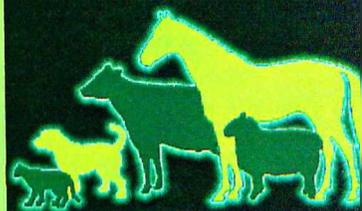


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Clínica e Cirurgia



EFEITOS DA SILIMARINA (*Silybum marianum*), ALCACHOFRA (*Cynara scolymus*), MEL, AMINOÁCIDOS COM LEVULOSE E AMINOÁCIDOS COM PROTEOLISADOS DE FÍGADO NA HEPATOTOXICIDADE AGUDA INDUZIDA POR TETRACLORETO DE CARBONO EM CAMUNDONGOS

Renata Junqueira Rezende

**Minas Gerais
Uberlândia
2003**

SISBI/UFU



1000211460

Renata Junqueira Rezende

MON
615:613
P.45#2
TES/MEM

**EFEITOS DA SILIMARINA (*Silybum marianum*), ALCACHOFRA
(*Cynara scolymus*), MEL, AMINOÁCIDOS COM LEVULOSE E
AMINOÁCIDOS COM PROTEOLISADOS DE FÍGADO NA
HEPATOTOXICIDADE AGUDA INDUZIDA POR TETRACLORETO
DE CARBONO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Clínica e Cirurgia

Coordenador: Prof. Dr. Paulo Lourenço da Silva
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Uberlândia
Minas Gerais
2003

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Clínica e Cirurgia
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

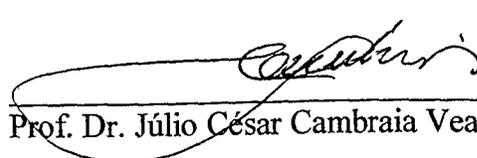
Dissertação defendida e aprovada, em 28 de março de 2003, pela comissão examinadora constituída por:



Prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti
Orientador



Prof. Dr. Humberto Eustáquio Coelho



Prof. Dr. Júlio César Cambraia Veado

Prof. Dr. Paulo Lourenço da Silva
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

À minha filha TAINÁ, significado da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela benção e força que me conduziu a alcançar mais esta vitória.

Aos meus pais, pelo amor, ensinamentos e apoio sempre presentes em todas as etapas da minha vida. Afinal, esta e as demais conquistas foram nossas.

Ao meu esposo, pai exemplar; pelo apoio e incentivo desde o início da graduação, pela paciência, compreensão e ajuda nas horas despendidas a este trabalho, pelo carinho, respeito e amor acima de tudo.

À minha irmã, pela amizade e ajuda na etapa final deste trabalho.

Ao meu orientador, o qual muito admiro e agradeço o apoio, ensinamentos, a paciência, dedicação, eficiência e imprescindível ajuda em todas as etapas deste trabalho, como também a valiosa amizade.

Ao Prof. Humberto pelo auxílio na interpretação patológica e alegria incessante.

Ao acadêmico Evandro pela ajuda, dedicação e compreensão, essenciais para que este trabalho se realizasse.

Aos técnicos do laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia, especialmente Sr. João Batista, pela ajuda e companheirismo durante a fase experimental.

Aos Profs. Neuber e Elmiro pela essencial contribuição para a execução da fase experimental.

Aos técnicos do laboratório de Bioquímica pela execução dos exames laboratoriais.

Ao Prof. Ednaldo pela execução da análise estatística.

À farmacêutica Rita pela manipulação dos medicamentos utilizados neste experimento.

Aos amigos e amigas pelo companheirismo e descontração nas horas difíceis.

Aos demais professores, colegas e funcionários que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade da realização deste curso.

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto, hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.”

Dalai Lama

SUMÁRIO

1.	LISTA DE TABELAS	VIII
2.	LISTA DE FIGURAS	IX-X
3.	RESUMO	XI
4.	SUMMARY	XII
5.	INTRODUÇÃO	1
6.	REVISÃO DE LITERATURA	2-7
7.	MATERIAL E MÉTODOS	7-10
8.	RESULTADOS	10-20
9.	DISCUSSÃO	21-23
10.	CONCLUSÕES	24
11.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25-28

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Valores médios (U/l) e desvio padrão da enzima ALT no soro de camundongos após administração de CCl₄. Uberlândia-MG, 2003.-----11
- Tabela 2- Valores médios e desvio padrão da enzima AST no soro de camundongos após administração de CCl₄. Uberlândia-MG, 2003.-----12
- Tabela 3- Valores médios e desvio padrão da enzima ALP no soro de camundongos após administração de CCl₄. Uberlândia-MG, 2003.-----13
- Tabela 4- Percentagem e desvio padrão da área de necrose no fígado de camundongos após administração de CCl₄. Uberlândia-MG, 2003.-----18
- Tabela 5- Valores médios do coeficiente e da porcentagem de variação dos métodos utilizados para avaliar os danos hepáticos.-----20

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Atividade da ALT no soro de camundongos após administração de CCl_4 .
Uberlândia-MG, 2003. -----11
- Figura 2- Atividade da AST no soro de camundongos após administração de CCl_4 .
Uberlândia-MG, 2003. -----12
- Figura 3- Atividade da ALP no soro de camundongos após administração de CCl_4 .
Uberlândia-MG, 2003. -----14
- Figura 4- Fotomicrografia do fígado de camundongo 24 horas após intoxicação com CCl_4 e tratamento com silimarina, onde podemos observar áreas de necrose (N) e áreas íntegras (I) (Hematoxilina e Eosina - HE), aumento aproximado de 126 x. -----15
- Figura 5- Fotomicrografia do fígado de camundongo 24 horas após intoxicação com CCl_4 e tratamento com silimarina, onde podemos observar áreas de necrose (N) e áreas íntegras (I) (Tricômico de Gomori - TG), aumento aproximado de 104 x. -----15
- Figura 6- Fotomicrografia do fígado de camundongo 48 horas após intoxicação com CCl_4 e tratamento com alcaçofra, onde podemos observar áreas de necrose (N) e áreas íntegras (I) (Hematoxilina e Eosina - HE), aumento aproximado de 104 x. -----16
- Figura 7- Fotomicrografia do fígado de camundongo 48 horas após intoxicação com CCl_4 e tratamento com Ornitargin, onde podemos observar áreas de necrose (N) e áreas íntegras (I) (Tricômico de Gomori - TG), aumento aproximado de 104 x. -----16

Figura 8- Fotomicrografia do fígado de camundongo 72 horas após intoxicação com CCl_4 e tratamento com Acrosin, onde podemos observar áreas de necrose (N) e áreas íntegras (I) (Hematoxilina e Eosina - HE), aumento aproximado de 126 x. -----17

Figura 9- Fotomicrografia do fígado de camundongo 72 horas após intoxicação com CCl_4 e tratamento com Acrosin, onde podemos observar áreas de necrose (N) e áreas íntegras (I) (Tricômico de Gomori - TG), aumento aproximado de 104 x. -----17

Figura 10- Percentagem de área necrosada no fígado de camundongos, 24 horas após administração de CCl_4 . Uberlândia-MG, 2002. -----19

Figura 11- Percentagem de área necrosada no fígado de camundongos, 48 horas após administração de CCl_4 . Uberlândia-MG, 2002. -----19

Figura 12- Percentagem de área necrosada no fígado de camundongos, 72 horas após administração de CCl_4 . Uberlândia-MG, 2002. -----20

RESUMO

O fígado é um órgão importante do metabolismo e de funções secretoras e excretoras do corpo de mamíferos, sendo que desordens hepáticas são numerosas e variadas. Diante da controvérsia a respeito da eficácia de drogas que protegem o tecido hepático e do intenso uso destes produtos na clínica veterinária em hepatopatias pré-instaladas, este experimento teve como objetivo verificar os efeitos em áreas de necrose hepática dos aminoácidos com levulose (Ornitargin[®]), aminoácidos com proteólisados de fígado (Acrosin[®]), mel e extratos de silimarina (*Silybum marianum*) e alcachofra (*Cynara scolymus*) na hepatotoxicidade aguda induzida por tetracloreto de carbono em camundongos. Para verificar tais efeitos, camundongos Swiss foram intoxicados com tetracloreto de carbono e tratados com estas substâncias. Os tratamentos foram avaliados 24, 48 e 72 horas após a intoxicação através da dosagem sérica de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP), bem como pela quantificação da área de necrose hepática. O mel e aminoácidos com levulose, e com proteólisados de fígado foram ineficientes no tratamento de hepatopatia tóxica aguda. Já a silimarina e a alcachofra foram eficazes para melhorar os níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) nas primeiras 48 horas após a intoxicação, porém após 72 horas, apresentavam níveis semelhantes aos demais tratamentos e ao grupo intoxicado e não tratado. Todos os tratamentos testados não foram eficientes para diminuir a área de necrose hepática.

