos a Dieta Indução da Obesidade. Foi apresentado uma diferença significativa entre os animais normonutridos que não receberam tratamento para os animais normonutridos que receberam tratamento com a associação Nal/Bup, onde os animais que receberam tratamento apresentaram, um valor maior do lobo médio hepático, que os animais que não receberam o tratamento, com o $p < 0,0001$. Os animais obesos apresentaram diferenças significativas, onde houve um aumento do comprimento dos animais que receberam tratamento quando comparados com os animais que não receberam tratamento, o $p < 0,05$. Valores apresentados como (cm) e expressos como média \pm desvio

padrão. Two-way ANOVA com valor de significância $p < 0.05$. NST (normonutrido não tratado) $n=5$, NCT (normonutrido tratado) $n=5$, OST (obeso não tratado) $n=5$ e OCT (obeso tratado) $n=5$. cm= centímetro.



Fonte: O autor, (2019)

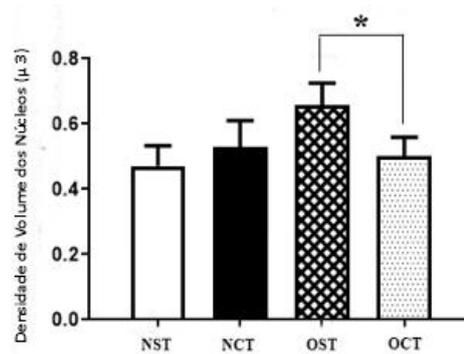
Figura 8 - Volume de referência do lobo médio hepático de ratos wistar, estimados pelo princípio de Cavalieri. Os grupos normonutridos sem tratamento apresentaram volumes reduzidos, quando comparados com os animais normonutridos que receberam tratamento, tendo uma significância de ($*p < 0,05$). Os animais obesos sem tratamento não apresentaram diferença significativa quando comparados com os animais obesos que receberam tratamento. Valores apresentados como μ^3 e expressos como média \pm desvio padrão. Two-way ANOVA com valor de significância $p < 0.05$. NST (normonutrido não tratado) $n=5$, NCT (normonutrido tratado) $n=5$, OST (obeso não tratado) $n=5$ e OCT (obeso tratado) $n=5$. μ^3 = micrômetro cúbicos.



Fonte: O autor, (2019)

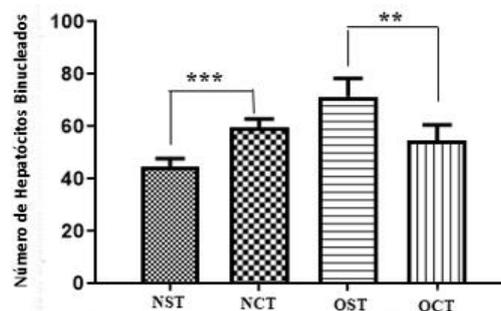
Figura 9 - Densidade de volume (Vv) dos núcleos dos hepatócitos do lóbulo médio hepático de ratos wistar. Não foi observada diferença estatística significativa entre os animais normonutridos que receberam tratamento e os normonutridos sem tratamento. A avaliação dos animais obesos que não receberam tratamento com a associação Nal/Bup e a comparação com os animais obesos que receberam tratamento, foi observado que houve uma redução do volume

de densidade dos núcleos, apresentando significância estatística de $p < 0,05$. Valores apresentados como μ^3 e expressos como média \pm desvio padrão. Two-way ANOVA com valor de significância $p < 0,05$. NST (normonutrido não tratado) $n=5$, NCT (normonutrido tratado) $n=5$, OST (obeso não tratado) $n=5$ e OCT (obeso tratado) $n=5$. μ^3 = micrômetro cúbicos



Fonte: O autor, (2019)

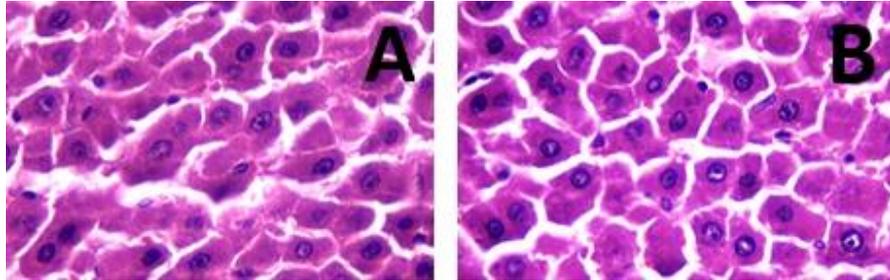
Figura 10 - Contagem de hepatócitos Binucleados do lobo médio hepático de ratos wistar. Os grupos normonutridos apresentaram diferenças estatisticamente significativas, onde foi observada um aumento de hepatócitos binucleados nos animais normonutridos com tratamento, sendo esta diferença significativa em ($***p < 0,0001$), distinguindo assim dos animais obesos, onde foi observada uma redução de células binucleadas em animais que receberam tratamento com a associação Nal/Bup assumindo o ($**p < 0,05$). Valores expressos como média \pm desvio padrão. Two-way ANOVA com valor de significância $p < 0,05$. NST (normonutrido não tratado) $n=5$, NCT (normonutrido tratado) $n=5$, OST (obeso não tratado) $n=5$ e OCT (obeso tratado) $n=5$.



