

**Efeito da rutina no tratamento da cirrose hepática induzida por tioacetamida:
estudo experimental em ratos****Effect of rutin in the treatment of thioacetamide-induced liver cirrhosis:
experimental study in rats**

DOI:10.34117/bjdv6n9-042

Recebimento dos originais: 08/08/2020

Aceitação para publicação: 02/09/2020

Vinícius Vigliuzzi Peghinelli

Graduado em Nutrição pelo Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO
Endereço: Rua Irmã Arminda 10-50, Bairro Jardim Brasil - Bauru, SP, CEP: 17011-160
E-mail: v_vigliuzzi@hotmail.com

Lucas Valotti

Graduado em Nutrição pelo Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO
Endereço: Rua Irmã Arminda 10-50, Bairro Jardim Brasil - Bauru, SP, CEP: 17011-160
E-mail: lucas.valotti@gmail.com

Danilo Malmonge Barbosa Luciano

Graduando em Nutrição pelo Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO
Endereço: Rua Irmã Arminda 10-50, Bairro Jardim Brasil - Bauru, SP, CEP: 17011-160
E-mail: malmonge97@gmail.com

Bárbara Nívea Fedato

Graduando em Nutrição pelo Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO
Endereço: Rua Irmã Arminda 10-50, Bairro Jardim Brasil - Bauru, SP, CEP: 17011-160
E-mail: barbarafedato@gmail.com

Maria Angélica Martins Lourenço Rezende

Mestra em Fisiopatologia em Clínica Médica pela Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP
Docente no Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO
Endereço: Rua Irmã Arminda 10-50, Bairro Jardim Brasil - Bauru, SP, CEP: 17011-160
E-mail: angelyca.lourenco@gmail.com

Natália Baraldi Cunha

Doutora pela Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP
Docente no Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO
Endereço: Rua Irmã Arminda 10-50, Bairro Jardim Brasil - Bauru, SP, CEP: 17011-160
E-mail: nataliabcunha@gmail.com

RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito hepatoprotetor da rutina no desenvolvimento da cirrose hepática experimental induzida por Tioacetamida (TAA). Esta droga foi administrada intraperitonealmente 3 vezes por semana, durante 8 semanas. Foram avaliados 30 ratos machos da raça Wistar, divididos em 3 grupos, cada grupo com 10 animais: G1 (controle); G2 (TAA) e G3 (TAA + Rutina a 50mg/kg diluída em óleo de soja no volume de 100µL, no mesmo período). Foram realizadas avaliações da função hepática: alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), bem como análise histopatológica do fígado dos animais por método estabelecido pela Sociedade Brasileira de Hepatologia. As comparações entre os grupos foram feitas pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Teste de Tukey para as variáveis com distribuição normal e Teste de Kruskal-Wallis seguido de Teste de Dunn quando as variáveis apresentaram distribuição não-normal. O nível de significância foi de 5% ($p < 0.05$). Em nosso estudo o grupo tratado com rutina apresentou efeito hepatoprotetor demonstrado pela ALT, maior ganho de peso, consumo de ração e aproveitamento nutricional. A rutina também foi eficaz em prevenir o desenvolvimento de nódulos cirróticos, mas não de infiltrado inflamatório e focos de necrose.

Palavras-chave: Cirrose Hepática, Rutina, Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

This study aimed at assessing the hepatoprotective effect of rutin in the development of experimental hepatic cirrhosis induced by Thioacetamide (TAA). This drug was administered intraperitoneally 3 times a week during 8 weeks. 30 Wistar male rats were assessed, distributed into 3 groups with 10 animals each: G1 (control), G2 (TAA) and G3 (TAA + 50mg/kg rutin diluted in soybean oil to a 100µL volume in the same period). The following hepatic function examinations were performed: alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST), as well as histopathologic analysis of the animals' livers through a method established by the Brazilian Society of Histopathology. Comparisons between groups were executed through one-way variance analysis (ANOVA) followed by Tukey Test for normal distribution variables, and Kruskal-Wallis Test followed by Dunn Test when variables presented non-normal distribution. The significance level was 5% ($p < 0.05$). In our study the group treated with rutin presented a hepatoprotective effect evident by ALT, as well as higher weight gain, feed consumption and superior nutritional use. Rutin was also efficient in preventing the development of cirrhotic nodules, but not the advance of inflammatory infiltrate and necrotic foci.

Key words: Hepatic Cirrhosis, Rutin, Oxidative Stress.

1 INTRODUÇÃO

O consumo abusivo de álcool é uma pandemia que preocupa as autoridades de saúde pública ao redor de todo o mundo. Garcia e Freitas (2015), após revisão dos dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) de 2013, descreveram a prevalência de 13,7% no consumo excessivo de etanol pela população brasileira. Os autores acreditam que, de forma generalizada, a ascensão do consumo de álcool, no Brasil, deve-se à dedicação discreta de políticas públicas a este tema, bem como ao incentivo e aceitação socioeconômica da prática de se ingerir bebidas alcoólicas. (BRASIL, 2013).

As doenças gastroenterológicas constituem a sétima causa de morte no Brasil, sendo a cirrose hepática a primeira entre elas. Por ser uma doença assintomática na fase inicial em 40% dos

pacientes, o diagnóstico geralmente é tardio, no momento em que a doença se encontra já descompensada, e os gastos humanos e econômicos podem equiparar a perda média de 12 anos de vida produtiva. (CUPPARI, 2014).

No fígado ocorre a metabolização de 90% do álcool ingerido, através das vias oxidativa e não oxidativa. A via oxidativa é mais relevante ao desenvolvimento da doença hepática alcoólica e compreende a metabolização do etanol nos hepatócitos através da enzima álcool desidrogenase (ADH) e através do sistema microsomal de oxidação do etanol (MEOS) - quando o nível de etanol no sangue se eleva. Ambas as vias culminam na produção intermediária de acetaldeído, produto tóxico responsável por parte considerável do processo fibrótico antecessor à doença hepática alcoólica. (CABALLERIA, 2003; POOLE; DOLIN; ARTEEL, 2017).