PALAVRAS-CHAVE: hepatoprotetor, fígado, intoxicação, tetracloreto de carbono, camundongo

SUMMARY

The liver is a key organ in the metabolism and in the secretory and excretory functions of the body of mammals, with hepatic disorders being numerous and varied. In light of the controversy regarding the efficacy of the drugs that protect the liver and the intense use of these products in the veterinary clinic for the treatment of pre-installed hepatopathy, this experiment aimed to verify the effects in areas with hepatic necrosis of aminoacids such as levulose (Ornitargin[®]), aminoacids with liver proteolysates (Acrosin[®]), honey and silymarin (*Silybum marianum*) and artichoke (*Cynara scolymus*) extracts in the acute hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in mice. In order to verify such effects, Swiss mice were intoxicated with carbon tetrachloride and treated with these substances. The treatments were evaluated at 24, 48 and 72 hours after intoxication through the seric dosage of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP), as well as the quantification of the hepatic necrosis. Honey and aminoacids with levulose, and aminoacids with liver proteolysates were inefficient in the treatment of acute toxic hepatopathy. On the other hand, silymarin and artichoke were efficient in the improvement of the seric levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in the first 48 hours after an intoxication, though after 72 hours, they presented levels similar to the other treatments and to the non-treated, intoxicated group. All the treatments tested were inefficient regarding the reduction of the area with hepatic necrosis.

Key words: liver protectors, liver, intoxication, carbon tetrachloride, mice

INTRODUÇÃO

O fígado é um órgão importante do metabolismo e de funções secretoras e excretoras do corpo de mamíferos, sendo as desordens hepáticas numerosas e variadas. (AKTAY et al., 2000). As hepatopatias mais freqüentes na clínica veterinária são as de origem tóxicas, principalmente alimentares ou medicamentosas

Várias substâncias são indicadas com o intuito de proteger o tecido hepático, sendo conceituadas como “hepatoprotetores”, promovendo a restauração do tecido hepático e impedindo lesões nestes tecidos. Contudo, existe grande controvérsia sobre a eficácia dos mesmos. Na realidade, de maneira geral, estes medicamentos são utilizados em hepatopatias pré-instaladas e portanto, o termo hepatoprotetor não é adequado para tal uso.

Um dos métodos de avaliação de tratamentos com hepatoprotetores é a intoxicação experimental com tetracloreto de carbono (CCL_4). Este por sua vez, induz danos hepáticos agudos incluindo necrose centrolobular, constituindo em um método para avaliação de tratamentos com hepatoprotetores (XU et al., 1999).

Dentre as substâncias utilizadas no tratamento de hepatopatias tóxicas pode-se citar a silimarina, a alcachofra, aminoácidos com levulose, aminoácidos com proteolisados de fígado e glicose oral ou injetável. Recentemente, o mel vem sendo indicado empiricamente no tratamento destas patologias (HEITKAMP & BUSCH-STOCKFISCH, 1986).

Diante da controvérsia a respeito da eficácia dos “hepatoprotetores” e do intenso uso destes produtos na clínica veterinária em hepatopatias pré-instaladas, este experimento teve como objetivo verificar os efeitos em áreas de necrose hepática dos aminoácidos com levulose (Ornitargin[®]), aminoácidos com proteolisados de fígado (Acrosin[®]), mel e extratos de silimarina (*Silybum marianum*) e alcachofra (*Cynara scolymus*) na hepatotoxicidade aguda induzida por tetracloreto de carbono (CCL_4) em camundongos.

REVISÃO DE LITERATURA

Estudo histopatológico realizado por AKTAY et al. (2000) demonstrou que CCl_4 induz degeneração hidrópica e gordurosa dos hepatócitos, necrose focal, congestão na veia central e sinusóides, infiltração de linfócitos e proliferação de células Kupffer.

O tetracloreto de carbono (CCl_4) é responsável por causar várias alterações em organelas celulares, incluindo núcleo, mitocôndria, lisossomos e membranas plasmáticas. O dano celular inicial ocorre no retículo endoplasmático, local de diversas funções oxidativas (KAMINSKI et al., 1990). A geração de radicais livres altamente reativos, como o triclorometil (CCl_3) pode iniciar a peroxidação lipídica com resultantes danos teciduais (RECKNAGEL & GLENDE, 1973; FARBER & EL-MOFTY, 1975; KAMINSKI et al., 1990; WONG, CHAN, LEE, 1998; MANSOUR, 2000). Posteriormente, ocorre processo inflamatório originado dos produtos ativados pelas células Kupffer, os macrófagos residentes no fígado (EDWARDS et al., 1993).

O fígado é capaz de regeneração tissular desencadeada por injúrias físicas ou químicas. Tetracloreto de carbono (CCl_4) causa injúria hepática aguda e reversível caracterizada por necrose centrolobular, seguida de regeneração hepática e reparação tecidual (FARBER & EL-MOFTY, 1975; RECKNAGEL & GLENDE, 1973).

Em pacientes com doença hepática grave, ocorre habitualmente aumento na concentração plasmática de aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina e metionina, e redução dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina. Diante disto, infusões de soluções contendo alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada têm sido usadas no tratamento de encefalopatia hepática aguda e crônica em humanos. Os resultados têm sido extremamente conflitantes, talvez relacionados às diferenças na natureza das soluções de aminoácidos, o modo de administração e os pacientes estudados, ou seja, o uso não é de valor comprovado (SHERLOCK, 1991).

FERREYRA, FENOS, CASTRO (1983) utilizaram cisteína e triptofano, em ratos, no tratamento de necrose hepática intensa provocada por CCl_4 e obtiveram efeitos benéficos com o triptofano. Entretanto, segundo os autores, a administração de cisteína resulta em possível participação na síntese de proteínas, mas seus efeitos protetores na necrose hepática induzida são discutíveis.

O mel vem sendo utilizado empiricamente em tratamentos, contudo seus efeitos fisiológicos são discutíveis. Estes efeitos são em grande parte generalizações de observações experimentais e clínicas e não são apoiados por métodos científicos (HEITKAMP & BUSCH-STOCKFISCH, 1986).

Os medicamentos populares originários de plantas e animais são largamente utilizados em doenças hepato-biliares e recentes estudos comprovam serem benéficos (AKTAY, et al., 2000). Dentre várias plantas utilizadas em complicações hepáticas, *Silybum marianum* e *Cynara scolymus* são consideradas as de maior importância (ADZET, CAMARASA, LAGUNA, 1987).

Silimarina, derivada da planta *Silybum marianum* é composta por uma mistura de flavonóides: silidianina, silicristina e silibina (FLORA et al., 1998; PEPPING, 1999). O extrato desta planta é utilizado há séculos como um remédio natural em doenças hepatobiliares (FLORA et al., 1998) e tem sido estudado em exposições tóxicas natural e industrial (VOGEL et al., 1984).

Experimentos realizados para comprovar a eficácia da silimarina em tratamentos preventivos e curativos demonstraram resultados divergentes.

Alguns autores afirmaram que o extrato leitoso da planta possui utilidade clínica em uma variedade de desordens hepáticas, incluindo hepatite aguda e crônica, hepatite e cirrose induzidas por toxinas e drogas (PEPPING, 1999) e enfermidades hepáticas alcoólicas (LANG, et al., 1991; PEPPING, 1999).

Interações benéficas envolvendo extrato da silimarina foram observadas em estudos com ratos e camundongos, causando decréscimo na hepatotoxicidade induzida por butirofenonas, fenotiazínicos, acetaminofen, halotano e álcool. (BRINKER, 1998).

O preciso mecanismo de ação da silimarina permanece obscuro (DEHMLow, ERHARD, GROOT, 1996). Dentre as descrições das ações da silimarina, têm-se a estabilização de membranas plasmáticas, aumento da síntese de proteínas (LENG-PESCHLOW & STRENGE-HESSE, 1991; FLORA et al., 1998), decréscimo dos promotores tumorais, ação contra radicais livres (FLORA et al., 1998), prevenção da peroxidação lipídica e posteriores danos hepáticos, além de mudanças na composição dos fosfolipídios de membrana (LANG et al., 1991).

DEHMLow, ERHARD, GROOT (1996) descreveram que altas concentrações de silibina, um dos flavonóides da silimarina, diminuem a formação de radicais livres a partir da ativação de células Kupffer e promove significativa inibição

da via 5-lipoxigenase. Citaram ainda que a seletiva inibição de leucotrienos derivados das células Kupffer pode explicar as propriedades hepatoprotetoras da silibina.

Avaliações patológicas de fígados de camundongos e ratos intoxicados com Microcystin-LR, um potente hepatotóxico sintetizado por algas e posteriormente tratados com única dose de silimarina, foram realizadas por MEREISH et al. (1991). Os resultados demonstraram abolição dos efeitos letais, mudanças patológicas e decréscimo nos níveis das enzimas sorbitol desidrogenase, alanina aminotransferase e lactato desidrogenase induzidos pela intoxicação.

BOARI et al. (1981) realizaram terapia em humanos com silimarina em casos de exposição a solventes, tintas e colas que resultaram em enfermidade hepática subaguda ou crônica, porém, não constatarem alteração nos níveis de AST e ALT. Os autores avaliaram 14 pacientes expostos cronicamente a organofosforados (malation) e tratados com silimarina por 1 mês e demonstraram ausência de diferença significativa nos testes de função hepática quando comparados com grupo controle.