Fonte: O autor, (2019)

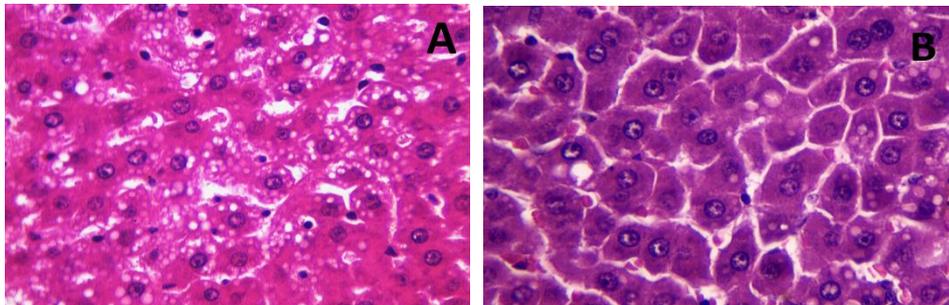
Figura 11 - Análise histológica dos grupos normonutridos. **(A)** Grupo normonutrido sem tratamento não apresentou alterações significativas, sendo observada uma relação núcleo/citoplasma adequada, ausência de infiltrado inflamatório, parênquima e sinusóides preservados. **(B)** nos animais do grupo normonutridos com tratamento, o padrão de normalidade também foi observado, sem alterações significativas e relação núcleo/citoplasma adequada e

parênquima e sinusóides preservados. NST (normonutrido não tratado) n=5, NCT (normonutrido tratado) n=5, OST (obeso não tratado) n=5 e OCT (obeso tratado) n=5.



Fonte: O autor, (2019)

Figura 12 - Análise histológica dos grupos Obesos. (A) Os animais do grupo Obesos Sem Tratamento, apresentaram uma esteatose bem evidenciada, onde foi possível observar uma distribuição de vacúolos de forma difusa micro e macrogoticular, de tamanho variado, deslocando os núcleos para a periferia. (B) Os animais do grupo Obeso Com Tratamento, também apresentaram esteatose, todavia de forma branda ao serem comparados com os animais do grupo OST, sendo a esteatose difusa e dispersa. NST (normonutrido não tratado) n=5, NCT (normonutrido tratado) n=5, OST (obeso não tratado) n=5 e OCT (obeso tratado) n=5.



Fonte: O autor, (2019)

Tabelas

Tabela. 1 Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre o perfil bioquímico

Parâmetros	NST	NCT	OST	OCT	P valor
Lipase (mg dL ⁻¹)	13,46 ± 0,17	19,52 ±	15,06 ± 1,07	14,69 ±	p>0.05
Fosfatase	220,03 ±	237,19 ±	213,00 ± 27,10	#303,09 ±	p<

Creatinina (mg)	0,26 ± 0,02	0,18 ±	0,29 ± 0,02	0,21 ±	p>0.05
Ureia (mg dL⁻¹)	41,37 ± 2,19	39,72 ±	30,64 ± 1,87	32,04 ±	p>0.05
Ácido úrico (mg)	1,09 ± 0,12	1,39 ±	1,05 ± 0,09	1,38 ±	p>0.05
AST (U mL⁻¹)	159,05 ±	**228,27 ±	157,87 ± 10,05	196,62 ±	p>0.05*
ALT (U mL⁻¹)	57,43 ± 3,02	68,60 ±	47,55 ± 4,02	60,93 ±	p< 0.05
Albumina (mg)	2,46 ± 0,05	2,42 ±	2,46 ± 0,05	2,52 ±	p>0.05
Glicose (mg dL⁻¹)	135,55 ±	122,87 ±	*198,07 ±	^a 143,10 ±	p<
Proteínas totais	7,05 ± 0,11	6,93 ±	7,22 ± 0,11	7,20 ±	p>0.05
Triglicerídeos	53,66 ± 5,53	46,72 ±	50,82 ± 7,52	54,41 ±	p>0.05
CT (mg dL⁻¹)	57,09 ±	74,47 ±	71,70 ± 3,82	88,10 ±	p>0.05
HDL (mg dL⁻¹)	50,52 ± 2,20	61,18 ±	57,32 ± 3,10	70,87 ±	p>0.05

Animais submetidos a dieta padrão de biotério (Normonutridos) ou dieta de indução a obesidade (obesos). Normonutridos sem tratamento – NST (n= 5) e normonutridos com tratamento – NCT (n= 5), obesos sem tratamento – OST (n= 5) e obesos com tratamento – OCT (n= 5), que foram tratados com água destilada (1ml/kg) ou com a associação de Naltrexona + Bupropiona NAL/BUP (1mg+20mg). # Fosfatase alcalina elevada. **AST elevado, *Glicose elevada, a glicose reduzida em animais OCT. A* p <0.05. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Ttwo-way ANOVA para medidas repetidas seguido por Bonferroni pós-teste com valor de significância p <0.05. Analisador automatizado de Bioquímica clínica CMD 800iX1 (Wiener Lab Group).

Tabela. 2 Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre o perfil hematológico.

