

EFEITO DA *ILEX PARAGUARIENSIS* NAS AMINOTRANSFERASES DE RATOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA E REPERFUSÃO HEPÁTICAS

ANA LUÍSA MATTOS MAZORCO*
EMILIO FACIN**
MICHELE MORAES DE SOUZA***
ANA LUIZA MUCCILLO BAISCH****
SUSI LAUZ*****

RESUMO

Objetivo: Estudar o efeito do extrato da *Ilex paraguariensis* nas aminotransferases de ratos submetidos a isquemia e reperfusão (IR) hepáticas. Métodos: Foram utilizados 24 Ratos Wistar machos distribuídos em: Grupo controle (GC), Grupo Ilex 90 dias (GI-90), Grupo Ilex 60 dias (GI-60), Grupo Ilex 30 (GI-30). Foi administrado aproximadamente 900µg de *Ilex paraguariensis* via oral diariamente por 30 dias no grupo GI-30, por 60 dias no grupo GI-60 e por durante 90 dias no grupo GI-90; no grupo controle (GC) administrou-se água *ad libitum* por 90 dias. A isquemia hepática foi de 30 minutos em todos os grupos e seguida de reperfusão de 45 minutos. Os animais foram anestesiados via intramuscular com xilazina (25mg/kg⁻¹)/ketamina (50mg/kg⁻¹). Após completado o período de reperfusão foi realizada coleta de sangue venoso e dosagem das aminotransferases, seguida de eutanásia por exosanguinação. Resultados: Os níveis de AST e ALT foram significativamente semelhantes ao do grupo controle. Conclusão: Neste estudo não se encontraram alterações dos níveis de alanina-aminotransferase e aspartato-aminotransferase, quando se compararam os grupos experimento (90, 60 e 30 dias) e o grupo controle.

PALAVRAS-CHAVE: Isquemia-reperfusão, fígado, *Ilex paraguariensis*

ABSTRACT

***Ilex paraguariensis* effects on aminotransferases in rats subjected to hepatic ischemia and reperfusion**

This study was aimed at measuring the effects of *Ilex paraguariensis* on aminotransferases of rats subjected to hepatic ischemic and reperfusion. A total of 24 male and adults Wistar rats was distributed into the following groups: Control Group (CG), 90-day Ilex Group (IG-90), 60-day Ilex Group (IG-60), and 30-day Ilex Group (IG-30). Approximately 900mg of *Ilex paraguariensis* was administered orally daily for 30 days in IG-30, for 60 days in IG-60, 90 days in IG-90, and in CG water *ad libitum* was administered for 90 days. The hepatic ischemia occurred within 30 min in all groups, and reperfusion in 45 min. The

* Mestre em Ciências da Saúde e bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande.

** Graduação em Medicina. Universidade Federal do Rio Grande- FURG

*** Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos (2012) pela Universidade Federal do Rio Grande – FURG.

**** Atualmente é professor associado da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e Diretora de Pesquisa da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da FURG. Tem experiência na área de farmacologia.

***** Atualmente é professor Associado da Universidade Federal do Rio Grande. Responsável pelo Setor de Cirurgia da FAMED-FURG, Diretora Técnica e Vice-Diretora do HU/FURG.

animals were anesthetized with intramuscular xylazine (25 mg/kg⁻¹)/ketamine (50 mg/kg⁻¹). After the completion of the reperfusion period, venous blood was collected and measurement of aminotransferases was performed, followed by euthanasia by bleeding. Results showed the levels of alanine aminotransferase (AST) and aspartate aminotransferase (AST) significantly similar to the CG. In conclusion, no changes were found in levels of AST and ALT, when comparing experimental groups (90, 60 and 30 days) with the CG.

KEYWORDS: Ischemia, reperfusion, liver, rats.