Contrariamente, SZILARD, SZENTGYORGYI, DEMETER (1988) tratou 30 pacientes humanos expostos por 5 anos a tolueno e/ou xileno, resultando em melhora das enzimas AST, ALT e contagem total de plaquetas.

DESPLACES et al. (1975) avaliaram o tratamento curativo com silimarina após intoxicação por faloidina, substância extraída do cogumelo *Amanita phalloides*. Obtiveram total ou parcial normalização de várias atividades enzimáticas, porém mais evidente no tratamento curativo que o preventivo. A avaliação da proteção foi através da taxa de sobrevivência dos camundongos e obtiveram que a dose de 15 mg/Kg de silimarina, quando administrada 60 minutos antes da toxina, protegeu todos os animais contra os efeitos tóxicos. Quando injetada 10 minutos após, a dose de 100 mg/Kg ofereceu total proteção. Estes autores ressaltaram que se o tempo entre a administração da substância tóxica e início do tratamento aumentam, a eficácia da silimarina decresce; após 30 minutos o efeito curativo é desprezível, pois a taxa de sobrevivência é menor que 20%. Na análise histoquímica e histoenzimológica, demonstraram que durante a intoxicação dos camundongos com faloidina, o uso de silimarina inibiu os efeitos tóxicos da substância e regulou a função do hepatócito, quando administrada 60 minutos antes ou 10 minutos após o tóxico.

VOGEL et al. (1984) administrou liofilizado do cogumelo em 23 cães beagles, resultando em vômito e diarreia após 16 horas. Destes, 11 cães que receberam 50 mg/Kg de silibina cinco e 24 horas após o envenenamento vieram a óbito e

apresentaram baixos níveis nos testes de função hepática, além de menor tempo de prolongação da protrombina. Observaram ainda, acentuada redução de necroses hemorrágicas histológicas evidentes.

HRUBY(1984) concluíram que a infusão de silibina (33mg/Kg/dia), 48 horas após a ingestão do cogumelo, preveniu severos danos hepáticos em pacientes humanos.

LETTÉRON et al. (1990) avaliaram os mecanismos de proteção da silimarina contra a peroxidação lipídica e hepatotoxicidade em camundongos e concluíram que o pré-tratamento com silimarina (800 mg/Kg i.p.) causou diminuição estatisticamente significativa nos níveis da enzima ALT, 24 horas após a intoxicação por CCL₄ (18 µL/Kg i.p.). Após 48, 72 e 96 horas da administração de CCL₄ não houve diferença significativa entre os grupos tratado e controle. Entretanto, este pré-tratamento com silibina (800 mg/Kg i.p.) 30 minutos antes da administração de CCL₄ (18 µL/Kg i.p.) não melhorou a concentração da enzima ALT ou histológico em 24 horas. Necrose hepática centrolobular estava presente em 83% dos camundongos que receberam somente CCL₄ e 100% dos que foram pré-tratados com silibina. Em contraste, necrose hepática foi observada em 45% dos camundongos pré-tratados com silimarina.

Segundo PEPPING (1999), a vantagem da utilização de silimarina em pacientes com injúria hepática causada por longos períodos de exposição a solventes, tintas e outros químicos industriais é obscura.

FLORA et al. (1998) citaram que muitas experiências clínicas designadas para atribuir a eficácia da silimarina são difíceis de esclarecer, pois são falhas devido pequeno número de teses, variabilidade em etiologias e severidade das doenças estudadas, assim como o uso inconsistente de pacientes alcoólatras, dosagens heterogêneas, uso incoerente de grupo controle, conclusões com definições inadequadas. Descreveram ainda que demonstrações bioquímicas e histológicas estatisticamente significantes na recuperação de danos hepáticos são exceções. Em adição, ressaltaram que a habilidade intrínseca do fígado em recuperar-se através da remoção de hepatotoxinas, a descontinuação do uso de álcool pelos pacientes ou resolução da hepatite aguda, não são consideradas nestes estudos.

Avaliações dos efeitos da alcachofra (*Cynara scolymus*) em cultura de hepatócitos de ratos foram realizadas por GEBHARDT (1997) que demonstrou acentuado potencial antioxidativo da planta. Já ADZET, CAMARASA, LAGUNA (1987) testou os componentes polifenólicos da alcachofra nos hepatócitos em cultura e

observou que somente a cinarina, e em menor extensão o ácido cafêico, demonstraram ação citoprotetora contra a toxicidade induzida por CCL₄.

AKTAY et al. (2000) avaliaram os efeitos do pré-tratamento com extrato da alcachofra (500 mg/Kg) em injúria hepática experimental induzida por CCl₄ (2,5 ml/Kg) e observaram potente ação inibitória nos níveis das enzimas plasmáticas ALT e AST. Na análise histopatológica, avaliada através de sistema de escore, observaram efeito altamente inibitório do extrato de bráctea (pseudoflor) da *C. scolymus* e efeito moderado com o extrato do receptáculo da planta.

Os níveis séricos das enzimas hepáticas são usualmente mensurados para detectar hepatopatias.

Alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima citosólica considerada como hepatoespecífica no cão e gato, embora também esteja presente no coração, rins e músculos. O aumento imediato na concentração sérica da ALT segue-se à lesão hepatocelular, ou a alteração na permeabilidade da membrana celular. A magnitude do aumento de ALT, comumente correlaciona-se com o número de células envolvidas, embora não se possa diferenciar entre distúrbios focais e difusos (CENTER, 1997).

Aspartato aminotransferase (AST) está presente em concentrações substanciais numa ampla variedade de tecidos. AST hepática está localizada no citosol, estando associada às membranas mitocondriais. O aumento da concentração sérica da AST pode resultar de alteração na permeabilidade da membrana, necrose e inflamação (CENTER, 1997).

MEYER, COLES, RICH (1995) citaram que um fluxo biliar prejudicado (colestase) resulta numa elevada produção de fosfatase alcalina (ALP) em todas as espécies.

O aumento da concentração sérica das enzimas hepáticas não está necessariamente associado a afecção hepática clinicamente significativa. (CENTER, 1997). Um paciente pode desenvolver necrose hepática aguda fatal com diminuição dos valores das transaminases (SHERLOCK, 1991; MEYER, COLES, RICH, 1995) Portanto, segundo CENTER (1997), devemos ter cuidado na interpretação da concentração das enzimas hepáticas.

As enzimas não devem ser utilizadas como indicadores prognósticos, a menos que sejam seqüencialmente monitoradas. Determinações únicas da concentração enzimática não devem ser utilizadas como fundamento para decisões clínicas

importantes. Deve-se efetuar a avaliação histopatológica de biópsia hepática; afim de confirmar o diagnóstico (SHERLOCK, 1991; CENTER, 1997).

Uma diminuição da concentração enzimática pode indicar melhora, resolução de processo ou a suspensão do medicamento de indução enzimática, alteração da arquitetura intra-hepática, limitada magnitude da resposta à lesão ou a carência de hepatócitos viáveis capazes de liberar enzima (MEYER, COLES, RICH, 1995; CENTER, 1997). Desta forma, moderados aumentos na concentração sérica da ALT e AST num paciente icterico, subsequente a uma lesão aguda com diminuição rápida (horas ou dias) destas enzimas, sugerem um fígado mais severamente danificado com hepatócitos pouco viáveis ou em regeneração (CENTER, 1997).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados 190 camundongos Swiss, albinos, jovens, machos, com pesos entre 20-30 gramas, provenientes do biotério da Vallé S.A.- Uberlândia, MG. Foram mantidos em gaiolas próprias com acesso à ração específica e água *ad libitum* durante todo o período experimental, com iluminação alternada claro/escuro por períodos de 12 horas.

Um grupo contendo 10 animais foi utilizado para obtenção dos valores fisiológicos da bioquímica das enzimas hepáticas (grupo controle). Os camundongos restantes foram divididos em seis grupos de 30 animais com três subgrupos de 10 animais, os quais foram intoxicados experimentalmente com tetracloreto de carbono e posteriormente tratados, segundo delineado a seguir:

2. Tratamentos

Grupo 1: administração de solução a 13% de CCl_4 em óleo de milho, via intraperitoneal, na dose de 1 ml/Kg.

Grupo 2: administração de solução a 13% de CCl_4 em óleo de milho, via intraperitoneal, na dose de 1 ml/Kg e posterior administração via intraperitoneal de

Acrosin® diluído 1:1 em água bidestilada na dose de 3 ml/Kg, contendo os aminoácidos metionina, cistina, cisteína, colina e xantina e proteólitos de fígado a 10%. A primeira dose do medicamento foi administrada após 30 minutos da aplicação do tetracloreto de carbono e as doses subsequentes a cada 24 horas.

Grupo 3: administração de solução a 13% de CCl₄ em óleo de milho; via intraperitoneal; na dose de 1 ml/Kg e posterior administração via intraperitoneal de Ornitargin® diluído 1:1 em água bidestilada na dose de 3 ml/Kg, contendo 750 mg de cloridrato de L-arginina, 200 mg de aspartato de L-ornitina, 50 mg de L-citrulina e 2,0 g de levulose. A primeira dose do medicamento foi administrada após 30 minutos da aplicação do CCl₄ e as doses subsequentes a cada 24 horas.