Parâmetros	NST	NCT	OST	OCT	P valor
Leucócitos	3,85 ±	3,79 ± 0,39	5,43 ± 0,40	5,01 ± 0,79	p> 0.05
Hemoglobina	14,98 ±	14,05 ±	13,72 ±	14,24 ±	p> 0.05
Hematócrito	42,76 ±	41,82 ±	41,12 ±	42,56 ±	p> 0.05
VCM (fL)	52,82 ±	54,75 ±	53,7 ±	53,92 ±	p> 0.05
HCM (pg)	18,50 ±	18,42 ±	17,95 ±	18,06 ±	p> 0.05
CHCM (g/dL)	35,01 ±	33,63 ±	33,43 ±	33,49 ±	p> 0.05
Plaquetas	310,54 ±	312,35 ±	^a 405,70 ±	^{*#} 528,40 ±	p<
Neutrófilos (%)	1,51 ±	1,52 ± 0,245	2,11 ±	1,76 ± 0,235	p> 0.05
Linfócitos (%)	2,13 ±	2,07 ± 0,232	3,07 ±	2,84 ± 0,535	p> 0.05
Monócitos (%)	0,02 ±	0,04 ± 0,020	0,04 ±	0,10 ± 0,071	p> 0.05
Eosinófilos (%)	0,13 ±	0,08 ± 0,027	0,17 ±	0,11 ± 0,031	p> 0.05
Basófilos (%)	0,10 ±	0,06 ± 0,020	0,04 ±	0,18 ± 0,143	p> 0.05
MPV (%)	4,10 ±	3,82 ± 0,056	3,80 ±	3,78 ± 0,047	p> 0.05
RDW (%)	10,44 ±	11,49 ±	11,45 ±	11,98 ±	p> 0.05

Os animais foram submetidos a dieta padrão de biotério (normonutridos) ou dieta ocidentalizada (obesos). Normonutrido sem tratamento – NST (n= 5) e Normonutrido com tratamento – NCT (n= 5), e obeso sem tratamento – OST (n= 5) e obeso com tratamento – OCT

(n= 5), que foram tratados com água destilada (1ml/kg) ou com a associação de Naltrexona + Bupropiona NAL/BUP (1mg+20mg). a índice plaquetário elevado em animais OST, *# Índice plaquetário elevado em animais OCT, a*# p<0,05. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Ttwo-way ANOVA para medidas repetidas seguido por Bonferroni pós-teste com valor de significância p< 0.05. Analisador automatizado hematológico Sysmex XT- 4000i (Roche®).

Conclusões

O uso da associação NAL/BUP promove redução no consumo alimentar, o que auxilia na perda do peso corporal, promovendo uma melhora nos parâmetros bioquímicos, contribuindo assim para a diminuição de doenças associadas a obesidade. Colabora também para a redução de esteatose hepática desencadeada pela obesidade, todavia, indicando estudos mais avançados sobre a redução da esteatose hepática em animais obesos.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses que poderiam ser percebidos como prejudicial à imparcialidade da pesquisa relatado.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo auxílio financeiro através do edital N° APQ-0729-4.01/15, a Capes pelo incentivo de bolsa, ao Biotério do departamento de Anatomia da Universidade Federal de Pernambuco, ao departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Referências

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/>>. Acesso em: 25 out. 2018.
- [2] Popkin, B.M.; Adair, L. S.; NG, S. W. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. **Nutrition reviews**, v. 70, n. 1, p. 3-21, 2012. ISSN 0029-6643.
- [3] STENHOLM, S.; HARRIS, T. B.; RANTANEN, T.; VISSER, M.; KRITCHEVSKY, S.B.; FERRUCCI, L. Sarcopenic obesity-definition, etiology and consequences. **Current opinion and clinical nutrition and metabolic care**, v. 11, n. 6, p. 693, 2008.
- [4] Brasil. Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativa sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de

risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016 Brasil: **Ministério da Saúde**, 2017. ISBN: 978-85-334-2479-1.

[5] ANGULO P. Nonalcoholic fatty liver disease. **The New England Journal of Medicine**. Review Article. Vol. 346, No. 16 · April 18, 2002 · www.nejm.org.]

[6] Dietrich P, Hellerbrand C (2014) Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 28 (4):637-653.

[7] Adler M, Schaffner F: Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients. **Am J Med** 67:811–816, 1979

[8] MOORE, J. B. Non-alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, n. 02, p. 211-220, 2010. ISSN 1475-2719.

[9] COHEN, J. C.; HORTON, J. D.; HOBBS, H. H. Human fatty liver disease: old questions and new insights. **Science**, v. 332, n. 6037, p. 1519-1523, 2011. ISSN 0036-8075.

[10] CHALASANI, N.; YOUNOSSI, Z.; LAVINE, J. E.; DIEHL, A. M.; BRUNT, E. M.; CUSI, K.; CHARLTON, M.; SANYAL, A. J. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. **Gastroenterology**, v. 142, n. 7, p. 1592-609, Jun 2012. ISSN 0016-5085.

[11] HAN, T. S.; LEAN, M. E. Metabolic syndrome. **Medicine**, v. 43, n. 2, p. 80-87, 2015. ISSN 1357-3039.

[12] MONTESI, L.; EL GHOCH, M.; BRODOSI, L.; CALUGI, S.; MARCHESINI, G.; DALLE GRAVE, R. Long-term weight loss maintenance for obesity: a multidisciplinary approach. **Diabetes Metab Syndr Obes**, v. 9, p. 37-46, 2016. ISSN 1178-7007 (Print) 1178-7007.

[13] SOLEYMANI, T.; DANIEL, S.; GARVEY, W. T. Weight maintenance: challenges, tools and strategies for primary care physicians. **Obes Rev**, v. 17, n. 1, p. 81-93, Jan 2016. ISSN 1467- 7881.

[14] RINELLA, M. E.; SANYAL, A. J. Management of NAFLD: a stage-based approach. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 13, n. 4, p. 196-205, Apr 2016. ISSN 1759-5045.

[15] COTRIM, HP. Doença hepática gordurosa não alcoólica. Programa de Educação Médica Continuada da **Sociedade de Hepatologia**, 2006.