RESUMEN

Efecto de *Ilex paraguariensis* en aminotransferasas ratos fase hígado isquemia y perfusión

Objetivo: Estudiar el efecto del extracto de *Ilex paraguariensis* de aminotransferasas en ratos sometidas a isquemia y perfusión (I/R) del hígado. Métodos: 24 ratos Wistar macho divididas en: grupo control (GC), Grupo *Ilex* 90 días (IG-90), Grupo *Ilex* 60 días (IG-60), Grupo *Ilex* 30 días (IG-30). Se administró aproximadamente 900µg de *Ilex paraguariensis* por vía oral diariamente durante 30 días en el GI-30, durante 60 días en el GI-60, y 90 días en el GI-90; al grupo control (GC) se administró agua ad libitum durante 90 días. Isquemia hepática fue de 30 minutos en todos los grupos, seguida de perfusión durante 45 minutos. Los animales fueron anestesiados por vía intramuscular con xilazina (25mg/kg⁻¹)/ketamina (50mg/kg⁻¹). Después de la finalización del período de perfusión se recogió de la sangre venosa y los niveles de medición de las aminotransferasas, seguida de la eutanasia por exosanguinación. Resultados: Los niveles de AST y ALT fueron significativamente similares a los del grupo control. Conclusión: Este estudio no encontró cambios en los niveles de AST y ALT, en la comparación entre los grupos experimentales (90, 60 y 30 días) con el grupo control.

PALABRAS CLAVE: isquemia-reperfusión, hígado, *Ilex paraguariensis*

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas técnicas operatórias para o controle do sangramento durante certos procedimentos cirúrgicos que envolvem o fígado é essencial para o sucesso do ato operatório, pois há alguns tópicos que ainda necessitam ser superados, tais como a lesão de isquemia e perfusão, preservação, rejeição e infecção.

Durante a interrupção do aporte sanguíneo gerado por essa manobra, promove-se no tecido uma hipóxia das células. Inicia-se assim uma sequência de eventos bioquímicos, que envolvem mecanismos e vias metabólicas celulares complexas, tendo como

resultado final a morte celular^{1,2,3}.

Dessa forma, ao esclarecer os mecanismos de ocorrência da lesão de isquemia/perfusão, pode-se alterar sua evolução empregando estratégias que possam minimizar ou evitar tal lesão. Dentre estas se destaca o uso de substâncias que por diferentes mecanismos de ação, promovem uma redução do dano celular pela ação antioxidante.

Entretanto, são poucos os relatos científicos sobre os efeitos de plantas medicinais na lesão de isquemia e perfusão. Os flavonóides também são substâncias com propriedades antioxidantes e se encontram nos vegetais verde-escuros e na *Ilex*

paraguariensis (erva-mate), contendo um número variável de grupos fenólicos^{4,5,6,7}.

Essa ação antioxidante dos flavonóides aplica-se à neutralização das espécies reativas de oxigênio (EROS), anulando os efeitos negativos destas sobre as células⁸.

A *Ilex paraguariensis* tem sido motivo de pesquisa pelo seu consumo no sul do Brasil. Pesquisas têm demonstrado que essa substância tem efeito hipocolesterolêmico, hepatoprotetor, estimulante do sistema nervoso central, diurético e benéfico ao sistema cardiovascular (vasodilatador em endotélio) de ratos^{9,10,11,12}.

Neste estudo os autores objetivaram avaliar o efeito da *Ilex paraguariensis* nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 24 ratos linhagem Wistar, machos, adultos, com peso aproximado de 350g. A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa na área da saúde da FURG, sob o número do protocolo 21/2009, e seguiu os preceitos internacionais da experimentação em animais.

Para o estudo, os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

Grupo Controle – GC (n = 06): receberam através da via oral água potável sem administração de substância, foram submetidos a lesão hepática por isquemia durante 30min e reperfusão de 45min. Realizada a coleta do material para análise do padrão da amostra.

Grupo Ilex paraguariensis 90 dias – GI-90 (n = 06): foi administrada *Ilex paraguariensis* diariamente para os animais, em média 20mL/dia da infusão, numa concentração de 900

µgramas de *Ilex paraguariensis* via oral, durante 90 dias.

Grupo Ilex paraguariensis 60 dias – GI-60 (n = 06): foi administrada *Ilex paraguariensis* diariamente para os animais, em média 20mL/dia da infusão, numa concentração de 900 µgramas de *Ilex paraguariensis* via oral, durante 60 dias.