O MEOS ocorre no retículo endoplasmático dos hepatócitos, com a participação enzimática do Citocromo P-450 e do Citocromo P-450 2E1 - quando a concentração sérica de etanol está elevada -. A produção do Citocromo P-450 2E1 contribui significativamente com o processo de estresse oxidativo, pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO's). O dano oxidativo é proeminente para o processo fibrótico antecessor à cirrose hepática alcoólica. Os radicais livres causam peroxidação lipídica dos lipídios insaturados das membranas celulares, com a produção de aldeídos reativos, cujos principais são: malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinoneal. Os aldeídos reativos, o acetaldeído e a alta concentração de endotoxinas – característica típica dos alcoolistas - são capazes de ativar Células de Kupffer, que por sua vez produzem citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (FNT-alfa), a interleucina-1 (IL-1) e o fator de transformação e crescimento (TGF-beta). (JESUS; OLIVEIRA; LYRA, 2014).

As citocinas ativam as células estrelares, que se diferenciam em miofibroblastos e depositam colágeno tipo 1 e demais proteínas da matriz extracelular no espaço de Disse, formando nódulos de regeneração que modificam a arquitetura do fígado de forma irreversível, caracterizando a cirrose hepática alcoólica. (JESUS; OLIVEIRA; LYRA, 2014).

Agindo antagonicamente ao dano oxidativo causado pelas ERO's, existem diversos mecanismos antioxidantes no organismo humano. Estes, por sua vez, constituem-se em dois sistemas, são eles: o sistema antioxidante enzimático e o sistema antioxidante não-enzimático. O sistema antioxidante não-enzimático é constituído por uma variedade de antioxidantes enxógenos, principalmente, de fonte dietética, possuindo sua origem em vitaminas, minerais e compostos fitoquímicos, com grande destaque para os fenólicos. (BARBOSA et al., 2010).

Dentre as classes de compostos fenólicos existem os flavonóides, os quais apresentam-se em diferentes concentrações na natureza, distribuídos por uma larga variedade de espécies do reino

vegetal, apresentando em comum sua estrutura química baseada no núcleo flavilum formado por três anéis fenólicos. (ANGELO; JORGE, 2007; BECHO et al., 2009).

A rutina é um flavonól – subclasse dos flavonóides -, encontrado abundantemente em produtos de origem vegetal, principalmente em plantas, maçã, chá preto, vinho tinto, tomates, feijão vermelho, uva, trigo sarraceno e cebola. (BECHO et al., 2009; HARBORNE, 1986 citado por GANESHPURKAR; SALUJA, 2016). Em decorrência de descobertas recentes, a rutina tem despertado interesse de pesquisadores e da indústria farmacêutica por seus efeitos anticarcinogênico, citoprotetor, neuroprotetor, cardioprotetor, vasoprotetor e hepatoprotetor, além da baixa toxicidade. (BECHO et al., 2009; GANESHPURKAR; SALUJA, 2016).

Estudo realizado por Afanas'ev et al. (1989) concluiu que a rutina apresenta ação potencialmente benéfica sobre doenças cuja a etiologia esteja relacionada ao estresse oxidativo. Diversos estudos vêm sendo realizados no sentido de avaliar a função de antioxidantes de origem alimentar sobre a patogênese da cirrose hepática, sendo o dano oxidativo o principal fator responsável pelo desenvolvimento da fibrose. (BECHO et al., 2009).

A tioacetamida (TAA) é um composto organossulfuroso utilizado em métodos experimentais de indução de fibrose hepática em ratos. A metabolização da TAA in vivo causa peroxidação lipídica e estresse oxidativo, através da produção de ERO's – situação semelhante ao desenvolvimento de fibrose hepática em humanos. Portanto, a administração de TAA em ratos representa uma metodologia segura e eficaz para estudos experimentais da doença hepática alcoólica. (EL-MIHI et al., 2017).

Diante do exposto, este trabalho visa contemplar a ação terapêutica da rutina no processo de cirrose hepática.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Apresenta-se abaixo os tópicos da metodologia da pesquisa.

2.1 ANIMAIS

Após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo de nº 6191060318 foram avaliados 30 ratos machos da raça Wistar, proeminentes do Biotério do Centro Universitário Sagrado Coração, pesando entre 180 a 200g. Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas, com a temperatura mantida em torno de 22 a 23°C e a luz em ciclos de 12h, alternando entre claro e escuro, com acesso *ad libitum* à água e à ração padronizada, conforme a distribuição pelos grupos.

Todos os cuidados com manutenção dos animais, procedimento anestésico, cirurgia e eutanásia foram executados segundo recomendações contidas no guia do Canadian Council of Animal Care (OLFERT; CROSS; MCWILLIAM, 1993) e na Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. (DE LUCA et al., 1996).

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A cirrose hepática foi induzida nos animais dos grupos hepatotóxicos com TAA diluída em solução aquosa a 4% e foi administrada por via intraperitoneal, três vezes por semana, à proporção de 200 mg/kg de peso, durante 8 semanas, conforme descrito por Amin et al. (2012). O grupo tratado recebeu, por gavagem, o antioxidante rutina na dose de 50mg/kg/dia dissolvida em óleo de soja, conforme descrito por Khan et al. (2012), no mesmo período de indução da doença. Durante as oito semanas de experimento, os animais foram pesados semanalmente para o cálculo das quantidades de TAA e rutina administradas. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos:

- a) G1 (n=10): No qual foi administrado diariamente água, durante 8 semanas (Controle);
- b) G2 (n=10): Administração de 200 mg/kg de peso de TAA diluída em solução aquosa a 4%, aplicada intraperitonealmente, 3 vezes por semana, durante 8 semanas (Hepatotóxico);
- c) G3 (n=10): Administração de 200 mg/kg de peso de TAA diluída em solução aquosa a 4%, aplicada intraperitonealmente, 3 vezes por semana, durante 8 semanas + administração diária de Rutina na dose de 50mg/kg diluída em óleo de soja, no mesmo período (Hepatotóxico + Rutina).

2.3 OBSERVAÇÕES E MEDIDAS REALIZADAS DURANTE O EXPERIMENTO

Apresenta-se abaixo os tópicos referentes às medidas realizadas durante o experimento.

2.3.1 Ganho de Peso

Os animais foram pesados no primeiro dia do experimento (PI) e no último dia (PF) em balança semi-analítica Mettler Toledo (modelo PB 3002, peso máximo = 3.100 g, peso mínimo = 0,5 g, sensibilidade de 0,1 g) e o ganho de peso foi obtido pela diferença entre o PF e o PI.