- [16] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. Diretrizes brasileiras de obesidade. 4. ed. São Paulo: ABESO, 2016. Disponível em: Acesso em: 15 de fevereiro de 2019.
- [17] Billes SK, Sinnayah P, Cowley MA. Naltrexone/bupropion for obesity: an investigational combination pharmacotherapy for weight loss. **Pharmacol Res.** 2014;84:1–11. doi: 10.1016/j.phrs.2014.04.004.
- [18] Greenway FL, Dunayevich E, Tollefson G, *et al.* **NB-201 Study Group. Comparison of combined bupropion and naltrexone therapy for obesity with monotherapy and placebo.** *J Clin Endocrinol Metab*, 94 (2009), pp. 4898-906.
- [19] Cone RD. Studies on the physiological functions of the melanocortin system. **Endocr Rev.** 2006;27(7):736–749. doi: 10.1210/er.2006-0034
- [20] Liotta AS, Advis JP, Krause JE, *et al.* Demonstration of *in vivo* synthesis of pro-opiomelanocortin-, beta-endorphin-, and alpha-melanotropin-like species in the adult rat brain. **J Neurosci.** 1984;4(4):956–965.
- [21] Brady LS, Smith MA, Gold PW, Herkenham M. Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. **Neuroendocrinology.** 1990;52(5):441–447.
- [22] Fan W, Voss-Andreae A, Cao W-H, Morrison SF. Regulation of thermogenesis by the central melanocortin system. **Peptides.** 2005;26(10):1800–1813.
- [23] Pennock RL, Hentges ST. Differential expression and sensitivity of presynaptic and postsynaptic opioid receptors regulating hypothalamic proopiomelanocortin neurons. **J Neurosci.** 2011;31(1):281–288. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4654-10.2011.
- [24] Bernardis LL, Patterson BD. **Correlation between ‘Lee index’ and carcass 1130 fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions.** *Journal of 1131 Endocrinology*, 40 (1968), p. 527.
- [25] LAGE FB, GUERRA HMM, PELOGIA NCC. Efeito da farinha da casca de maracujá no peso e no índice glicêmico de ratos. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva.** São Paulo. 8 (44): pp.84 -91. 2014.
- [26] MAYHEW, T. M.; OLSEN, D. R. Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the cavalieri principle. **Journal of Anatomy**, v. 178, p. 133-144, 1991
- [27] HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased Stereology. Three-Dimensional Measurement in Microscopy**, 2. ed. Bios Scientific Publishers, 2005.

- [28] BRANCO ACSC, et al. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Rev Bras Cienc Saúde.** 15(2):209-14. 2011.
- [29] St-Onge MP, Keller KL and Heymsfield SB. **Changes in childhood food consumption patterns: A cause for concern in light of increasing body weights.** *Am J Clin Nutr*, 78 (2003), pp.1068–1073.
- [30] Vucetic Z, Carlin JL, Totoki K, et al. **Epigenetic dysregulation of the dopamine system in diet-induced obesity.** *J Neurochem*, 120 (2012), pp. 891–898.
- [31] Johnson PM and Kenny PJ. **Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats.** *Nat Neurosci*, 13 (2010), pp. 635–641.
- [32] Geiger BM, Haburcak M, Avena NM, et al. **Deficits of mesolimbic dopamine neurotransmission in rat dietary obesity.** *Neuroscience*, 159 (2009), pp. 1193–1199.
- [33] Horvath TL. **The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus.** *Nat Neurosci*, 8 (2005), pp. 561–5.
- [34] Clapper JR. et al. **Effects of amylin and bupropion/naltrexone on food intake and body weight are interactive in rodents models.** *Eur. J. Pharmacol.* 698 (2013), pp. 292-298.
- [35] Wright FL, Rodgers RJ. **Acute behavioural effects of bupropion and naltrexone, alone and in combination, in non-deprived male rats presented with palatable mash.** *Psychopharmacology (Berl)*, 228 (2013), pp. 291–307.
- [36] Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C. **Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice.** *Endocrinology*, 145 (2004), pp. 4880–4889.
- [37] Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, et al. **Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons.** *Cell Metab*, 5 (2007), pp. 181–194.
- [38] Chaston TB, Dixon JB. **Factors associated with percent change in visceral versus subcutaneous abdominal fat during weight loss: findings from a systematic review.** *Int J Obes (Lond)*, 32 (2008), pp. 619–628.
- [39] Greenway FL, Fujioka K, Plodkowski RA et al. **Effect of naltrexone plus bupropion on weight loss in overweight and obese adults (COR-I): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial.** *Lancet*, 376 (2010), pp. 595–605.
- [40] BUETTNER R, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **J Mol Endocrinol.** 36:485-501. 2006.