Grupo Ilex paraguariensis 30 dias – GI-30 (n = 06): foi administrada *Ilex paraguariensis* diariamente para os animais, em média 20mL/dia da infusão, numa concentração de 900 µgramas de *Ilex paraguariensis* via oral, durante 30 dias.

Procedimento da fração

O extrato simples foi obtido a partir de 55g de erva-mate destilada em água potável durante 15 minutos a 80°C. Depois de filtrado, o extrato aquoso foi diluído em 500mL de água potável.

Procedimento operatório

Os animais foram assim delineados em ordem decrescente de dias, para que no momento do procedimento operatório todos estivessem com a mesma idade. Os animais foram anestesiados com associação dos fármacos: xilazina 25mg/kg⁻¹ e cetamina 50mg/kg⁻¹ por via intramuscular. No 90º dia de experimento, foi realizada a cirurgia e coletou-se a primeira amostra de sangue pela veia cava caudal, seguida do clampamento da tríade hepática por 30 minutos com posterior reperfusão por 45 minutos após retirado o clamp. A segunda coleta de sangue foi realizada a seguir com punção da veia cava caudal, e o animal, ainda sob efeito de anestésico, foi levado à eutanásia.

Coleta do material

Foi realizada a coleta de sangue no período pré-clampamento e após

isquemia e reperfusão, pela veia cava caudal, para realizar a quantificação das enzimas no analisador bioquímico Selectra II®. Estudou-se a aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), utilizando-se um kit específico para cada uma das enzimas citadas, kit Labtest® (IFCC, 2002).

Análise estatística

Os dados foram anotados no protocolo do trabalho e submetidos à análise estatística, pelo Núcleo de

Assessoria e Análise Estatística (Instituto de Matemática, Estatística e Física – IMEF/FURG). Nas tabelas encontram-se os resultados de cada animal, assim como a média (MD) e o desvio-padrão (DP) de cada grupo, realizados em teste ANOVA.

RESULTADOS

Análise bioquímica

As análises bioquímicas das enzimas aminotransferases podem ser observadas na tabela 1, 2.

TABELA 1 – Análise de variância, considerando um nível de significância de 5%, para enzima AST.

AST								
	G C A	G 90 A	G 60 A	G30 A	G C B	G90 B	G 60 B	G30 B
	177	87	98	143	395	457	344	390
	161	73	62	109	398	214	446	413
	91	81	94	100	497	430	213	677
	111	87	67	119	586	455	296	676
	108	95	113	146	408	421	438	148
	152	123	123	195	490	875	288	549
Média	133,33	91,00	92,83	135,33	462,33	475,33	337,50	475,50
Desvio-padrão	34,51	17,30	24,34	34,47	76,01	216,23	91,20	202,33

*GC grupo controle; G90 grupo 90 dias; G60 grupo 60 dias; G30 grupo 30 dias

** A grupos pré-isquemia; B grupos pós-isquemia e reperfusão

TABELA 2 – Análise de variância, considerando um nível de significância de 5%, para enzima ALT.

ALT								
	G C A	G90 A	G 60 A	G30A	G C B	G90 B	G 60 B	G30 B
	62	47	31	47	244	705	534	198
	68	35	37	30	385	467	396	262
	51	34	40	36	504	206	148	631
	54	42	40	41	810	222	165	563
	60	36	37	43	770	572	402	388
	52	43	34	58	591	390	705	358
Média	57,83	39,50	36,50	42,50	550,66	427,00	391,66	400,00
Desvio Padrão	6,65	5,24	3,51	9,61	219,39	196,03	214,16	168,34

*GC grupo controle; G90 grupo 90 dias; G60 grupo 60 dias; G30 grupo 30 dias

** A grupos pré-isquemia; B grupos pós-isquemia e reperfusão

Não houve diferença estatística nos níveis das aminotransferases nos ratos do grupo controle e dos grupos experimentais no período pré-isquemia, o que também foi verificado no período pós-isquemia e reperfusão hepática. No entanto, quando comparamos os períodos pré-isquemia com o período pós-isquemia e reperfusão hepática para os níveis séricos de AST e ALT, o grupo controle e os grupos experimentais são significativamente diferentes: grupo controle ($p= 0.0017$) e os grupos tratados com *Ilex paraguariensis*, durante 90 dias ($p= 0.0004$), 60 dias ($p= 0.0252$) e 30 dias ($p= 0.0012$).