2.3.2 Ração Ingerida

A quantidade de ração ingerida, em gramas, foi determinada diariamente pela diferença entre o peso da ração oferecida (g) e o peso da ração rejeitada (g). A ração foi pesada em balança semi-analítica Mettler Toledo (modelo PB 3002, peso máximo = 3.100 g, peso mínimo = 0,5 g, sensibilidade de 0,1 g).

2.3.3 Aproveitamento nutricional

O aproveitamento nutricional foi obtido através da divisão do ganho de peso do PI ao PF, pela quantidade de ração ingerida em gramas do PI ao PF.

Quadro 1 – Fórmula do aproveitamento nutricional

<i>Aproveitamento Nutricional</i>	Ganho de peso (g)
	Ração ingerida (g)

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.4 EUTANÁSIA

A eutanásia foi realizada ao final das oito semanas, após anestesia intramuscular com os anestésicos Cloridrato de Ketamina (100mg/kg de peso) e com Cloridrato de Xilosina (10mg/kg de peso), por exsanguinação através de punção cardíaca. O sangue foi colhido neste momento para a realização dos exames bioquímicos séricos.

2.5 MEDIDAS REALIZADAS APÓS A EUTANÁSIA

Apresenta-se abaixo os tópicos referentes às medidas realizadas após a eutanásia.

2.5.1 Exames Bioquímicos

A coleta de sangue foi feita por punção cardíaca, com separação do soro, e foi enviada para o Laboratório de Análises e Pesquisas Clínicas Fundação Véritas – Bauru/SP, para a realização das análises.

Dosagem Sérica de ALT e AST

As atividades séricas de AST e ALT foram determinadas por método de absorção de raios Ultra Violetas (UV) otimizado, no aparelho Technicon®, modelo RAXT, e os valores foram expressos em unidades internacionais por litro (UI/L).

2.5.2 Análise Histopatológica

Um fragmento longitudinal de 0,3 a 0,5cm de espessura do lobo direito do fígado de cada animal foi fixado em solução de formol em salina a 10% v/v por 48 horas, em seguida imerso em álcool a 70% por 24 horas. As lâminas histológicas foram preparadas pelos métodos de rotina do Laboratório de Biologia/Histologia do Departamento de Ciências da Saúde do Centro Universitário

Sagrado Coração. As secções de 0,4 a 0,5µm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina (HE).

As lâminas de todos os grupos foram analisadas individualmente, de maneira aleatória sem o conhecimento dos grupos a que pertencia o material observado. Toda a extensão da secção do fígado de cada animal foi analisada e a intensidade das alterações foram mensuradas por um método semi-quantitativo, estabelecido pela Sociedade Brasileira de Hepatologia que analisa por meio de frequência a presença de alterações estruturais, de infiltrado inflamatório portal/septal e a atividade peri-porta/septal e parenquimatosa. Além disso, foram intensificadas as áreas de apoptose. (GAYOTTO, 2000).

2.5.3 Análise Estatística

As comparações entre os grupos foram feitas pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de Teste de Tukey para as variáveis com distribuição normal e Teste de Kruskal-Wallis seguido de Teste de Dunn quando as variáveis apresentaram distribuição não-normal. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0.05$).

3 RESULTADOS

A Tabela 1 mostra o peso aferido dos animais no início e final do experimento e o ganho de peso ao longo do estudo. Pode-se observar que, no momento inicial não houve diferença de peso entre os grupos, demonstrando a homogeneidade entre os animais. O peso final mostra que o grupo G2 apresenta menor valor estatístico quando comparado a G1 e G3, sem diferença entre estes. A última avaliação ilustra que o grupo G2 apresentou menor ganho de peso comparado aos outros dois grupos e G3 apresentou menor ganho comparado a G1.

Tabela 1 – Avaliação do peso inicial, final e ganho de peso dos animais, segundo grupo

Média dos Parâmetros	G1	G2	G3	p
Peso Inicial (g)	301,4 ± 37,6 ^a	302,7 ± 25,9 ^a	305,7 ± 20,7 ^a	0,09
Peso Final (g)	313,5 ± 33,02 ^a	279,6 ± 22,29 ^b	308,9 ± 25,18 ^a	0,02
Ganho de peso (g)	12,1 ± 20,7 ^a	-23,1 ± 20,1 ^b	3,2 ± 17,0 ^c	<0,001

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota 1: G1: Grupo Controle; G2: Hepatotóxico; G3: Hepatotóxico+Rutina.

Nota 2: Proporções da mesma letra minúscula em uma categoria não diferem na comparação de grupos ($p > 0,05$).

Nota 3: Dados foram expressos como média ± desvio padrão.

Verificando a ingestão de ração pelos animais, pode-se observar que o grupo G3 teve um consumo alimentar significativamente maior em comparação com G1 e G2. Não foi demonstrada diferença estatística de consumo entre G1 e G2. Ao avaliar o aproveitamento nutricional, observou-se que o grupo G3 apresentou melhor aproveitamento comparado com o G2, e se mostrou semelhante ao G1 (tabela 2).

Tabela 2 - Avaliação do consumo de ração entre os grupos

	G1	G2	G3	p
Consumo de ração (g)	21,0 (18,0 – 25,2) ^a	19,1 (15,4 - 22,5) ^a	35,8 (32,3 – 38,7) ^b	<0,001
Aproveitamento nutricional	0,47 ± 0,49 ^a	-1,1 ± 1,05 ^b	0,09 ± 0,48 ^a	<0,001

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota 1: G1: Grupo Controle; G2: Hepatotóxico; G3: Hepatotóxico+Rutina.

Nota 2: Proporções da mesma letra minúscula em uma categoria não diferem na comparação de grupos ($p > 0,05$).

Nota 3: Dados foram expressos em mediana (incluindo o menor e maior quartil).

A tabela 3 ilustra os exames bioquímicos séricos de AST e ALT. Pode-se verificar que, na análise de AST os grupos G2 e G3 não se diferenciaram estatisticamente entre si e ambos foram significativamente maiores que G1. No entanto, ao avaliar ALT, pode-se notar que G3 foi significativamente menor que G2, não demonstrando diferença estatística quando comparado a G1.