- [41] FRALOUB JC, et al. A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in c57bl/6 mice fed a high fat diet. **J Clin Biochem Nutr.** 46(3):1-12. 2010.
- [42] BUETTNER R, SCHOÖLMERICH J, BOLLHEIMER LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity.** 15:798-808. 2007.]
- [43] BARNEA M, SHAMAY A, STARK AH, MADAR Z. A high-fat diet has a tissue-specific effect on adiponectin and related enzyme expression. **Obesity.** 14 (12):2145-53. 2006.
- [44] CARVALHEIRA JBC, ZECCHIN HG, SAAD MJA. Bases moleculares e fisiológicas da resistência à insulina. **Hipertensão.** 5(1):33-8. 2006.
- [45] Nery M. Hipoglicemia como Fator Complicador no Tratamento do Diabetes Mellito tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 52(2):288-98. 2008.
- [46] Hollander P, Gupta AK, Plodkowski R, et al. Effects of naltrexone sustained-release/bupropion sustained-release combination therapy on body weight and glycemic parameters in overweight and obese patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care.** Dec; 36(12):4022–4029. 2013.
- [47] Motta VT. **Bioquímica Clínica para o Laboratório – Princípios e Interpretações.** Editora Médica Missau, 4º edição, 2003.
- [48] KERR MG. **Exames laboratoriais em Medicina Veterinária: Bioquímica Clínica e Hematologia.** 2. ed. São Paulo: Roca, parte II, p. 81-163, 2003.
- [49] Martins B, Matos LC. Hepatites tóxicas: Revisão da literatura. **Ver Soc Port Med Int.,** v. 12 (4), p. 239-258, 2005.
- [50] YANOVSKI SZ, YANOVSKI JA. Naltrexone-Extended Release plus Bupropion-Extended Release for Treatment of Obesity. **JAMA.** March 24; 313(12): 1213–1214. 2015.
- [51] Pappa E, Filippatos TD, Elisaf MS. Naltrexone/Bupropion ER for the treatment of obesity **Hell J Atheroscler,** 7: 131-139. 2016.
- [52] THRALL MA. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária.** Caps 21, 22, 23 e 26. São Paulo: Roca, 2007.
- [53] Martin DW, Mayes PA, Rodwell YW. Harper's Review of Biochemistry. Califórnia: **Lange Medical;** 688 p. 1981.
- [54] Brunt, E.M. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatol Res.** v.33, n.2, p. 68-71, 2005.
- [55] Miller O, Gonçalves RR. **Laboratório para o clínico.** 8. ed. São Paulo: Editora Arheneu; 607 p. 1999.

- [56] SUGANAMI T, NISHIDA J, OGAWA YA. Paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.25, n.10, p. 2062-8, 2009.
- [57] CASTRO e Silva Junior, et al. Laser enhanced effect in hepatic regeneration after partial hepatectomy in rats. **Laser Surg Med** v.28, p.1-5, 2011
- [58] SILVA SL, NASCIMENTO AA, RIBEIRO EFB, RIBEIRO RB, ALVES AM, SANTOS AM, BURMANN APR, NETO, RAM. Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas de Parahancornia amapa (Apocynaceae). **Acta Amazônica.** Vol 46 (1): 73-80. 2016.
- [59] Handin R: Bleeding and thrombosis in **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 14^a Ed. McGraw-Hill; Chapt 60: 339-345 1998.
- [60] KLASCO, R.K. (Ed). Drugdex System. Greenwood Village: Truven Health Analytics Micromedex.
- [61] Lee MW, Fujioka K. Naltrexone for the treatment of obesity: review and update. *Expert Opin Pharmacother.* 2009;10(11):1841-5.
- [62] Brasil. **Saúde de A a Z** 2013: Esteatose hepática (gordura no fígado): causas, sintomas, diagnóstico, tratamento e prevenção: Ministério da Saúde, 2013. Acessado em: 20 de maio de 2019 <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/esteatose-hepatica>
- [63] **Anvisa.** Agencia Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada- **RDC** nº 1009597 /14 - 7 10 de Novembro de 2014. Disponível em:< http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=17338362016&pIdAnexo=3465225> Acessado em: 15/ maio. 2019
- [64] CDC - **Centers for Disease Control** and Prevention Adult obesity facts. 2014. Available at: www.cdc.gov/obesity/data/adult.html. Acessado em 05 de julho de 2019.
- [65] NIH - National Cancer Institute Obesity and cancer risk. 2012. Available at: www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/obesity. Acessado em 05 de julho de 2019.
- [66] Berkson, B. M.; Rubin, D. M.; Berkson, A. J. The long-term survival of a patient with pancreatic cancer with metastases to the liver after treatment with the intravenous alpha-lipoic acid/low-dose naltrexone protocol. **Integrative Cancer Therapies**, v. 5, n. 1, p. 83-89, 2006.
- [67] Donahue, R. N.; MCLAughlin, P. J.; Zagon, I. S. Low-dose naltrexone suppresses ovarian cancer and exhibits enhanced inhibition in combination with cisplatin. **Experimental Biology and Medicine**, v. 236, p. 883-895, 2011.

- [68] LIEBER, C.S. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. **Alcohol**, v.34, n.1, p.9-19, 2004.
- [69] Illinois: Takeda Pharmaceuticals America Inc; 2014. Contrave (naltrexone HCl/bupropion HCl) prescribing information. Deerfield.
- [70] Baratta B, Rizzoli R, Galliani I, Vitale M. Early Events of Liver Regeneration in Rats: a Multiparametric Analysis. **Histochem Cell Biol** 1996; 105 (1) : 61-9.
- [71] Fladmark KE, Gjertsen BT, Molven A, Mellgren G, Vintermyr OK, Doskeland SO. Gap Junctions and Growth Control in Liver Regeneration and in Isolated Rat Hepatocytes. **Hepatology** 1997; 25 (4):847-855.
- [72] Okano K, Tsubouchi T, Yamashita Y *et al.* Hepatic Protein Synthesis in the Regenerating Rat Liver After Hepatopancreatectomy. **Surg Today** 1997; 27 : 511-17.

6 CONCLUSÕES

O estudo dos efeitos da associação naltrexona e bupropiona sobre a esteatose hepática em ratos *wistar* obesos demonstrou que as doses combinadas de NAL (1mg/kg) e BUP (20mg/kg) promove em ratos obesos, uma redução de esteatose hepática. Leva a redução na ingestão calórica, principalmente de alimentos palatáveis, o que ocasiona a perda de peso e de gordura corporal, redução das medidas do IMC e do índice de Lee. Além disso, a combinação de NAL/BUP também promove redução dos valores glicêmicos e aumenta, embora que discretamente, os níveis de colesterol HDL.