DISCUSSÃO

Períodos de isquemia induzidos por exclusão vascular do fígado por clampeamento da tríade hepática total do fígado são muitas vezes necessários durante diversos procedimentos como traumas hepáticos, ressecções e transplantes. No entanto, sabe-se que a isquemia e principalmente a reperfusão, ao mesmo tempo que evita ou minimiza sangramentos durante a cirurgia, induz a diferentes intensidades de sofrimento hepatocelular.

Estudos experimentais têm sido realizados com o intuito de verificar a eficácia do uso de substâncias antioxidantes no sentido de prevenir ou atenuar as lesões decorrentes da isquemia e reperfusão. Entretanto, ainda são poucos os relatos a respeito do uso de plantas medicinais com esse fim, o que motivou os autores a fazer uso da *Ilex paraguariensis*, em razão de ser a mesma largamente utilizada pela população do extremo sul da América do Sul. Aproximadamente 30% da população ingere mais de 1 L/dia, na forma de chimarrão ou de chá. O consumo se faz por hábito cultural ou na medicina popular, como

no tratamento das dificuldades na digestão, dores de cabeça, artrite, reumatismo, obesidade e doenças do fígado¹³.

As propriedades terapêuticas atribuídas ao vegetal estão relacionadas ao conteúdo cafeólico. Sabe-se que este e seus derivados apresentam propriedades antioxidantes^{14,15}. Da mesma forma que o ácido cafeólico, a quercitina, um flavonóide encontrado nas espécies de *Ilex*, apresenta propriedades anti-radicais livres, também atividade antioxidação lipídica e relaxante de anéis de aorta^{16,17}.

Estudos mostraram as propriedades antioxidantes dos extratos de *Ilex paraguariensis*, apontadas pela diminuição da oxidabilidade das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), tanto *in vitro* quanto *in vivo*⁵. Esses efeitos foram atribuídos à presença de substâncias flavonóides no vegetal. Os flavonóides são um grupo de substâncias com propriedades antioxidantes e descrito seu uso nas doenças vasculares onde estão envolvidas inflamações da parede¹⁸.

Neste estudo foi avaliada a lesão de isquemia e reperfusão no fígado no tempo de 30 minutos de isquemia seguida de reperfusão por 45 minutos em animais que foram submetidos à ingestão de diferentes tempos de *Ilex paraguariensis* (90, 60, 30 dias). Optou-se pela via oral, pois o hábito de matear se faz por ingestão de infusão tomada diariamente.

Ao utilizar o modelo de isquemia e reperfusão hepática analisaram-se as dosagens bioquímicas das enzimas hepáticas para avaliação da ocorrência de lesão no parênquima do fígado, como forma de validar tal modelo. Tais enzimas possuem papel importante nas alterações dos níveis séricos relacionados à disfunção orgânica¹⁹.

Foram avaliadas as mensurações das aminotransferases (AST e ALT).

A mensuração sérica alterada das aminotransferases indica a lesão hepatocelular. A ALT é um marcador mais específico de lesão hepatocelular, estando presente no fígado, rins, coração, músculo-esquelético e pâncreas, enquanto AST tem ampla distribuição, ocorrendo em órgãos como coração, fígado, músculo-esquelético, rins e pâncreas. No fígado, a AST ocorre predominantemente nas mitocôndrias (80%) e 20% no citoplasma, enquanto ALT está confinada ao citoplasma^{20,21,22}.

Em relação às aminotransferases, neste estudo não se encontraram alterações dos níveis de AST e ALT, quando se compararam os grupos experimento (90, 60 e 30 dias) com o grupo controle. Entretanto, observou-se que houve uma tendência estatística do grupo 60 dias a apresentar níveis enzimáticos menores que o grupo controle.