Tabela 3 - Avaliação dos exames sanguíneos das enzimas AST e ALT

	G1	G2	G3	p
AST (U/L)	99 (84,7 – 125,0) ^a	168 (137,0 - 265,2) ^b	159 (139,5 – 200,2) ^b	0,003
ALT (U/L)	85,0 (82,8 – 94,6) ^a	110,5 (95,2 – 150,1) ^b	70,3 (66,4 – 88,5) ^a	<0,001

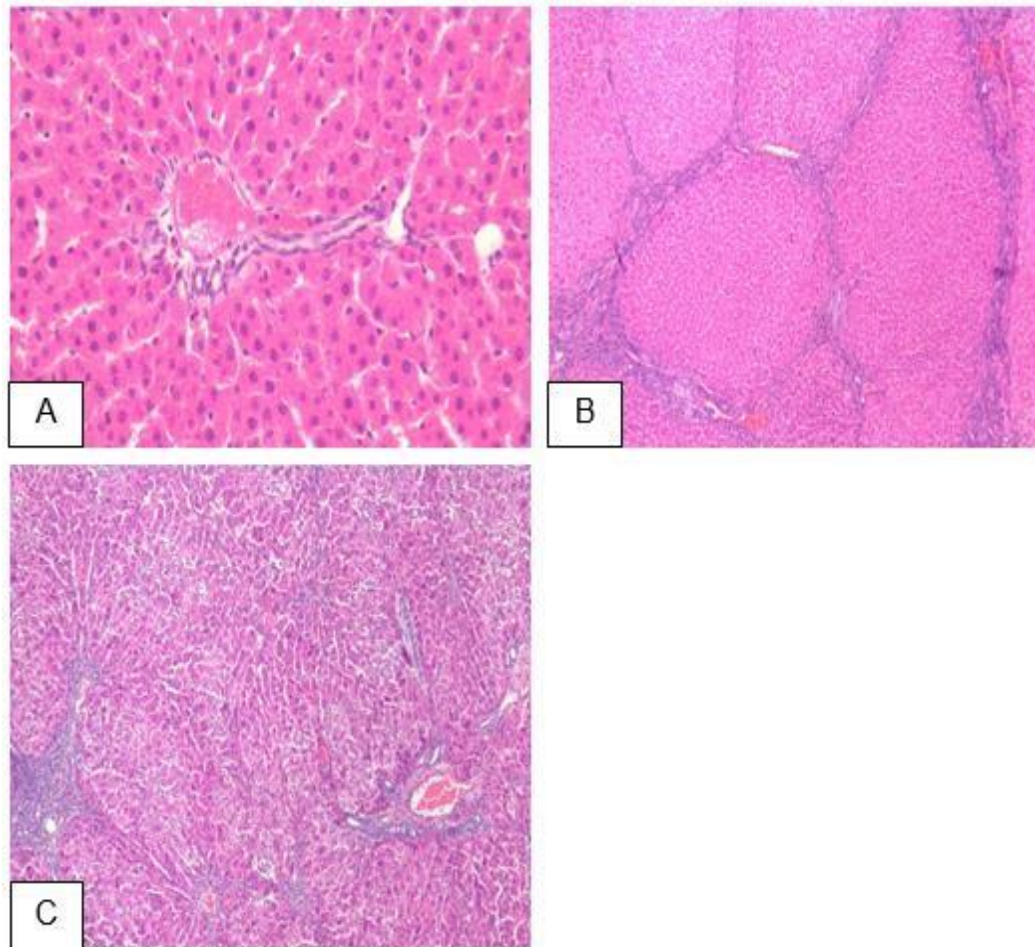
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota 1: G1: Grupo Controle; G2: Hepatotóxico; G3: Hepatotóxico+Rutina; AST: Aspartato transaminase; ALT: Alanina aminotransferase.

Nota 2: Proporções da mesma letra minúscula em uma categoria não diferem na comparação de grupos ($p > 0,05$).

Nota 3: Dados foram expressos em mediana (incluindo o menor e maior quartil).

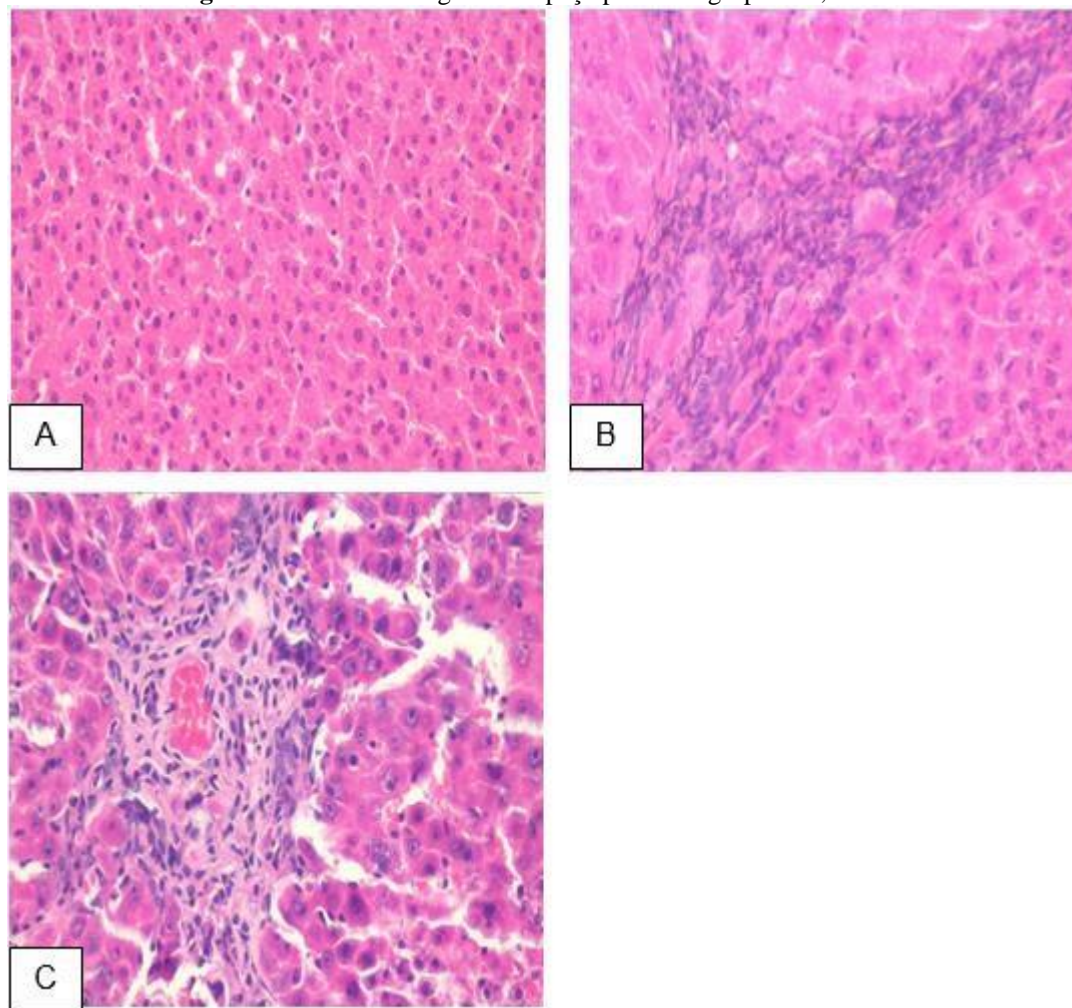
Os cortes histológicos do tecido hepático dos grupos G1, G2 e G3 ilustram a presença de nódulos cirróticos bem definidos no grupo G2 quando comparado a G3. Porém, é possível observar focos de fibrose em G3, ao contrário do que ocorre em G1 (figura 2).