Grupo 4: administração de solução a 13% de CCl₄ em óleo de milho, via intraperitoneal, na dose de 1 ml/Kg e posterior administração oral de mel de florada de eucalipto na dose de uma gota/animal, 30 minutos após aplicação do CCl₄ e as doses subsequentes a cada 8 horas.

Grupo 5: administração de solução a 13% de CCl₄ em óleo de milho, via intraperitoneal, na dose de 1 ml/Kg e posterior administração via intraperitoneal de solução contendo 20mg/ml de alcachofra, na dose de 120mg/Kg. A primeira dose do medicamento foi administrada após 30 minutos da aplicação do tetracloreto de carbono e as doses subsequentes a cada 8 horas.

Grupo 6: administração de solução a 13% de CCl₄ em óleo de milho, via intraperitoneal, na dose de 1 ml/Kg e posterior administração via intraperitoneal de solução a 2% de silimarina solubilizada por NaOH (pH 8,55), na dose de 50 mg/Kg. A primeira dose do medicamento foi administrada após 30 minutos da aplicação do tetracloreto de carbono e as doses subsequentes a cada 24 horas.

3. Análises Bioquímicas

Foram realizadas análises bioquímicas das enzimas hepáticas (alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP).

Os parâmetros bioquímicos normais foram estimados em uma análise precedente à administração do CCl₄ em um grupo de 10 animais (grupo controle). As

análises subseqüentes de 10 animais de cada subgrupo foram após 24, 48 e 72 horas da administração do agente tóxico (CCl₄).

Para a colheita das amostras de sangue, os animais eram mantidos em caixa anestésica e submetidos à anestesia inalatória com enflurano a 2,5% e fluxo de oxigênio de 1,5%.

Posteriormente, amostras de sangue venoso (1 a 1,5 ml) foram coletadas mediante decapitação dos animais conforme recomendado pela AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (2001) e transferidas para tubos heparinizados para posterior obtenção do plasma.

Todas as análises bioquímicas foram realizadas em espectrofotômetro Cobas Integra 700, contendo kits específicos Roche®, por meio de métodos colorimétricos enzimáticos a 37°C, contendo amino-nitrobenzoato para dosagem da FA e método modificado sem pirodoxalfosfato para dosagem das enzimas AST e ALT, de acordo com a IFCC (International Federation of Clinical Chemistry).

4. Análise histológica:

Após colheita de sangue, o lobo hepático lateral esquerdo de 6 animais escolhidos aleatoriamente em cada subgrupo foram removidos. Estes fragmentos foram fixados em formol a 10 % por 48 horas e incluídos em parafina segundo técnica histológica clássica. Cortes histológicos de aproximadamente 7 µm de espessura foram obtidos por microtomia e corados pela técnica Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricômico de Gomori (TG) (MICHALANY, 1980).

Todos os cortes histológicos foram analisados através de 20 imagens digitalizadas, obtidas em microscópio Olympus Triocular BX 40 acoplado a câmera Olympus Oly 200, ligada a um computador PC através de placa digitalizadora Data Translation 3153.

Utilizando-se o software HL Image 97 as áreas de necrose foram marcadas de maneira interativa, determinando-se a porcentagem ocupada por estas áreas em cada imagem, obtendo-se posteriormente a média de cada corte.

5- Análise estatística:

Os valores obtidos na análise bioquímica e histológica, nos diferentes intervalos de tempo observados, foram analisados estatisticamente em cada grupo através da

Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey para comparação entre médias (Programa STATISTICA), no nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

Análise bioquímica:

Alanina aminotransferase (ALT):

A análise estatística demonstrou que 24 horas após a administração de CCl_4 , todos os grupos apresentavam valores médios de ALT maiores que o grupo controle. Os grupos que receberam CCl_4 , Acrosin, mel, silimarina e alcachofra apresentavam concentrações séricas semelhantes. Já o grupo tratado com Ornitargin apresentou média significativamente maior em relação aos grupos tratados com silimarina e alcachofra, contudo semelhante ao grupo não tratado (CCl_4) e aos grupos tratados com Acrosin e mel (Tabela 1 e Figura 1).

Após 48 horas, os valores desta enzima nos animais do grupo não tratado (CCl_4) e dos grupos tratados com Acrosin, Ornitargin e mel estavam superiores aos animais do grupo controle. Já os grupos tratados com silimarina e alcachofra possuíam médias estatisticamente semelhantes ao grupo controle, embora semelhantes ao grupo não tratado e aos grupos tratados com Ornitargin e mel. A média do grupo tratado com Acrosin apresentou-se estatisticamente superior ao grupo tratado com silimarina, apesar de ser semelhante aos demais grupos (Tabela 1 e Figura 1).

Após 72 horas, os valores da enzima dos grupos Ornitargin, Acrosin e silimarina retornaram aos valores normais. Já o grupo não tratado (CCl_4) e os grupos que receberam mel e alcachofra possuíam médias semelhantes, porém não retornaram os níveis séricos normais (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1- Valores médios (U/l) e desvio padrão da enzima ALT no soro de camundongos após administração de CCl₄. Uberlândia-MG, 2003.

Grupos	Horas após intoxicação		
	24	48	72
Controle	72 ^a ± 53	72 ^a ± 53	72 ^a ± 53
CCL ₄	19500 ^{bc} ± 12569	3074 ^{bc} ± 2394	332 ^b ± 1529
Acrosin	19888 ^{bc} ± 12566	4351 ^c ± 3663	236 ^{ab} ± 917
Ornitargin	23120 ^c ± 14296	3119 ^{bc} ± 4133	239 ^{ab} ± 886
Mel	17455 ^{bc} ± 10625	2800 ^{bc} ± 3432	239 ^b ± 977
Silimarina	13170 ^b ± 7079	1349 ^{ab} ± 1900	208 ^{ab} ± 934
Alcachofra	13528 ^b ± 8347	1872 ^{abc} ± 2492	282 ^b ± 411

Letras iguais em uma mesma coluna representam médias estatisticamente iguais.

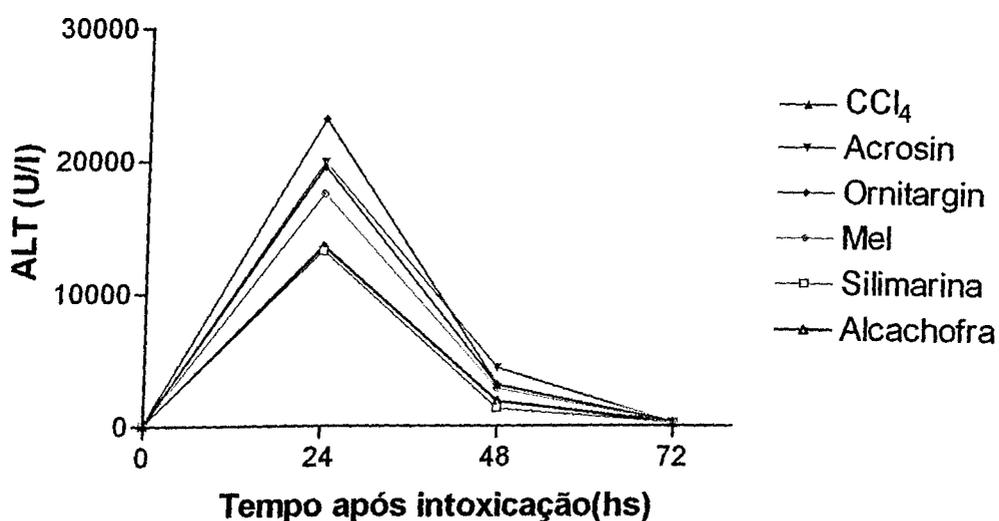


Figura 1- Concentração da ALT no soro de camundongos após administração de CCl₄. Uberlândia-MG, 2003

Aspartato aminotransferase (AST):

A análise estatística demonstrou que 24 horas após a administração de CCl₄, o grupo não tratado (CCL₄) e os grupos tratados com Acrosin e Ornitargin possuíram níveis séricos semelhantes entre si e superiores ao grupo controle. Os grupos tratados com silimarina e alcachofra também apresentaram médias superiores ao controle, porém inferiores ao grupo não tratado (CCl₄) e aos grupos tratados com Acrosin e Ornitargin e, semelhantes ao grupo tratado com mel (Tabela 2 e Figura 2).

Após 48 horas, os valores da enzima AST de todos os grupos foram estatisticamente semelhantes entre si e os grupos não tratado e que receberam silimarina e alcachofra também se assemelharam ao grupo controle (Tabela 2 e Figura 2).

Após 72 horas, os valores da enzima decresceram, porém os grupos que receberam CCl₄ e silimarina ainda não se assemelharam ao grupo controle, ou seja, ainda não haviam retornado ao normal (Tabela 1 e Figura 2).

