



ACÇÃO ANTIOXIDANTE DA VITAMINA C SOBRE OS MARCADORES DE LESÃO HEPÁTICA APÓS A INDUÇÃO DE CIRROSE POR TIOACETAMINA (TAA) – EXTUDO EXPERIMENTAL

Natália Bittencourt Pasqualini¹
Amanda Fornazari Gobbi²
Jéssica Soares Loureiro³
Polliana Pereira de Oliveira⁴
Rebecca Schroder⁵
Adriane Gasparino dos Santos Martinez Uribe⁶

^{1,2,3,4,5}Graduandas do Departamento de Nutrição/Centro de Ciências da Saúde - Universidade do Sagrado Coração (USC) – Bauru/SP – natalia.bittencourt94@yahoo.com.br

⁶Docente do Departamento de Nutrição/Centro de Ciências da Saúde - Universidade do Sagrado Coração (USC) – Bauru/SP - drigasparino@yahoo.com.br

RESUMO

A cirrose hepática é considerada o resultado final e irreversível da doença crônica do fígado, levando a destruição das células hepáticas. Sendo sua principal causa o alcoolismo crônico. O metabolismo do álcool no organismo gera inúmeros radicais livres, levando a um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, chamado de estresse oxidativo. A vitamina C tem efeito antioxidante e é considerada a primeira linha de defesa ao dano oxidativo. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito hepatoprotetor da vitamina C no desenvolvimento da cirrose hepática experimental induzida por Tioacetamida, a mesma foi administrada 3 vezes por semana via intraperitoneal, durante 8 semanas na proporção de 200mg/kg de peso. Foram avaliados 40 ratos machos da raça Wistar, divididos em 4 grupos: CC (controle + vitamina C administrada via gavagem, no volume 1ml/g de peso, concentração 2mg/g), CA (controle + água administrada via gavagem no mesmo volume final da vitamina C), HC (hepatotóxico + vitamina C administrada via gavagem, diluída em água no volume 1ml/g de peso, concentração 2mg/g), e HE (hepatotóxico+ água administrada via gavagem no mesmo volume final da vitamina C). A avaliação da função hepática foi realizada por meio da análise dos marcadores bioquímicos: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), Os resultados foram analisados por meio de análise estatística com métodos descritivos e comparativos, por meio dos testes de Kruskal Wallis e de Miller. Conclui-se que a vitamina C exerceu efeito hepatoprotetor visto pela diminuição das enzimas hepáticas após a indução da cirrose por TAA

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Vitamina C; Cirrose hepática experimental.

INTRODUÇÃO

A cirrose hepática é uma patologia caracterizada pela substituição difusa da estrutura hepática normal por nódulos, contendo uma estrutura anormal circundado por fibrose. Vários são os fatores associados à formação de cirrose hepática, como processos patológicos de diversas causas, associadas ao etilismo, hepatites crônicas virais e autoimunes, e também de ordem metabólica, vascular ou biliar. (IIDA; SILVA, 2005).

O etanol provoca um excesso de equivalentes de redução no fígado, provocando danos hepáticos e um distúrbio no metabolismo. (CASSINI, 2011). Existem evidências de que o risco de desenvolvimento de cirrose é maior naqueles com ingestão de etanol maior que 60 a 80 g/dia para homens e 20 g/dia para mulheres por um tempo de uso maior que dez anos. Por outro lado, vale salientar que nem todos os indivíduos que bebem, neste nível, desenvolverão cirrose. (SILVA, 2010).

A cirrose é considerada o estágio final e irreversível das lesões crônicas, mesmo que eliminada a causa subjacente embora haja alguns estudos clínicos que tem mostrado que a cirrose pode regredir dependendo da etiologia e do sucesso do tratamento desta causa. (KAWADA, 2011). Após a cicatrização e regeneração hepatocelular é constituída a principal resposta do tecido hepático para os incontáveis insultos inflamatórios, tóxicos metabólicos e congestivos. A cirrose é caracterizada pela formação de nódulos regenerativos de parênquima hepático, circundados por septos fibrosos e está associada a graves alterações angio-arquiteturais. (ABHILASH et al., 2013).

Deste modo, a resposta a uma lesão hepática crônica pode resultar em um desbalanço na modulação da regeneração, principalmente em função da perda da capacidade de degradação de matriz extracelular ocasionando um acúmulo de tecido fibrótico, principalmente colágeno, que passa a substituir o tecido funcional hepático. (LEFTON; ROSA; COHEN, 2009).