6.1 PERSPECTIVAS

Os resultados que compõe esta dissertação incentiva a dar continuidade aos estudos sobre os efeitos da associação NAL/BUP nas vias que levam a redução de medidas e alterações nas diversas doenças associadas à obesidade. Tendo em vista que este é o primeiro trabalho realizado neste sentido, fazendo necessária investigações mais detalhadas e aprofundadas, buscando um maior entendimento das vias que levam a redução de medidas e da esteatose hepática. Com o entendimento destes, listamos abaixo objetivos a serem estudados em futuros estudos com a temática estudada.

- ✓ Investigar o efeito de NAL/BUP sobre um período mais prolongado de tratamento, envolvendo um quantitativo maior de animais, além de um maior tempo para realização do tratamento;
- ✓ Investigar e correlacionar os efeitos da combinação de NAL/BUP sobre os níveis de leptina e grelina;
- ✓ Investigar e correlacionar os efeitos da combinação de NAL/BUP sobre a esteatose hepática;

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA (ABESO). **Diretrizes Brasileira de Obesidade**. 3 ed. São Paulo, 2009.

BAHIA L, Araújo DV. O impacto econômico da obesidade no Brasil. **Revista HUPE**, Rio de Janeiro, 2014;13(1):13-17v.13, n. 1, jan/mar 2014.

BAHIA L, et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. **BMC Public Health**. Jun 18; 12:440. 2012.

BEDOIGNONI G; MIGLIOLI L; MASUTTI F et al. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005.42:44-52.

BERNARDIS LL, PATTERSON BD. **Correlation between ‘Lee index’ and carcass 1130 fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions**. *Journal of 1131 Endocrinology*, 40 (1968), p. 527.

BILLES SK, GREENWAY FL. Combination therapy with naltrexone and bupropion for obesity. *Expert Opin Pharmacother*. 2011;12(11):1813–1826.

BILLES SK, SINNAYAH P, COWLEY MA. Naltrexone/bupropion for obesity: an investigational combination pharmacotherapy for weight loss. *Pharmacol Res*. 2014;84:1–11. doi: 10.1016/j.phrs.2014.04.004.

BOUCHARD C. Physical activity and obesity. **Human Kinetics**, Champaign, 2000.

BRADY LS, SMITH MA, GOLD PW, HERKENHAM M. Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology*. 1990;52(5):441–447.

BRANCO ACSC, et al. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Rev Bras Cienc Saúde**. 15(2):209-14. 2011.

BRANDÃO DC, SILVA CARLOS AB. Investigação do perfil antropométrico dos praticantes de Caminhada/corrida. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, São Paulo, v.6, n.36, p.552-559. Nov/Dez. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Plano Nacional e Saúde - PNS 2012-2015: Textos Básicos de Saúde. [Acesso em: 17/abril/2019]. Disponível em: http://conselho.saude.gov.br/biblioteca/Relatorios/plano_nacional_saude_2012_2015.pdf

BRASIL. **Saúde de A a Z 2013: Esteatose hepática (gordura no fígado): causas, sintomas, diagnóstico, tratamento e prevenção**: Ministério da Saúde, 2013. Acessado em: 20 de maio de 2019 <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/esteatose-hepatica>

BROWNING, J. D.; SZCZEPANIAK, L. S.; DOBBINS, R. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. **Hepatology**, v. 40, n. 1, p.387-395, 2004.

BRUNT, E. M., KLEINER, D. E., WILSON, L. A., BELT, P., BRENT, A., & NeuschwanderTetri. (2011). The NAS and the histopathologic diagnosis of NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology*, 53(3), 810–820.

CARR, R. M., ORANU, A., & KHUNGAR, V. (2016). Nonalcoholic fatty liver disease: pathophysiology and management. *Gastroenterology Clinics of North America*, 45(4), 639–652.

CARVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Doenças associadas à resistência à insulina/ hiperinsulinemia, não incluídas na Síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros Endocrinologia Metabolismo**, v. 50, n. 2, p. 360-367,2006.

CAVALCANTE, TCF et al. Effects of a Westernized Diet on the Reflexes and Physical Maturation of Male Rat Offspring During the **Perinatal Period**. **Lipids**, 2013 VOL. 48, p. 1157-1168.

CHARATCHAROENWITTHAYA, P., LINDOR, K. D., & ANGULO, P. (2012). The spontaneous course of liver enzymes and its correlation in nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 57, 1925–1931.

CLARK, J.M.; BRANCATI, F.L.; DIEHL,A.M. Nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**. v. 346, n. 1, p. 221-231, 2002.

CONE RD. Studies on the physiological functions of the melanocortin system. **Endocr Rev**. 2006;27(7):736–749. doi: 10.1210/er.2006-0034

COTRIM HP, DE FREITAS LA, FREITAS C, BRAGA L, SOUSA R, CARVALHO F, ET AL. Clinical and histopathological features of **NASH** in workers exposed to chemicals with or without associated metabolic conditions. 2006.

COUTINHO WF, CABRAL MDA. Farmacoterapia da obesidade nos consensos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v.44, n.01, p.91-94, fev. 2000.

DELHANTY PJ, NEGGERS SJ, VAN DER LELY AJ. Des-acyl ghrelin: a metabolically active peptide. **Endocr Dev**. 2013;25:112-21.

DELPORTE C. Structure and physiological actions of ghrelin. **Scientifica** (Cairo). 2013;2013:ID518909.