Tabela 2- Valores médios (U/l) e desvio padrão da enzima AST no soro de camundongos após administração de CCl₄, Uberlândia-MG, 2003.

Grupos	Horas após intoxicação		
	24	48	72
Controle	159 ^a ± 43	159 ^a ± 43	159 ^a ± 43
CCL ₄	24752 ^c ± 14325	3829 ^{ab} ± 2735	2679 ^c ± 1794
Acrosin	27130 ^c ± 14206	6489 ^b ± 4357	1442 ^{abc} ± 1095
Ornitargin	26525 ^c ± 16140	5557 ^b ± 4746	1426 ^{abc} ± 1053
Mel	23151 ^{bc} ± 11940	5399 ^b ± 3946	1309 ^{abc} ± 1175
Silimarina	13950 ^b ± 7564	3385 ^{ab} ± 2237	1846 ^{bc} ± 1075
Alcachofra	14799 ^b ± 8783	4564 ^{ab} ± 3000	752 ^{ab} ± 490

Letras iguais em uma mesma coluna representam médias estatisticamente iguais.

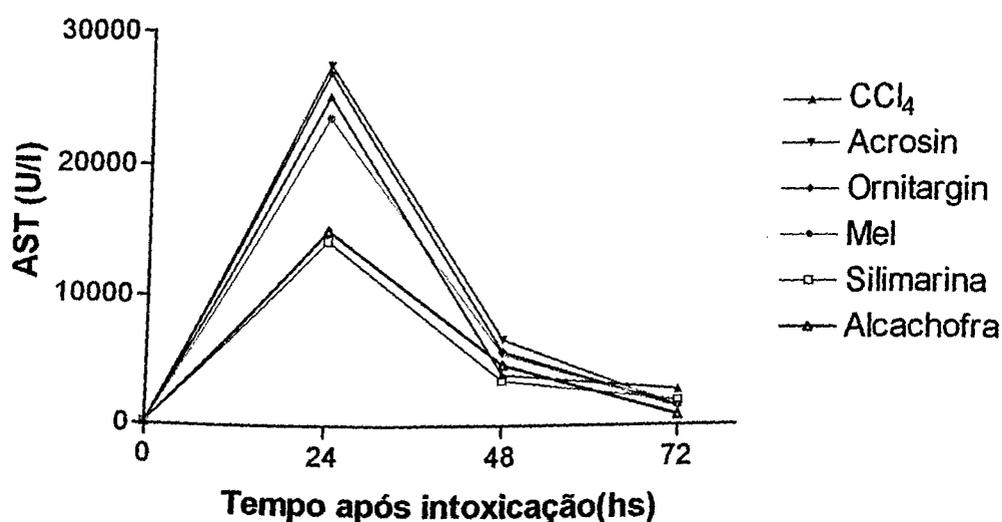


Figura 2- Concentração da AST no soro de camundongos após administração de CCl₄, Uberlândia-MG, 2003

Fosfatase alcalina (ALP):

Após 24 horas, todos os grupos apresentaram médias estatisticamente semelhantes ao grupo controle, exceto o grupo que recebeu mel que obteve média superior aos demais.

Após 48 horas, os valores da enzima do grupo não tratado (CCl₄) e dos grupos que receberam mel e silimarina se assemelharam ao grupo controle. Já os grupos que receberam Ornitargin, Acrosin e alcachofra possuíram médias semelhantes entre si, porém não retornaram os níveis séricos normais.

Após 72 horas, os níveis da enzima de todos os grupos se assemelharam ao grupo controle, ou seja, os níveis séricos retornaram aos valores normais.

Tabela 3- Valores médios (U/l) e desvio padrão da enzima ALP no soro de camundongos após administração de CCl₄. Uberlândia-MG, 2003.

Grupos	Horas após intoxicação		
	24	48	72
Controle	153 ^a ± 38	153 ^a ± 38	153 ^a ± 38
CCL ₄	305 ^{ab} ± 118	244 ^{ab} ± 107	177 ^a ± 108
Acrosin	306 ^{ab} ± 91	332 ^b ± 169	145 ^a ± 56
Ornitargin	304 ^{ab} ± 177	346 ^b ± 157	163 ^a ± 56
Mel	350 ^b ± 101	239 ^{ab} ± 105	177 ^a ± 88
Silimarina	176 ^a ± 84	156 ^a ± 98	141 ^a ± 101
Alcachofra	283 ^{ab} ± 161	334 ^b ± 88	230 ^a ± 59

Letras iguais em uma mesma coluna representam médias estatisticamente iguais.

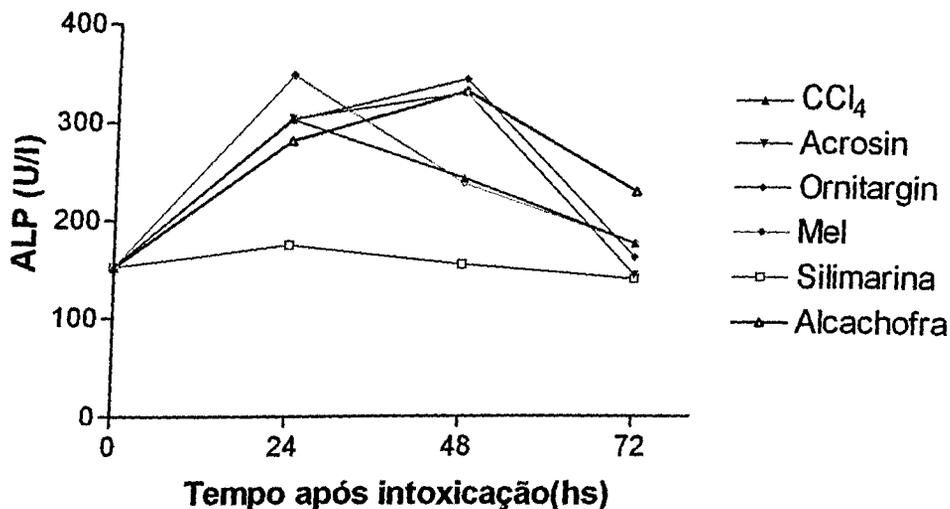


Figura 3- Concentração da ALP no soro de camundongos após administração de CCl₄. Uberlândia-MG, 2003.

Análise histológica

A análise histopatológica demonstrou que 24 horas após a intoxicação, o fígado dos camundongos apresentaram áreas de necrose de coagulação em torno da veia terminal hepática (necrose perivenular) (Figuras 4 e 5), hiperemia, intensa hemorragia e discreta presença de metamorfose gordurosa, independente do grupo. Após 48 horas, evidenciou-se áreas de necrose de coagulação perivenular (Figuras 6 e 7), intensa hemorragia, discreta hiperemia e infiltração de células mononucleares na área de necrose, em todos os grupos estudados. Após 72 horas, todos os grupos apresentaram áreas de necrose (Figuras 8 e 9) marcada principalmente por picnose, cariorex e cariólise, invasão de leucócitos (neutrófilos, linfócitos e monócito), presença de células aumentadas de volume com citoplasma irregular (degeneração turva ou edema celular).

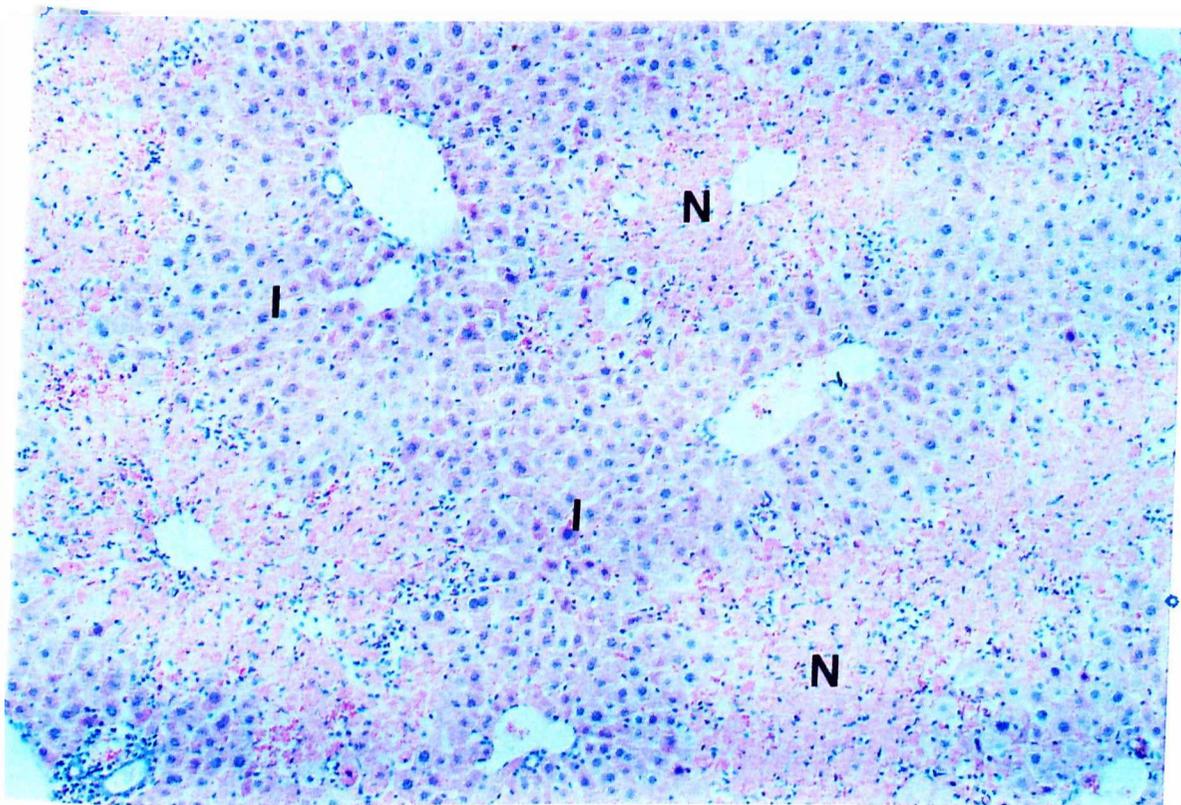


Figura 4- Fotomicrografia do fígado de camundongo 24 horas após intoxicação com CCl_4 e tratamento com silimarina, onde pode-se observar áreas de necrose (N) e áreas íntegras (I) (Hematoxilina e Eosina - HE), aumento aproximado de 126 x.