A tioacetamida (TAA) é um composto hepatotóxico, além disso, muitos estudos experimentais mostraram que TAA induz fibrose hepática e cirrose, conhecida pela prolongada administração em vários animais. (SHAO et al., 2014), sendo eficaz na ativação metabólica para que seu efeito seja tóxico, podendo levar a lesões hepáticas pela ação de radicais livres formados na sua 8 detoxificação, levando à cirrose hepática similar à induzida pelo etanol. A indução a essa lesão por TAA, tornou-se o modelo mais utilizado em pesquisas e alternativas para seu tratamento, apesar de ser um dos mais recentes, por possuir detecção de sinais, nódulos regenerativos, padrões histológicos e sintomas semelhantes aos da cirrose humana.

Os agentes antioxidantes encontrados nos alimentos tem recebido prioridade nas pesquisas que buscam identificar agentes quimioprotetores, pois apresentam a capacidade de combater os radicais livres. Para que as células funcionem normalmente, é necessário ter uma compensação entre a formação de compostos altamente reativos (ROS/RNS) e os níveis de defesas antioxidantes, que mantêm a célula em estado geral reduzida. O estresse oxidativo ocorre quando as defesas antioxidantes tornam-se insuficientes frente à excessiva produção de ROS e RNS. (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

O uso de antioxidantes vem sendo alvo de vários estudos por minimizar o estresse oxidativo, contribuindo para a intervenção terapêutica em pacientes cirróticos. Dentre esses antioxidantes a vitamina C se destaca pelas suas características de captura de compostos altamente reativos (ROS) e proteção ao estresse oxidativo. (FARIA, 2008).

A vitamina C é um nutriente hidrossolúvel envolvido em várias funções biológicas, sendo considerada a primeira linha de defesa ao dano oxidativo, por proteger ácidos graxos e também tem função antiescorbútica sendo um potente redutor das ROS/RNS fisiologicamente relevantes. Além disso, por ser hidrossolúvel, a vitamina C poderá ser facilmente absorvida pelo organismo mesmo na presença de colestase, quadro característico da cirrose hepática terminal. (PASSONI, 2005). Desta forma o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito hepatoprotetor da vitamina C na cirrose hepática induzida por TAA.

METODOLOGIA

Animais

Foram avaliados 40 ratos machos da raça Wistar, proeminentes do Biotério da Universidade 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. Além disso, eles foram mantidos em gaiolas individuais, com acesso *ad libitum* a água e a ração padronizada, conforme a distribuição pelos grupos. O procedimento experimental foi realizado após a aprovação do comitê de ética em experimentação animal da FOB/USP (CEEPA-Proc. N°009/2013).

Delineamento Experimental

Os animais foram distribuídos em 4 grupos (Tabela 1): A cirrose hepática foi induzida nos animais dos grupos hepatotóxicos com tioacetamida (TAA) diluída em solução aquosa a 4% e foi administrada por via intraperitoneal, 3 vezes por semana, à proporção de 200 mg/kg de peso, durante 8 semanas, procedimento adotado por Amin et al.(2012). Já a vitamina C foi diluída em água no volume 1ml/g e concentração de 2mg/g e administrada diariamente por via gavagem, mesmo procedimento adotado por Passoni, 2005. Este volume foi distribuído em 3 doses diárias, em horários alternados.

Tabela 1 – Grupos experimentais

- | |
|---|
| ▪ Grupo CC (Controle + vitamina C) – administração diária de vitamina C diluída em água no volume 1ml/g , concentração 2mg/g, distribuída em 3 doses ao dia, durante 8 semanas. |
| ▪ Grupo CA (Controle + água) – administração diária de água (no mesmo volume final da vitamina C), distribuídas em 3 doses ao dia, durante 8 semanas. |
| ▪ Grupo HC (Hepatotóxico + vitamina C) – administração de 200 mg/kg de peso de Tioacetamida (TAA) diluída em solução aquosa a 4%, aplicada intraperitonealmente, 3 vezes por semana, durante 8 semanas. Os mesmos receberam administração diária de vitamina C diluída em água no volume 1ml/g de peso, concentração 2mg/g, distribuída em 3 doses ao dia, no mesmo período. |
| ▪ Grupo HE (Hepatotóxico + água) – administração de 200 mg/kg de peso de Tioacetamida (TAA) diluída em solução aquosa a 4%, aplicada intraperitonealmente, 3 vezes por semana, durante 8 semanas. Os mesmos receberam administração diária de água no mesmo volume final da vitamina C, distribuída em 3 doses ao dia, no mesmo período. |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Eutanásia

A eutanásia foi realizada ao final das 8 semanas (PF), após anestesia intramuscular com os anestésicos Cloridrato de Ketamina (60mg/kg de peso) e com Cloridrato de Xiloxina (20mg/kg de peso), por exsanguinação através de punção cardíaca. O sangue foi colhido neste momento para a realização dos exames bioquímicos séricos.