Figura 1 – Corte histológico do tecido hepático dos grupos G1, G2 e G3.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (A) Corte histológico do tecido hepático, HE, aumento 4x, grupo G1; (B) Corte histológico do tecido hepático, HE, aumento 4x, grupo G2; (C) Corte histológico do tecido hepático, HE, aumento 4x, grupo G3.

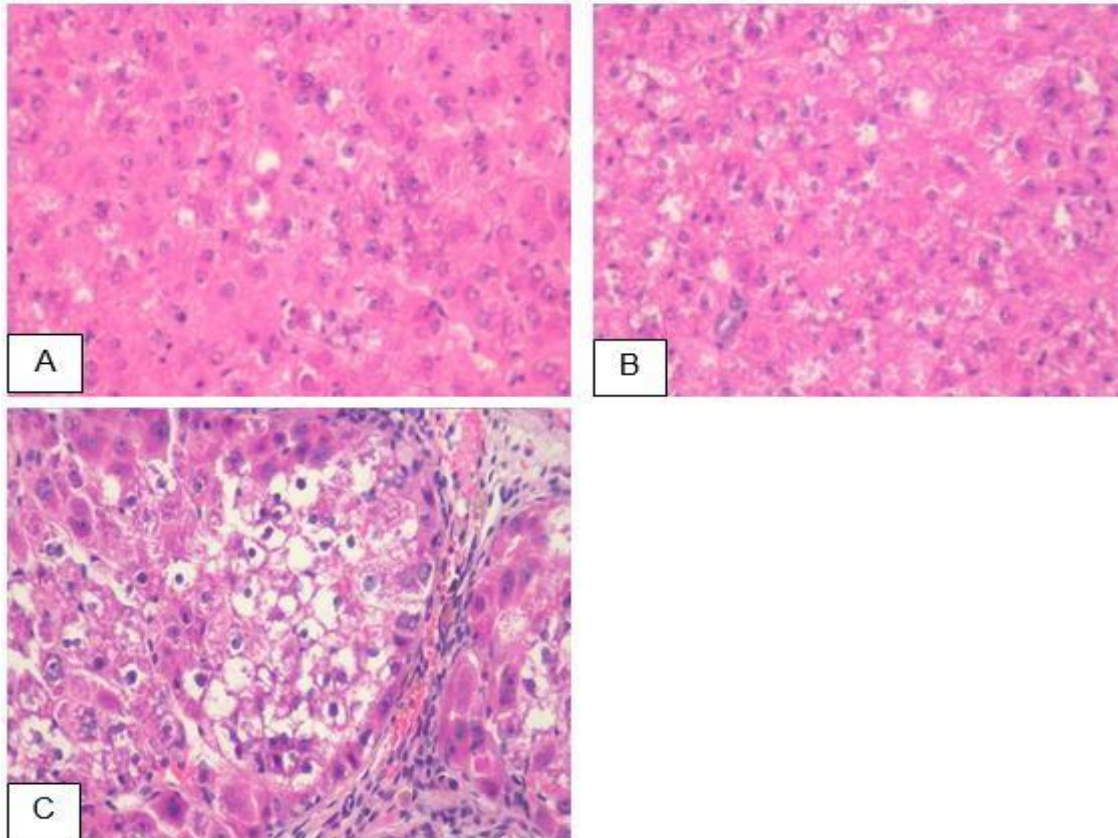
Ao analisar o espaço porta entre os grupos em uma resolução maior, nota-se novamente a formação de processo fibrótico em G2 delimitando os nódulos que modificam a arquitetura do fígado. No grupo G1, como esperado, o espaço porta se apresenta preservado, sem alterações morfológicas. Em G3 é possível notar a presença de infiltrado inflamatório (figura 3).

Figura 2 – Corte histológico do espaço porta dos grupos G1, G2 e G3

Fonte: Elaborado pelo autor.