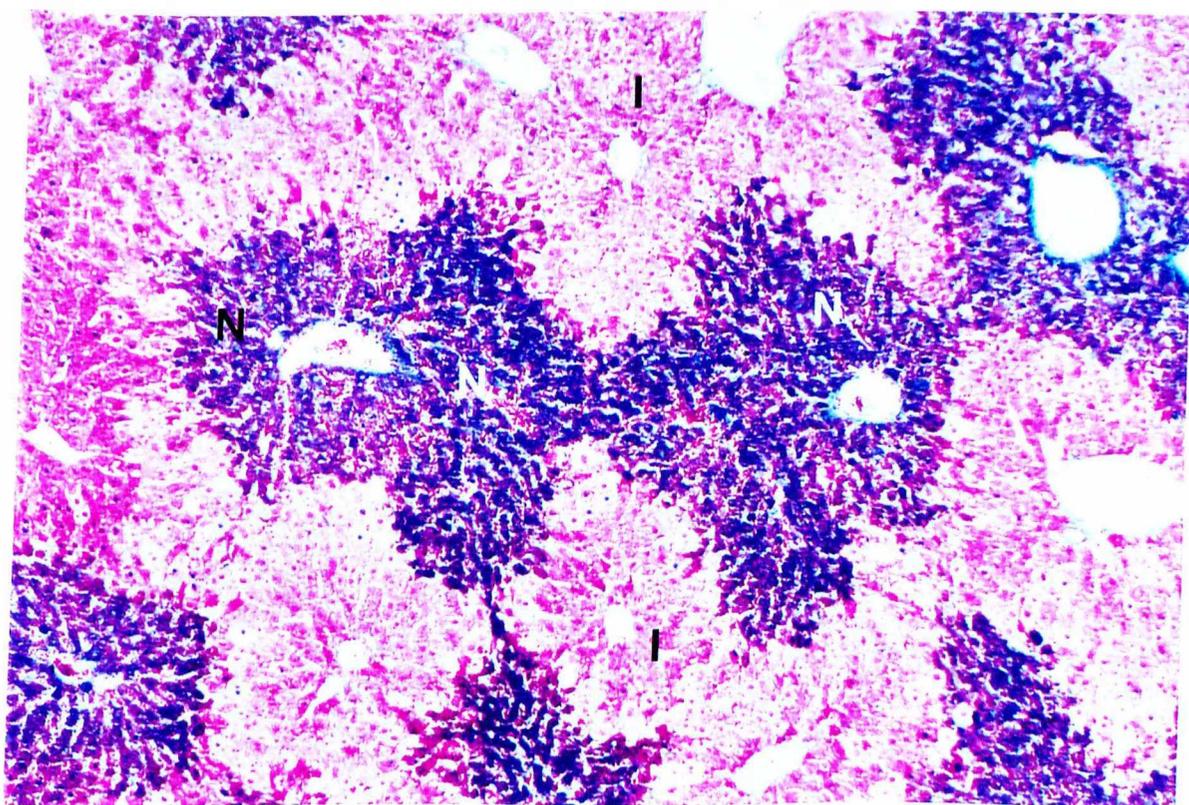


Figura 5- Fotomicrografia do fígado de camundongo 24 horas após intoxicação com CCl_4 e tratamento com silimarina, onde pode-se observar áreas de necrose (N) e áreas íntegras (I) (Tricômico de Gomori - TG), aumento aproximado de 104 x.

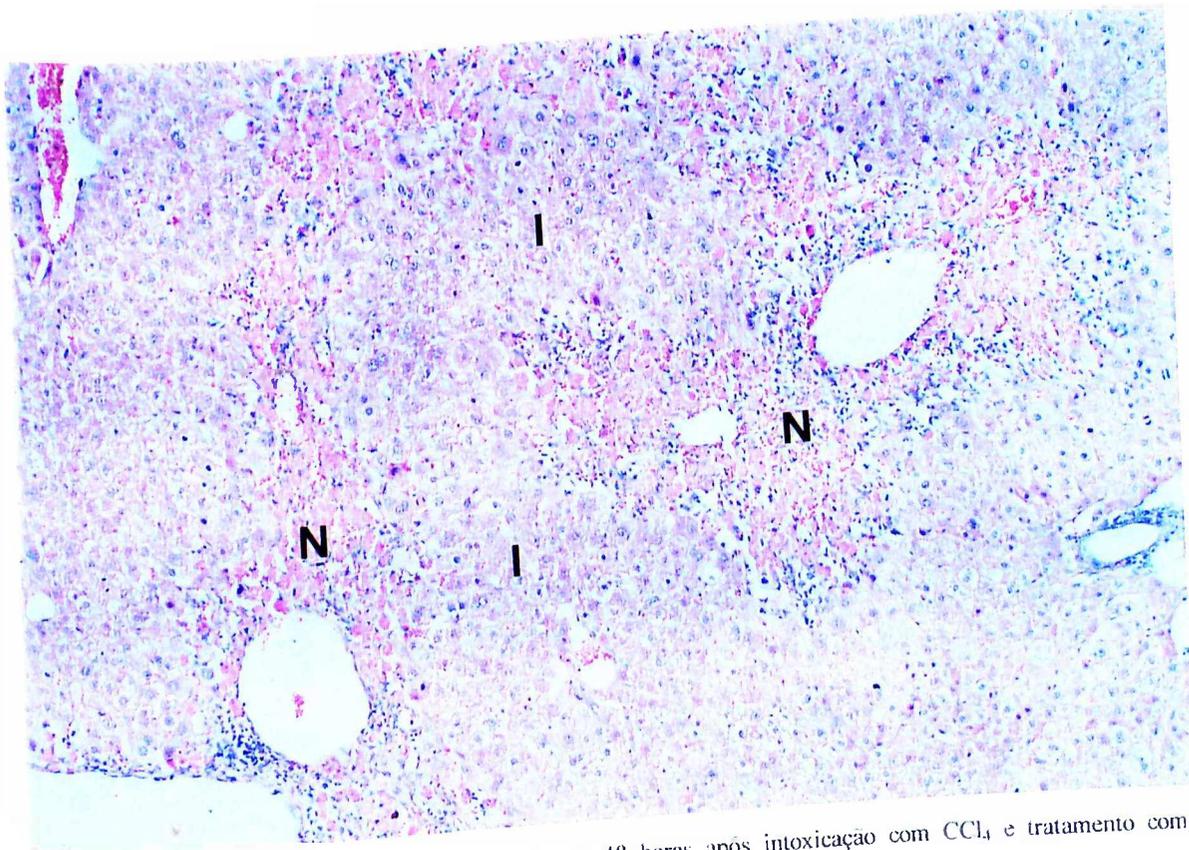


Figura 6- Fotomicrografia do fígado de camundongo 48 horas após intoxicação com CCl_4 e tratamento com alcachofra, onde pode-se observar áreas de necrose (N) e áreas íntegras (I) (Hematoxilina e Eosina - HE), aumento aproximado de 104 x.