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).

Análise Estatística

Os dados coletados foram submetidos à análise estatística descritiva e os 4 grupos foram comparados entre si, por meio do Teste Não-Paramétrico de Kruskal Wallis, ao nível de 5% de significância, sendo as comparações individuais realizadas pelo teste de Miller.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ALT e AST

A média das concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos de ALT e AST encontradas nos grupos controle (CA e CC) foi estatisticamente semelhante, ($p > 0,05$), quando comparadas entre si. Já na comparação com os grupos cirróticos (HE e HC) observou uma elevação significativa nos valores ($p < 0,05$), porém o grupo cirrótico com administração concomitante de vitamina C (HC) apresentou valores significativamente menores ($p < 0,05$) de ALT e AST ($326 \pm 89,82$ e $168,76 \pm 38,61$, respectivamente) em comparação com o grupo cirrótico sem a administração de vitamina C ($464,95 \pm 239,82$ e $368,70 \pm 174,22$, respectivamente), conforme demonstrado pela tabela 1.

Tabela 2 - Médias e desvios-padrão das variáveis ALT e AST e respectivos resultados das comparações entre os grupos (Teste de Miller)

Variáveis	Grupos			
	I (CA)	II (CC)	III(HE)	IV (HC)
AST	$111,17 \pm 41,68^a$	$92,00 \pm 21,097^a$	$464,95 \pm 239,82^{ab}$	$326,00 \pm 89,82^b$
ALT	$106,84 \pm 67,501^a$	$69,84 \pm 8,35^a$	$368,70 \pm 174,22^b$	$168,76 \pm 38,61^a$

Fonte: Elaborada pelo autor.

A TAA aumentou significativamente os níveis séricos ALT e AST, assim como o esperado em cirróticos crônicos. (AMIN et al., 2012; COLOCHO et al., 2010). A AST é uma enzima que cataboliza aminoácidos permitindo que entrem no ciclo de Krebs, está relacionada

com a integridade dos hepatócitos, porém não é específica do fígado, podendo ser encontrada no músculo cardíaco, rim, cérebro e eritrócitos. (GIANINI et al., 2005). Já a ALT é uma enzima que catalisa a interconversão do grupamento amino da alanina para o α -cetogluturato formando piruvato e, portanto desempenha importante função da gliconeogênese e metabolismo de aminoácidos. A atividade do ALT é observada principalmente no fígado, de tal forma que é considerado um marcador hepato-específico. (SATO et al., 2008). O aumento plasmático concomitante de AST e ALT confirmam a origem hepática da lesão e, apesar da ALT refletir a injúria hepática, a AST tem uma correlação com a presença de fibrose, sendo a associação destes dois marcadores hepáticos fundamental para o diagnóstico de cirrose hepática (GRIGORESCU, 2006).

Quando comparados os grupos controles, com e sem a vitamina C, pôde-se observar que a vitamina C, independente da presença ou não de cirrose, não afetou os níveis de AST e ALT, demonstrando que na dosagem de 1ml/g de peso na concentração 2mg/g, não influencia negativamente a atividade hepática. O metabolismo da vitamina C, em quantidades adequadas, não requer esforços excessivos do fígado, já que é absorvida pela parte superior do intestino delgado e excretada pelos rins na forma de urina. (LIMA, 2008).

Já na presença de cirrose, a vitamina C exerceu efeito hepatoprotetor, reduzindo os níveis séricos de ALT e AST, provavelmente por seu efeito antioxidante. A vitamina C é uma vitamina antioxidante que reage diretamente com o oxigênio simples, radical hidroxila e radical superóxido, além de regenerar a vitamina E. Esta vitamina mantém as enzimas tiol em seus estados reduzidos e poupa a glutatona peroxidase, que é um importante antioxidante intracelular e cofator enzimático. (FARIA, 2008). Em vários estudos, a vitamina C foi sugerida por mostrar seus efeitos através da remoção dos radicais livres formados durante as reações de oxidação de drogas, como o álcool (ABHILASH et al., 2013), tetracloreto de carbono (FARIA, 2008) e chumbo (EBUHI et al., 2012), sendo considerada a mais efetiva na proteção dos lipídeos do plasma contra o dano oxidativo, mesmo na presença de colestase, já que não necessita da presença de ácidos biliares para sua absorção.

Poloni et al. (2004), em estudo experimental sobre a avaliação do efeito da vitamina C sobre o dano hepático secundário à pancreatite aguda, concluiu que a vitamina C é eficiente no combate a peroxidação lipídica, mas não demonstra efeito protetor sobre o dano hepático, observado pela não diminuição dos níveis séricos de ALT e AST.