DUARTE ACG, FAILLACE GBD, WADI MT, PINHEIRO RL. **Síndrome Metabólica Semiologia, Bioquímica e Prescrição Nutricional**. São Paulo: Axcel Books do Brasil Editora Ltda; 2005 estimates of brain volume determined using the cavalieri principle. **Journal of Anatomy**, v. 178, p. 133-144, 1991.

FAN W, VOSS-ANDREAE A, CAO W-H, MORRISON SF. Regulation of thermogenesis by the central melanocortin system. *Peptides*. 2005;26(10):1800–1813.

FARIA AM, MANCINI MC, MELO MEDE, CERCATO C, HALPERN A. Progressos recentes e novas perspectivas em farmacoterapia da obesidade. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.** 54, 516–529; 2010.

Food and Drug Administration **FDA** aprova a droga de controle de peso Contrave. 2014. Disponível em: www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/. Acessado em 1 de junho de 2019.

FISBERG M, OLIVEIRA CL. Obesidade na infância e adolescência: uma verdadeira epidemia. **Arq Endocrinol Metab**; 47: 107-108. 2003.

FORTES RC, GUIMARÃES NG, HAACK A, TORRES AAL, CARVALHO KMB. Orlistat e sibutramina: bons coadjuvantes para perda e manutenção de peso?. **Rev Bras Nutr Clin.**; 21(3): 244-51. 2006.

FRANCISCHI RPP, PEREIRA LO, FREITAS CS, KLOPFER M, SANTOS RC, VIEIRA P, LANCHÁ-JUNIOR AH. Obesity: updated information about its etiology, morbidity and treatment. **Rev. Nutr.** 13:17-28. 2000.

GAGLIARDI, J. Obesidade: conceito e avaliação. **Nutrição Saúde e Performance**, v. 3, n. 14, p. 5-7, dez. 2001.

GARTNER, L. P.; HIAT, L. P. **Tratado de Histologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2003, p. 456.

GONZÁLEZ-MUNIESA P, MÁRTINEZ-GONZÁLEZ MA, HU FB, DESPRÉS JP, MATSUZAWA Y, et al. Obesity. **Nature Reviews | Disease Primers** Volume 3 | Article Number 17034. 2017 Jun 15

GREENWAY FL, WHITEHOUSE MJ, GUTTADAURIA M, ET AL. Rational design of a combination medication for the treatment of obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17(1):30–39. doi: 10.1038/oby.2008.461.

GUILÁ MVM. Obesidad: interrelación genética ambiental. **Rev. Méd. Clín. Condes** 14(3): [6 p.]. 2003.

GUY-GRAND B. Long-term pharmacotherapy in the management of obesity. In: BJÖRNTORP P, RÖSSNER S, editors. *From Theory to Practice: Obesity in Europe*: 88. London: **John Libbey**, 311-8; 1989.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2002, p. 973.

HAFEEZ S, AHMED MH. Bariatric Surgery as Potential Treatment for Nonalcoholic Fatty? Liver Disease: A Future Treatment by Choice or by Chance, **Journal of Obesity**. 201:11; 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3569911/pdf/JOBES2013-839275.pdf>>. Acesso em 05 de novembro de 2017.

HARISON et al. **Harrison medicina interna**. 17 edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill. vol. 1. 2008.

NEGRÃO BA, LICINO J. Leptina: O Diálogo Entre Adipócitos e Neurônios. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**. Vol. 44. Num. 3. p. 205-214. 2000.

HASLAM, D. W.; JAMES, W. P. Obesity. **Lancet**, v. 366, n. 9492, p. 1197-209, Oct 1 2005. ISSN 0140-6736.

HERNANDES F, PEREIRA M. Obesidade: causas e consequências em crianças e adolescentes. : **revista da Faculdade de Educação Física da UNICAMP**, Campinas, v. 8, n. 3, p. 47-63, set./dez. 2010.

HOWARD AD, FEIGHNER SD, CULLY DF, ARENA JP, LIBERATOR PA, ROSENBLUM CI, ET AL. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. **Science**. 1996;273(5277):974-7.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased Stereology. Three-Dimensional**

ILLINOIS: TAKEDA **Pharmaceuticals America** Inc; 2014. Contrave (naltrexone HCl/bupropion HCl) prescribing information. Deerfield.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008- 2009: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos do Brasil. Rio de Janeiro: **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**; 2010.

KATSIKI, N.; MIKHAILIDIS, D. P.; MANTZOROS, C. S. Non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: An update. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 65, n. 8, p. 1109–1123, 2016.

KHAN A, RAZA S, KHAN Y, AKSOY T, KHAN M, WEINBERGER Y, GOLDMAN J. Current updates in the medical management of obesity. **Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov**, 6(2), 117-128. 2012.

LAGE FB, GUERRA HMM, PELOGIA NCC. Efeito da farinha da casca de maracujá no peso e no índice glicêmico de ratos. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**. São Paulo. 8 (44): pp.84 -91. 2014.

LIOTTA AS, ADVIS JP, KRAUSE JE, ET AL. Demonstration of *in vivo* synthesis of pro-opiomelanocortin-, beta-endorphin-, and alpha-melanotropin-like species in the adult rat brain. **J Neurosci**. 1984;4(4):956–965.

LÓPEZ M, TOVAR S, VÁZQUEZ MJ, WILLIAMS LM, DIÉGUEZ C. Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. **Proc Nutr Soc**. 2007;66(1):131-55.