Estudo recente mostrou que a *Ilex paraguariensis*, quando comparada a um antioxidante hepatoprotetor como a N-acetilcisteína via endovenosa, minimiza a lesão no parênquima hepático sob o ponto de vista histomorfológico; entretanto, quando se analisa a atividade enzimática não se observa uma ação que mantenha os valores das aminotransferases próximos dos níveis da normalidade²³. Assim, buscou-se o efeito antioxidante quando a *Ilex paraguariensis* foi administrada via oral. No presente estudo os achados bioquímicos não foram suficientes para demonstrar um efeito da *Ilex paraguariensis* em minimizar a lesão hepática pela análise das enzimas aminotransferases do fígado de ratos, ainda que estatisticamente tenha havido uma tendência do grupo 60 dias a apresentar níveis enzimáticos menores que o grupo controle.

Com o intuito de esclarecer os

mecanismos de ação da *Ilex paraguariensis* no tecido hepático submetido à lesão de isquemia-reperfusão, sugere-se continuidade das pesquisas neste campo, aplicando-se outras metodologias de análise das lesões.

REFERÊNCIAS

1. McCord, JM & Fridovich, I. The reduction of cytochrome by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem*, 243: 5753-60, 1968.
2. McCord, JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl J Med*, 312: 159-63, 1985.
3. Lima, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, edited by Kenneth B. Storey. John Wiley & Sons, Inc. 2004
4. Chamdra, S. & De Mejia Gonzáles. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J. Agric Food Chem.*; Jun 2; 52 (11), 2004
5. Gugliucci, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*; induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. *Bioch Biop Res Commun*; 224:338-344, 1996.
6. Heck CI, De Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J. Food Sci. Nov*, 72 (9), 2007.
7. Soares, SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev. Nutr., Campinas*, 15(1):71-81, jan./abr., 2002.
8. Williams RJ, et al. Free radical, *Biology & Medicine*, 36 (7):838-849, 2004.
9. Marte AP & Santos RD. Bases fisiopatológicas da dislipidemia e hipertensão arterial. *Rev. Hipertens.*, 14(4): 252-257, 2007.
10. Rique, AR; Soares, EA; Meirelles, CM. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares *Rev Bras Med Esporte*, 8(6), Nov/Dez, 2002.
11. Cordellini, S; Novo, R; Lanza, U. Differential vascular adaptive response in

- spontaneously hypertensive and Wistar rats: role of nitric oxide, and prehypertensive and hypertensive states. *Life Sciences* (79) 646-653, 2006.
12. Muccillo Baisch AL, et al. Endothelium - dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* on mesenteric arterial bed of rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 60, 1998.
 13. Filip, R, López, P, Giberti, G, Coussio, J, Ferraro, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia*. Nov;72(7):774-8, 2001.
 14. Lotito, SM; Fraga, CG. Catechins as antioxidant: mechanisms preventing human plasma oxidation and activity in red wines. *Biofactors*. 10:125-130, 1999.
 15. Kerry, N; Rice-Evans, C. Inhibition of peroxynitrite mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationships. *J. Neurochem*. 73:247-253, 1999.
 16. Alikardis, F. Natural constituents of *Ilex* species. *Journal of Ethnopharmacology*. 20: 121-144, 1987.
 17. Yuting, C; Rongliang, Z; Zhongjian, J. Flavonoids as superoxidase scavengers and antioxidants. *Free Radical Biol and Med*. 19: 19-21, 1990
 18. Van Acker, SA, Tromp, MN, Haenen, GR, Van Der Vijgh, WJ, & Bast, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 214, 755-759, 1995.
 19. Silva, FN; Refinetti, RA; Eulálio, JRM. Avaliação bioquímica dos efeitos do pré-condicionamento isquêmico após isquemia e reperfusão hepática em ratos. *Rev Col Bras Cir*, Nov-Dez; 33(6), 2006.
 20. Rodrigues, LEA. *Enzimologia Clínica*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.
 21. Gayotto, LCC & Alves, VAF. *Doenças do fígado e vias biliares*. São Paulo: Atheneu; p. 664, 2001.
 22. França RF, et al. Acute hepatotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) venom in rats. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*; 15(1):62; 2009.
 23. Lauz, S; Mazorco, AL; Silva, RR; Espindola, W; Baisch, ALM. Estudo histomorfológico do uso do antioxidante *Ilex paraguariensis* na lesão de isquemia e reperfusão hepática. *Vittalle: Revista de Ciências da Saúde* 21(1), 2009.