Passoni (2005), estudando a suplementação de vitamina C na cirrose biliar secundária provocada por ligadura de ducto biliar comum, observou que os ratos cirróticos com colestase apresentaram uma melhora na lesão hepática, como observado pela redução da gordura hepática e pela diminuição enzimática dos níveis de globulina. Porém, os parâmetros bioquímicos ALT e AST não tiveram melhora após a suplementação com vitamina C. Santos (2007), estudando o mesmo modelo experimental, com a suplementação de vitamina E hidrossolúvel (TPGS), que apresenta ação antioxidante semelhante a vitamina C, observou resultados distintos de Passoni (2005), através da melhora importante dos níveis de ALT e AST, mostrando, desta forma, que as vitaminas antioxidantes podem desempenhar um papel importante no dano hepático, principalmente as hidrossolúveis, visto que, nos diferentes tipos de cirrose biliar e na cirrose hepática alcoólica em seu estágio mais avançado, a colestase pode estar presente.

Em estudo mais recente Abhilash et al. (2013), comparou o efeito da vitamina C com a similarina em ratos com hepatopatia induzida por etanol e demonstrou a eficácia da vitamina C em reduzir os marcadores de lesão hepática (ALT e AST), sendo considerada um tratamento superior à similarina na inibição da geração intracelular de espécies reativas de

oxigênio (ROS) e, conseqüentemente, reduzindo a inflamação induzida por etanol em hepatócitos. Os resultados do presente trabalho são semelhantes ao estudo precitado, mostrando que independente do agente causador da lesão hepática, a vitamina C pode melhorar a lesão hepática através da sua ação antioxidante.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a vitamina C exerceu efeito hepatoprotetor no desenvolvimento da cirrose hepática experimental induzida por TAA, através da diminuição dos parâmetros bioquímicos de lesão hepática Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST).

REFERENCIAS

ABHILASH et al. O ácido ascórbico é superior a similarina na recuperação de reações inflamatórias induzidas por etanol em hepatócitos do fígado de cobaias. **J. Physiol Biochem**, v. 28, n. 48, maio 2013.

AMIN et al. Protective Role of Phyllanthus niruri extract against Thioacetamide induced liver cirrhosis in rat model. **Evid. Based Complement**. v. 12, n. 3, p. 241-248, may, 2012.

CASSINI, C.; LINDEN, R. Exposição pré-natal ao etanol: toxicidade, biomarcadores e métodos de detecção. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 116-121, 2011.

CERQUEIRA, F. M. et al. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 441-449, abr. 2007.

EBUHI et al. Oral administration of vitamin C and vitamin E ameliorates lead induced hepatotoxicity and oxidative stress in the rat brain. **J. Hosp. Med**. v. 22, n. 2 p. 85-90, jun, 2012.

FARIA, A. F. **Efeito do ácido ascórbico durante a hepatocarcinogênese quimicamente induzida em ratos**. 2008. 103 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2008.

GRIGORESCU, M. Noninvasive biochemical markers of liver fibrosis. **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**, v. 15, n. 2, p. 149-159, 2006.

IIDA, V. H. et al. Cirrose hepática: aspectos morfológicos relacionados às suas possíveis complicações. Um estudo centrado em necropsias. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 1, p. 29-36, fev. 2005.

KAWADA, N. Evolution of hepatic fibrosis research. **Hepatology Research**, Amsterdam, v. 41, n. 3 p. 199-208, mar. 2011.

LEFTON, H. B.; ROSA, A.; COHEN, M. Diagnosis and epidemiology of cirrhosis. **The Medical clinics of North America**, Philadelphia, v. 93, n. 4, p. 787-799, jul. 2009.

LIMA, T. C. **Cirrose hepática induzida por tiocetamida**: estudo do modelo por injeção intraperitoneal a longo prazo em ratas Wistar. 2008. 102 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PASSONI, C. R. **Efeito hepatoprotetor da suplementação de vitamina C na cirrose biliar secundária** – estudo experimental de ratos jovens. 2005. 145 f. Dissertação (Doutorado em Metabolismo e Nutrição) - Faculdade de Medicina Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, Botucatu, 2005.

POLONI et al. Avaliação do efeito do ácido ascórbico sobre o dabo hepático secundário à pancreatite aguda. **Sei Med**, v.14, n.4. Jun, 2004.

SATO et al. Resolution of liver cirrhosis using vit. A coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen specific chaperone. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 431-442. Jul, 2008.

SILVA, S. I. Cirrose hepática. **Cadernos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 67, n. 4, p. 111-120, abr. 2010.