MAYHEW, T. M.; OLSEN, D. R. Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free

MCPHERSON, S. et al. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosingsteatohepatitis using paired biopsies: Implications for prognosis and clinical management. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 5, p. 1148–1155, 2015.

MEASUREMENT IN MICROSCOPY, 2. ed. **Bios Scientific Publishers**, 2005.

MENDONÇA CP, ANJOS LA. Dietary and physical activity factors as determinants of the increase in overweight/obesity in Brazil. **Cad. Saúde Pública**. 20: 698-709; 2004.

MONTAGUE CT, FAROOQI IS, WHITEHEAD JP, SOOS MA, RAU H, WAREHAM NJ, ET AL. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. **Nature**. 1997;387(6636):903-8.

NEUMAN, M. G.; COHEN, L. B.; NANAU, R. M. Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease. **Canadian journal of gastroenterology & hepatology**, v. 28, n. 11, p. 607–18, 2014

OH H, JUN DW, SAEED WK, NGUYEN MH. Non-alcoholic fatty liver diseases: update on the challenge of diagnosis and treatment. **Clinical and Molecular Hepatology** 2016;22:327-335

OLIVEIRA, C. P. M. S.; MELLO, E. S. M.; ALVES, A. F. Esteato-Hepatite Não Alcoólica e Doença Hepática Alcoólica. In: **Clínica Médica**. v. 4, Barueri, SP: Manole, 2009, p. 316-327.

OLSZEWSKI PK, LI D, GRACE MK, BILLINGTON CJ, KOTZ CM, LEVINE AS. Neural basis of orexigenic effects of ghrelin acting within lateral hypothalamus. **Peptides**. 2003;24(4):597-602.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/ (OMS/OPAS). **Panorama da Segurança Alimentar e Nutricional na América Latina e Caribe**. Disponível em: <<http://www.paho.org/bra/index.>>. Acesso em: 25 out. 2017.

PENNOCK RL, HENTGES ST. Differential expression and sensitivity of presynaptic and postsynaptic opioid receptors regulating hypothalamic proopiomelanocortin neurons. **J Neurosci**. 2011;31(1):281–288. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4654-10.2011.

PIMENTEL, C. F. M. G.; LAI, M. Nutrition Interventions for Chronic Liver Diseases and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Medical Clinics of North America**, v. 100, n. 6, p. 1303–1327, 2016.

REPETTO G, RIZZOLLI J, BONATTO C. Prevalência, riscos e soluções na obesidade e sobrepeso: Here, There and Everywhere. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. Vol. 47. Num. 6. p. 633- 635. 2003.

ROLO, A. P.; TEODORO, J. S.; PALMEIRA, C. M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 59–69, 2012.

ROUILLER, C. The liver. London: Academic Press Inc., 1964. v. 2, p. 674

Sass D A, Chang P, Chopra K B. **Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A clinical review.** *dig dis sci*, 2005;50: 171-80.

MATTHEW M. SHERMAN, SINZIANA UNGUREANU, JOSE A. REY
Naltrexone/Bupropion ER (Contrave) Newly Approved Treatment Option for Chronic Weight Management in Obese Adults. **Pharmacy And Therapeutics**. 2016

Sinnayah P, Wallingford N, Evans A, Cowley MA. Bupropion and naltrexone interact synergistically to decrease food intake in mice [Abstract] **Obesity** (Silver Spring) 2007;15(9):A179.

TOMINAGA K, KURATA JH, CHEN YK, FUJIMOTO E, MIYAGAWA S, ABE I, ET AL.
Prevalence of fatty liver in Japanese children and relationship to obesity. An epidemiological ultrasonographic survey. **Dig Dis Sci**. 1995;40:2002-9.

TSCHÖP M, WAWARTA R, RIEPL RL, FRIEDRICH S, BIDLINGMAIER M, LANDGRAF R, ET AL. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. **J Endocrinol Invest**. 2001;24(6):RC19-21

WANDERLEY EM, FERREIRA VA. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciênc Saúde Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 185-194, 2010.

WANNMACHER L. Obesidade: evidências e fantasmas. **Rev. Uso Racional de Medicamentos**, v. 1, n. 3, p. 1-6, 2004.

YANG, K. C., HUNG, H. F., LU, C.W., CHANG, H.H., LEE, L.T., & HUANG, K.C. (2016). Association of non-alcoholic fatty liver disease with metabolic syndrome independently of central obesity and insulin resistance. **Nature**, 6(1), 1-10.

YOUNOSSI, Z. M. et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease— Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, v. 64, n. 1, p. 73–84, 2016.

ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM.
Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372

**ANEXO A - OFÍCIO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CB/UFPE**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS - CB
COMISSÃO DE ÉTICA DE USO ANIMAL - CEUA**



CB - UFPE

PARECER

Certificamos que a proposta intitulada **“Efeito da associação naltrexona/bupropiona sobre a via de sinalização dopaminérgica do comportamento alimentar, perfil bioquímico e aspectos histomorfométricos em fígado de ratos wistar obesos”**, registrada com o nº 23076.053208/2014-57 do processo, sob a responsabilidade da **Prof. Manuela Figueiroa Lira de Freitas**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em reunião no dia 27/08/2019.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	27/08/2019 a 02/01/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato Isogênico
Nº de animais	54
Peso/Idade	50- 250/ 30,060 e 90 dias
Sexo	Macho (42) e Fêmea (12)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE.
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE.

Atenciosamente


 Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691

Reconhecer e Empreender para o Futuro
 Centro de Biociências - UFPE
 Av. Moraes Rego, S/N. Cidade Universitária, Recife (PE), 50670-420.