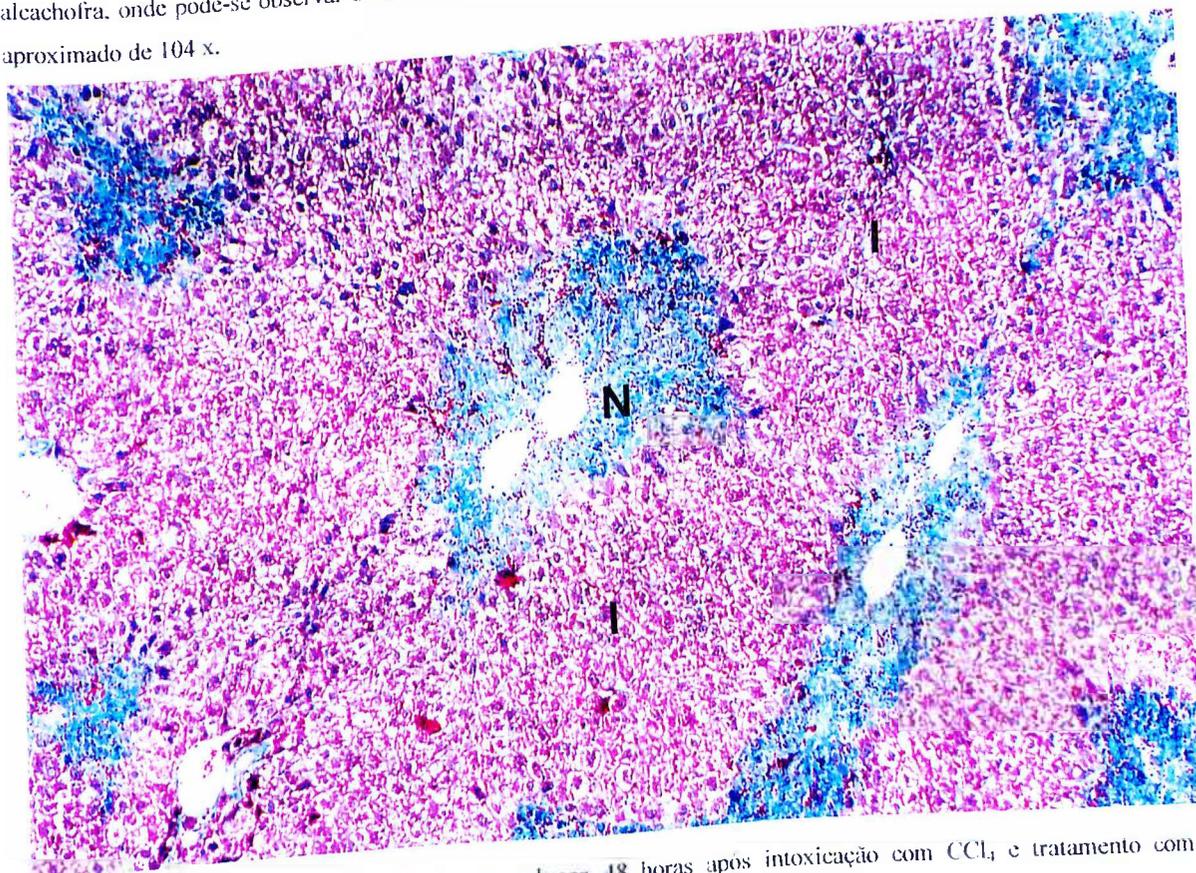


Figura 7- Fotomicrografia do fígado de camundongo 48 horas após intoxicação com CCl_4 e tratamento com Ornitargin, onde pode-se observar áreas de necrose (N) e áreas íntegras (I) (Tricômico de Gomori - TG), aumento aproximado de 104 x.

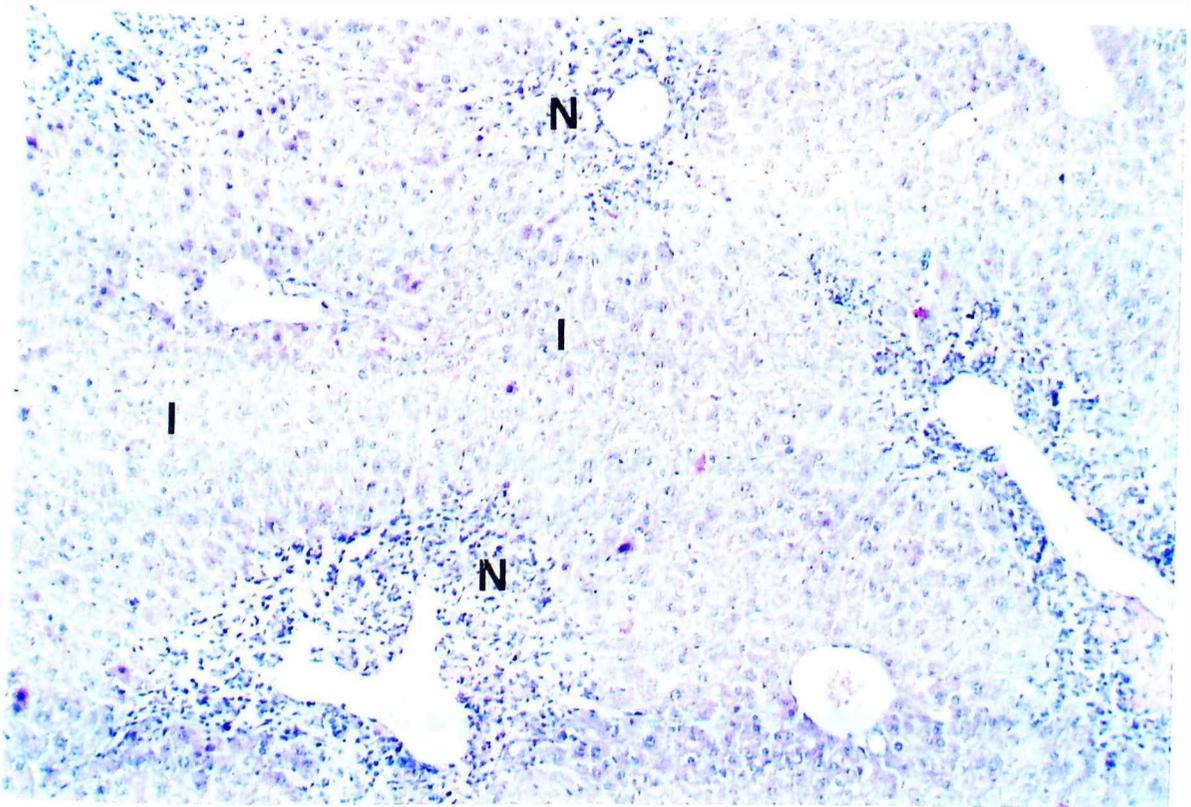


Figura 8- Fotomicrografia do fígado de camundongo 72 horas após intoxicação com CCl_4 e tratamento com Acrosin, onde pode-se observar áreas de necrose (N) e áreas íntegras (I) (Hematoxilina e Eosina - HE), aumento aproximado de 126 x.

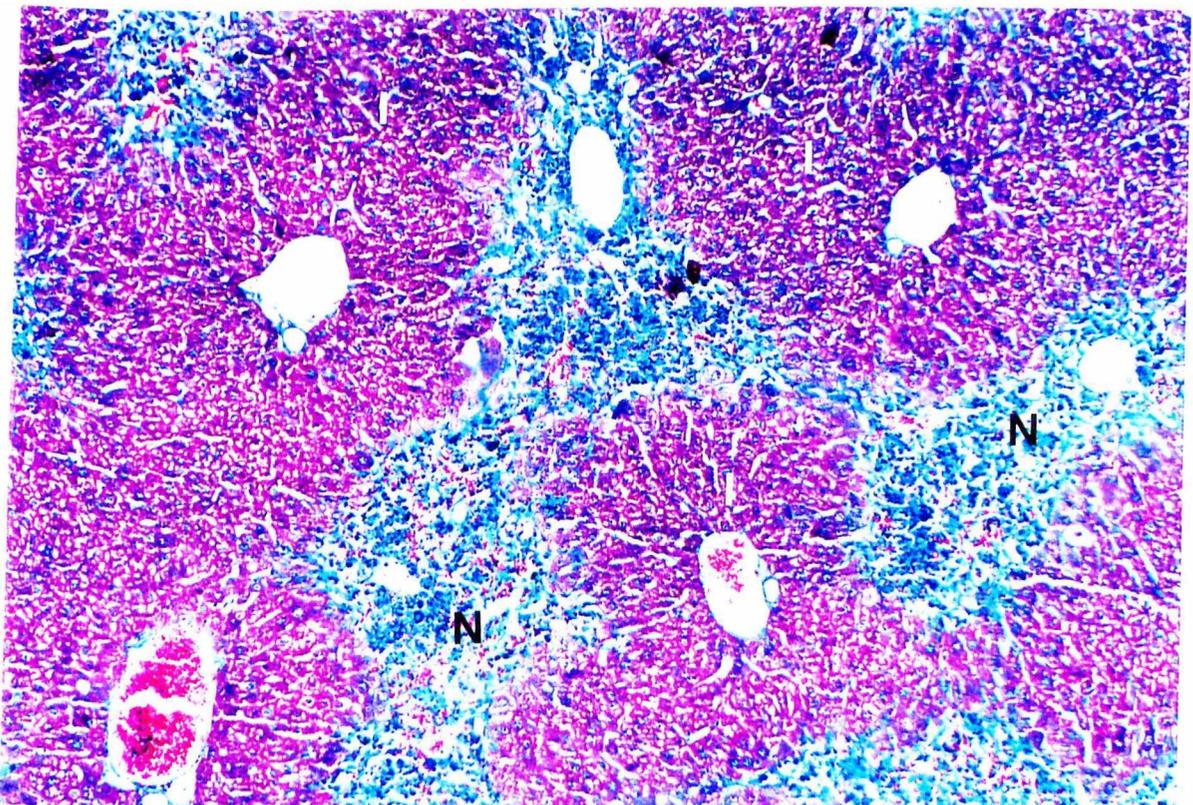


Figura 9- Fotomicrografia do fígado de camundongo 72 horas após intoxicação com CCl_4 e tratamento com Acrosin, onde pode-se observar áreas de necrose (N) e áreas íntegras (I) (Tricômico de Gomori - TG), aumento aproximado de 104 x.