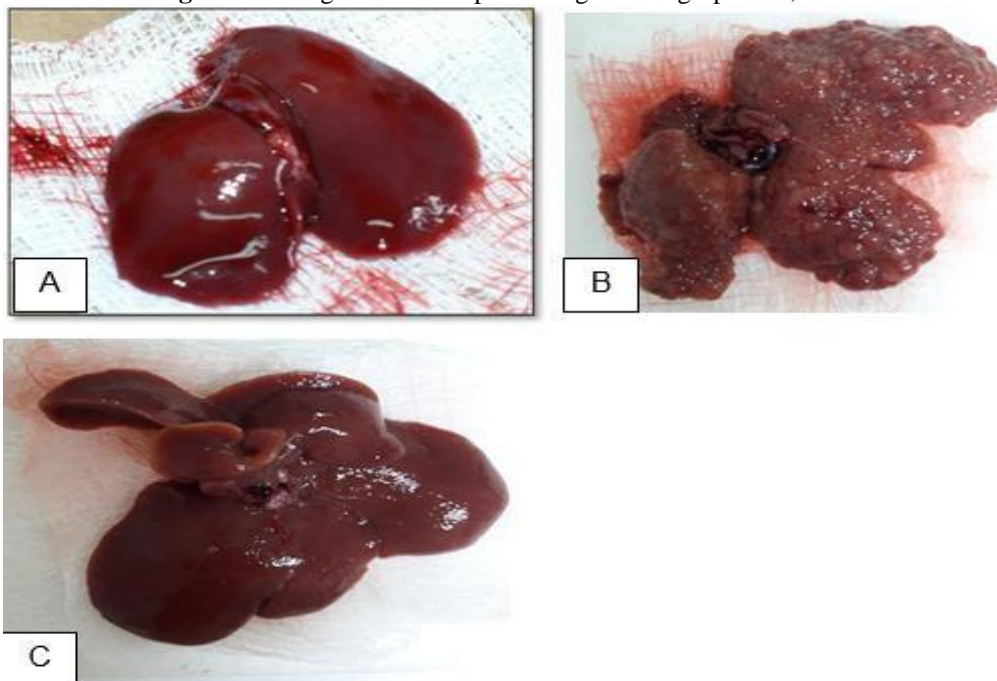
Nota: (A) Corte histológico do espaço porta, HE, aumento 20x, grupo G1; (B) Corte histológico do espaço porta, HE, aumento 20x, grupo G2; (C) Corte histológico do espaço porta, HE, aumento 20x, grupo G3.

Por fim, ao analisarmos a região central do lóbulo hepático dos grupos estudados, nota-se áreas de degeneração hidrópica, características de necrose. Este processo é mais evidente em G3 comparado a G1, e até mesmo a G2 (figura 4).

Figura 3 – Corte histológico do centro do lóbulo hepático dos grupos G1, G2 e G3

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (A) Corte histológico do centro do lóbulo hepático, HE, aumento 20x, grupo G1; (B) Corte histológico do centro do lóbulo hepático, HE, aumento 20x, grupo G2; (C) Corte histológico do centro do lóbulo hepático, HE, aumento 20x, grupo G3.

Figura 4 – Imagem macroscópica do fígado dos grupos G1, G2 e G3

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (A) Visão macroscópica do fígado do grupo G1; (B) Visão macroscópica do fígado do grupo G2; (C) Visão macroscópica do fígado do grupo G3.

4 DISCUSSÃO

O consumo de bebidas alcoólicas é uma situação que preocupa as autoridades de saúde pública em todo o mundo pela sua ascensão nos últimos anos. Além disso, relaciona-se com o declínio da qualidade de vida contribuindo com uma série de patologias, entre elas a Doença Hepática Alcoólica (DHA), cujo dano oxidativo é central nos desfechos de sua fisiopatologia. (CUPPARI, 2014; JESUS; OLIVEIRA; LYRA, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

A rutina é um flavonóide encontrado em diversos produtos de origem vegetal, que apresenta importante potencial antioxidante e por isso vem sendo estudada no tratamento de doenças ligadas ao estresse oxidativo. (BECHO et al., 2009).

Sabe-se que pacientes acometidos pela cirrose hepática alcoólica apresentam comumente desnutrição pela perda aumentada de nutrientes, redução da ingestão alimentar e comprometimento do processo de absorção. (CRAIG; McCLAIN, 2016).

Tal condição explica a diferença de peso final entre os grupos G1 e G3 quando comparados ao G2, embora o peso inicial tenha sido homogêneo entre os três grupos. A ingestão alimentar, consideravelmente superior no grupo G3 comparado ao G2 e, até mesmo ao G1, sugere que o tratamento com rutina foi eficiente na prevenção à supressão do apetite contribuindo com um melhor desfecho do quadro clínico na amostra estudada, mesmo sob a hepatotoxicidade induzida pela TAA. (EL-MIHI et al., 2017; SAITO et al., 2012).

Na revisão de Bémeur, Desjardins e Butterworth (2010), sobre os efeitos da nutrição no prognóstico da encefalopatia hepática em insuficiência hepática terminal, são elucidados os mecanismos que contribuem com a má nutrição em pacientes cirróticos, como: inadequação da síntese e aumento da perda proteica, diminuição da absorção de nutrientes essenciais e o estado hipermetabólico inerente à cirrose hepática.

O presente contexto apresenta relação com os resultados do aproveitamento nutricional entre os grupos estudados, em que G1 e G3 tiveram um aproveitamento nutricional superior estatisticamente ao G2, sem diferença entre eles. Portanto, o tratamento com rutina foi eficiente na retardação dos mecanismos da cirrose que levam a má nutrição. Ressalta-se que o consumo alimentar superior do grupo G3 comparado ao G1, concomitante ao aproveitamento nutricional semelhante entre eles, aponta que a hepatotoxicidade induzida associada ao tratamento demandou maior aporte calórico para que o estado nutricional (EN) se assemelhasse ao controle. É sugerido, portanto, que, pacientes cirróticos em tratamento com a rutina mantenham uma dieta hipercalórica para a manutenção do EN.

Dentre os métodos utilizados para se mensurar o dano hepático, as dosagens das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e de aspartato aminotransferase (AST) são frequentemente descritos pela literatura. A AST, além do fígado, encontra-se em outros tecidos, como os músculos esquelético e cardíaco e nos eritrócitos. Já a ALT é um marcador específico do tecido hepático. (GOORDEN et al., 2013).

Estudos demonstram que a indução de TAA causa toxicidade hepática com consequente aumento dos níveis de ALT e AST séricos, quando na ausência de tratamento adicional. (CZECHOWSKA et al., 2015; LUO et al., 2015). Saito et al. (2012) documentaram elevação nos níveis séricos de AST e ALT em ratos que receberam intraperitonealmente doses de TAA de 140mg/kg e 280mg/kg, durante oito semanas.

No estudo de Khan et al. (2012), o qual analisou o efeito hepatoprotetor da rutina administrada por via intragástrica nas doses de 50mg/kg e 70mg/kg, em ratos com hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCL₄), as dosagens finais de ALT e AST foram significativamente inferiores nos grupos que receberam o tratamento em comparação ao grupo que recebeu apenas as injeções de CCl₄, sem diferença estatística entre os grupos de tratamento e o grupo controle. No presente trabalho, o grupo que recebeu a rutina na dose de 50mg/kg apresentou média inferior de ALT comparado ao AST corroborando com o estudo citado, indicando que a rutina apresenta propriedade hepatoprotetora.

Sikder et al. (2014) realizaram um estudo cuja metodologia contemplou a administração de rutina (100mg/kg) durante 8 semanas e foi eficiente em evitar infiltrado inflamatório, acúmulo de gordura e degeneração de hepatócitos do fígado de ratos que receberam dieta rica em colesterol (2%), ao contrário do observado na análise histológica do fígado de animais que não receberam tratamento.

No presente estudo, o tratamento com rutina preveniu a progressão da formação de fibrose e, conseqüentemente, de nódulos cirróticos, preservando a arquitetura do fígado. Todavia, os desfechos do consumo elevado de colesterol sobre a toxicidade hepática não se assemelham à fisiopatologia da cirrose hepática alcoólica e, possivelmente, a efetividade do tratamento não deve ser atribuída ao potencial antioxidante da rutina. (SIKDER et al. 2014).

Reddy et al. (2017), visando comparar os efeitos protetores da rutina – 20mg/kg administrado por via oral, durante 11 dias - aos da silimarina sobre a toxicidade hepática induzida por acetaminofeno (APAP), descreveu a presença de dilatação sinusoidal e infiltração periportal, necrose coagulativa e infiltrado mononuclear, após análise histológica do fígado de ratos que receberam apenas a APAP – 500mg/kg, via gavagem. O grupo que, além da hepatotoxicidade

induzida por APAP, recebeu tratamento com a rutina apresentou apenas alterações degenerativas moderadas, leve congestão e infiltrado mononuclear.

Deve-se considerar que, no referido estudo, a rutina e a silimarina foram administradas após a indução da hepatotoxicidade enquanto que, neste estudo, a rutina foi administrada concomitantemente à indução da cirrose, como método preventivo. Sugere-se que, a rutina administrada posteriormente ao desenvolvimento da cirrose hepática possa ser mais efetiva na atenuação da resposta inflamatória. (REDDY et al., 2017).

Czechowska et al. (2015) induziram fibrose hepática em ratos Wistar através de injeções intraperitoneais de TAA, na dose de 300mg/kg, durante 12 semanas, para avaliar o efeito hepatoprotetor da melatonina administrada também por via intraperitoneal, na dose de 10mg/kg pelas mesmas 12 semanas. A TAA administrada isoladamente ao tratamento foi efetiva em causar hepatotoxicidade evidenciada através da análise histológica pela presença de lesões inflamatórias intensas - típicas de necrose - e degeneração dos hepatócitos.

A atividade inflamatória observada foi classificada em graus 3 e 4, sendo considerada acentuada. Também foi observado a presença de fibrose intensa – graus 3 e 4 - e de necrose fragmentada nos lóbulos hepáticos, na região limítrofe dos ductos biliares. O citoplasma dos hepatócitos apresentou lesão gordurosa – esteatose – micro e macro-vesicular, com aspecto edematoso. Por fim, o núcleo dos hepatócitos estava aumentado e algumas células apresentavam dois núcleos - marcas de regeneração após o processo inflamatório. (CZECHOWSKA et al., 2015).

Shapiro et al. (2006), visando avaliar o potencial hepatoprotetor da curcumina, administraram duas doses de 300mg/kg de TAA, via intraperitoneal, separadas por um intervalo de 24 horas. Os ratos tratados foram divididos em dois grupos: o primeiro recebeu curcumina na dose de 200mg/kg e o segundo uma dose superior de 400mg/kg, ambas por gavagem. A curcumina foi administrada 48 horas antes da primeira injeção de TAA e nos dois dias posteriores à segunda aplicação. Mesmo sob um curto período de tempo, as injeções de TAA foram suficientes para causar necrose e inflamação nos fígados dos grupos que não receberam o tratamento com curcumina.

Ao comparar os estudos de Czechowska et al. (2015) e de Shapiro et al. (2006) com o presente estudo é possível concluir que a TAA apresenta uma relação dose-dependente para o desenvolvimento de resposta inflamatória e necrose de hepatócitos, que foram mais acentuadas comparadas à indução de hepatotoxicidade com a dose reduzida de 200mg/kg. Porém, mesmo utilizando uma dose inferior sob um período reduzido, a TAA foi eficiente em alterar a arquitetura e causar fibrose intensa do fígado de animais que não receberam tratamento, neste estudo.

Ainda sobre os efeitos da TAA sobre a histologia hepática, Low et al. (2004) observaram nódulos cirróticos protuberantes nas lâminas do fígado de ratos machos que receberam injeções de

TAA intraperitonealmente, na dose de 300mg/kg, administradas três vezes por semana, após seis semanas, corroborando com o presente estudo.

Por fim, Reif et al. (2004) administraram 200mg/kg de TAA em ratos, também por via intraperitoneal, duas vezes por semana, durante 12 semanas. Após a 12^a semana, os ratos receberam tratamento com ácido S-farnesil tiosalicílico antagonista de Ras (FTS), enquanto outro grupo hepatotóxico recebeu apenas salina tamponada com fosfato (PBS) - controle. Ao final da pesquisa, os animais que não receberam tratamento apresentaram fígados com nódulos fibróticos de tamanhos variados, característicos da cirrose.

Ambos os estudos reforçam o potencial hepatotóxico da TAA e, conseqüentemente, do consumo excessivo de bebidas alcoólicas, uma vez que os desfechos sobre a fisiopatologia da cirrose hepática são semelhantes entre ambos. (EL-MIHI et al., 2017). Este estudo demonstrou que o tratamento com rutina foi efetivo em impedir a progressão da doença hepática até seu desfecho final, com a formação de nódulos cirróticos definidos, embora não tenha sido suficiente em evitar o aparecimento de infiltrado inflamatório.

Apesar da proteção contra o desenvolvimento da cirrose, o fígado dos animais tratados apresentou focos de necrose mais intensos e numerosos quando comparados ao fígado do grupo que recebeu apenas a TAA. Estes resultados sugerem que a rutina apresenta, além de propriedade antioxidante, potencial citotóxico - não elucidado pela literatura - e, provavelmente, dependente da dose administrada.

5 CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que a rutina administrada concomitantemente à Tioacetamida (TAA) apresentou efeito hepatoprotetor, o que foi mostrado através da ALT. Ressalta-se também, o maior ganho de peso, consumo de ração e aproveitamento nutricional no grupo que recebeu o tratamento, em relação ao grupo hepatotóxico, sugerindo que a rutina é eficiente na manutenção do estado nutricional frente ao desenvolvimento da cirrose hepática alcoólica. Quanto à análise histológica, a rutina foi eficiente em prevenir o desenvolvimento de nódulos cirróticos, mas não de infiltrado inflamatório e focos de necrose.

REFERÊNCIAS

- AMIN, C. et al. Protective role of phyllanthus niruri extract against thioacetamide induced liver cirrhosis in rat model. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 241-248, may. 2012.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São José do Rio Preto, v.66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, jul./ago. 2010.
- BECHO, J. R. M.; MACHADO, H.; GUERRA, M. O. Rutina – estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, Juiz de Fora, v. 1, n. 1, p. 21-25, 2009.
- BÉMEUR, C; DESJARDINS, P; BUTTERWORTH, R. Role of nutrition in the management of hepatic encephalopathy in end-stage liver failure. **Journal of Nutrition and Metabolism**, New York, p. 1-12, dec. 2010.
- BOERMEEESTER, M. A. et al. Liver failure induces a systemic inflammatory response. Prevention by recombinant n-terminal bactericidal/permeability-increasing protein. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 147, n. 5, p. 1428-1440, nov. 1995.
- BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Nacional de Saúde**. Rio de Janeiro, 2013.
- CABALLERIA, J. Current concepts in alcohol metabolism. **Annals Of Hepatology**, Mexico City, v. 2, n. 2, p. 60-68, apr./jun. 2003.
- CRAIG, J.; McCLAIN, M. D. Nutrition in patients with cirrhosis. **Gastroenterol Hepatol (N Y)**, New York, v. 12, n. 8, p. 507-510, aug. 2016.
- CUPPARI, L. **Nutrição clínica no adulto**. 3.ed. Barueri: Manole, 2014.
- CZECHOWSKA, G. et al. Protective effects of melatonin against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Kraków, v. 66, n. 4, p. 567-579, aug. 2015.
- DE LUCA, R. R. et al. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2. ed. [S.l.]: COBEA, 1996.
- EL-MIHI, K. A. et al. Naringin attenuates thioacetamide-induced liver fibrosis in rats through modulation of the PI3K/Akt pathway. **Life Sciences**, Mansoura, v. 187, p. 50-57, jul./oct. 2017.
- OLFERT, E. D.; CROSS, B. M.; MCWILLIAM, A. A. (Ed.). **Guide to the care and use of experimental animals**. Ontario: Canadian Council on Animal Care, 1993. v. 1.
- GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The pharmacological potential of rutin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Amsterdã, v. 25, n. 2, p. 149-164, feb. 2017.

GAYOTTO, L. C. C. Comitê SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre classificação das hepatites crônicas. **Gastroenterologia Endoscopia Digestiva**, São Paulo, v.19, p.137-140, abr. 2000.

GOORDEN, S. M. et al. Liver disorders in adults: ALT and AST. **Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde**, Amsterdam, v. 157, n. 43, 2013.

GARCIA, L. P.; FREITAS, L. R. S. Consumo abusivo de álcool no Brasil: resultados da pesquisa nacional de saúde 2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 227-237, abr./jun. 2015.

HARBORNE, J. B. Nature, distribution and function of plant flavonoids. **Progress in Clinical and Biological Research**, New York, v. 213, p. 15-24, 1986.

JESUS, R. P.; DE OLIVEIRA, L. P. M; LYRA, L. G. C. **Nutrição e hepatologia**. Rio de Janeiro: Rubio, 2014.

KHAN, R. A.; KHAN, M. R.; SAHREEN, S. CCl₄- induced hepatotoxicity: protective effect of rutin on p53, CYP2E1 and the antioxidative status in rat. **BCM Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 8, n. 12, oct. 2012.

LOW, T. Y. et al. A proteomic analysis of thioacetamide-induced hepatotoxicity and cirrhosis in rat livers. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 12, p. 3960-3974, dec. 2004.

LUO, M. et al. Protective effects of pentoxifylline on acute liver injury induced by thioacetamide in rats. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, Madison, v. 8, n. 8, p. 8990-8996, aug. 2015.

OLIVEIRA, M. et al. **Ação hepatoprotetora da quercetina em ratos com cirrose induzida**. 2011. 2 f. Iniciação científica (Graduação em Nutrição) – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

POOLE, L. G.; DOLIN, C. E.; ARTEEL, G. E. Organ-organ crosstalk and alcoholic liver disease. **Biomolecules**, [S.l.], v. 7, n. 3, aug. 2017.

REDDY, M. K. et al. Protective effect of rutin in comparison to silymarin against induced hepatotoxicity in rats. **Veterinary World**, Rajkot, v. 10, n. 1, p. 74-80, jan. 2017.

REIF, S. et al. Treatment of thioacetamide-induced liver cirrhosis by the Ras antagonist, farnesylthiosalicylic acid. **Journal of Hepatology**, Copehagen, v. 41, n. 2, p. 235-241, aug. 2004.

DA SILVA, L. R. et al. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta Toxicológica Argentina**, Buenos Aires, v.23, n. 1, p. 36-43, may. 2015.

SAITO, S. et al. Assessment of liver function in thioacetamide-induced rat acute liver injury using na empirical mathematical model and dynamic contrast-enhanced MRI with Gd-EOB-DTPA. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, Chicago, v. 36, n. 6, p. 1483-1489, jun. 2012.

SHAPIRO, H. et al. Curcumin ameliorates acute thioacetamide-induced hepatotoxicity. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Melbourne, v. 21, n. 2, p. 358-366, feb. 2006.

SIKDER, K. et al. The high antioxidative power of quercetin (aglycone flavonoid) and its glycone (rutin) avert high cholesterol diet induced hepatotoxicity and inflammation in swiss albino mice. **Food and Function**, Cambridge, v. 5, n. 6, p. 1294-1303, apr. 2014.

TILG, H. et al. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 103, n. 1, p. 264-274, jul. 1992.

VON BAEHR, V. et al. Mechanisms of endotoxin tolerance in patients with alcoholic liver cirrhosis: role of interleukin 10, interleukin 1 receptor antagonist, and soluble tumour necrosis factor receptors as well as effector cell desensitisation. **Gut**, London, v. 47, n. 2, p. 281-287, aug. 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2016**: monitoring health for the SDG's. Geneva, 2016.