Análise morfométrica:

A análise estatística demonstrou ausência de diferença ($p > 0,05$) entre os grupos quanto à percentagem de área necrosada em cada intervalo de tempo analisado (Tabela 4 e Figuras 10, 11 e 12).

No grupo que recebeu CCl_4 e não foi tratado e nos tratados com Ornitargin, mel e silimarina houve diferença significativa ($p < 0,05$) na percentagem de área necrosada entre cada tempo analisado. Somente os grupos tratados com Acrosin e alcachofra não apresentaram diferença significativa entre 24 e 48 horas. (Tabela 4 e Figuras 10, 11 e 12).

Tabela 4- Percentagem e desvio padrão da área de necrose no fígado de camundongos após administração de CCl_4 . Uberlândia-MG, 2003.

Grupos	Horas após intoxicação		
	24	48	72
CCl_4	48,57293 ^a ± 2,30	35,69349 ^a ± 7,27	19,26072 ^a ± 2,53
Acrosin	51,02425 ^a ± 9,96	42,69959 ^a ± 1,70	14,02473 ^a ± 4,79
Ornitargin	53,42147 ^a ± 2,28	37,56421 ^a ± 4,15	14,51622 ^a ± 8,88
Mel	50,49332 ^a ± 7,18	30,78709 ^a ± 9,15	16,91495 ^a ± 6,38
Silimarina	49,79394 ^a ± 13,27	29,33807 ^a ± 6,61	12,23361 ^a ± 5,89
Alcachofra	46,74242 ^a ± 6,22	36,12530 ^a ± 6,49	9,21375 ^a ± 3,85

Letras iguais em uma mesma coluna representam médias estatisticamente iguais.

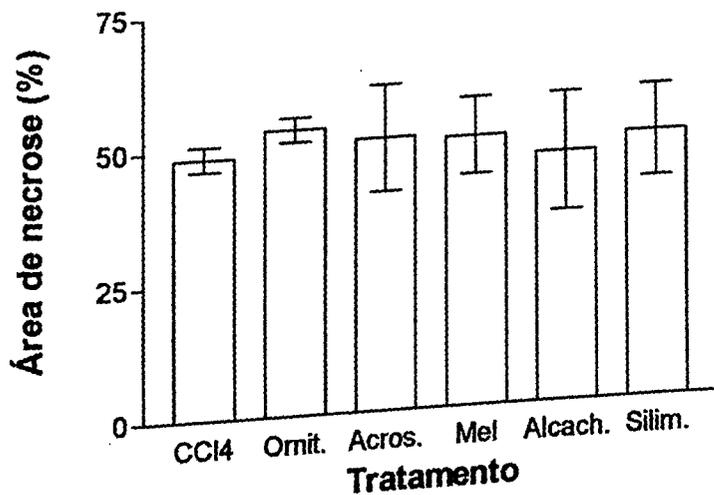


Figura 10- Percentagem de área necrosada no fígado de camundongos, 24 horas após administração de CCl₄. Uberlândia-MG, 2002.

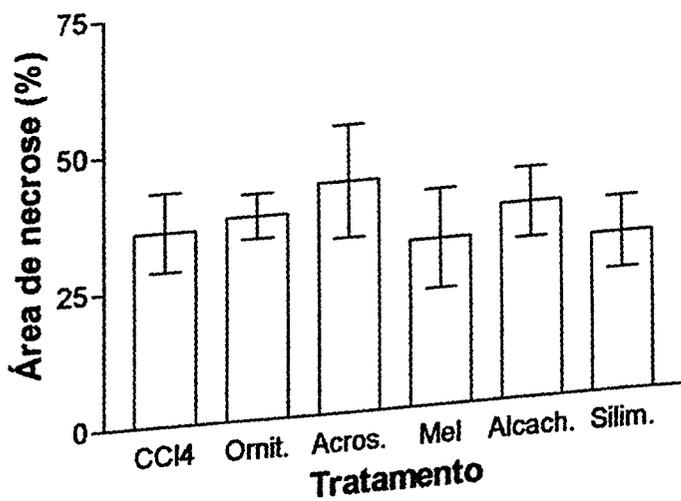


Figura 11- Percentagem de área necrosada no fígado de camundongos, 48 horas após administração de CCl₄. Uberlândia-MG, 2002.

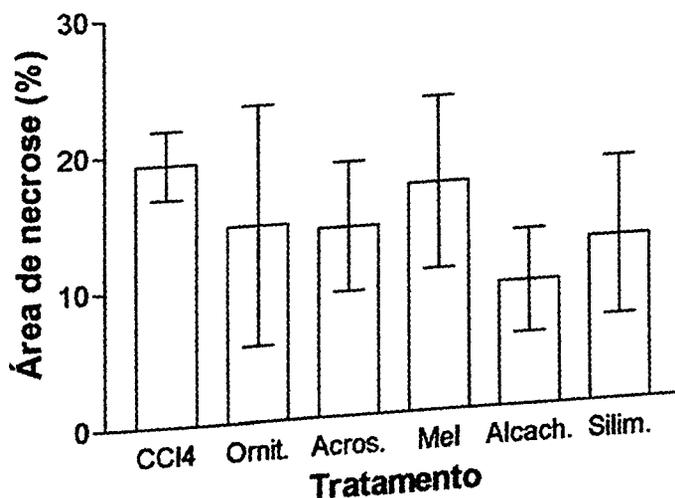


Figura 12- Percentagem de área necrosada no fígado de camundongos, 72 horas após administração de CCL. Uberlândia-MG, 2002.

Confiabilidade dos métodos de análise:

De maneira geral, os métodos utilizados para a avaliação dos efeitos dos tratamentos testados apresentaram alto coeficiente de variação, sendo a avaliação da área de necrose a que apresentou menor variação dos resultados dentro de um mesmo grupo (Tabela 5).

Tabela 5- Valores médios do coeficiente e da porcentagem de variação dos métodos utilizados para avaliar os danos hepáticos.

	ALT	AST	ALP	Área de necrose
Coeficiente de variação	1,45	0,53	0,37	0,25
Porcentagem de variação	145%	53%	37%	25%

DISCUSSÃO

Através das alterações enzimáticas e histológicas, verificou-se que o tetracloreto de carbono foi eficiente na produção de lesões hepatotóxicas (RECKNAGEL & GLENDE JUNIOR, 1973; FARBER & EL-MOFTY, 1975; KAMINSKI et al., 1990; WONG, CHAN, LEE, 1998; AKTAY, et al., 2000; MANSOUR, 2000).

Observando as tabelas das análises enzimáticas (tabelas 1, 2 e 3) e a tabela 5, verifica-se que de maneira geral os coeficientes de variação foram extremos, chegando a 4,60 (460%) para enzima ALT no grupo CCl₄, 72 horas (Tabela 1). Isto levou a resultados em que as médias com valores nominais muito diferentes foram consideradas estatisticamente semelhantes, como por exemplo, para a enzima AST 48 horas, onde a média para o grupo tratado com alcachofra (4564) mesmo sendo 28 vezes maior que o grupo controle (159), foram consideradas semelhantes. Mesmo levando em consideração somente o grupo controle, para a enzima ALT o coeficiente de variação foi de 0,74 (74%) (Tabela 2). Esta alta variabilidade colabora com a teoria que diz que estas enzimas não devem ser utilizadas como indicadores prognósticos, a menos que sejam seqüencialmente monitoradas, ou seja, determinações únicas da concentração enzimática não devem ser utilizadas como fundamento para decisões clínicas importantes. Deve-se efetuar a avaliação histopatológica de biopsia hepática; indicada para confirmar o diagnóstico (SHERLOCK, 1991; CENTER, 1997). Segundo SHERLOCK (1991) e MEYER, COLES, RICH (1995) pode-se desenvolver necrose hepática aguda fatal apesar da queda laboratorial no valor das transaminases. O menor coeficiente de variação obtido com as avaliações da área de necrose demonstra a maior confiabilidade deste método.

Em relação ao uso dos extratos de plantas em casos de hepatopatias, pode-se observar que os grupos que receberam silimarina e alcachofra como tratamento obtiveram diferença significativa no valor da enzima AST. Porém, na análise histológica e morfométrica não houve diferença entre os grupos analisados. O menor valor observado da aspartato aminotransferase, 24 horas após a intoxicação nos referidos grupos, não é suficiente para afirmar que a silimarina e a alcachofra foram eficazes no tratamento da hepatopatia induzida, uma vez que a análise histopatológica é necessária para confirmar esta eficácia (SHERLOCK, 1991; CENTER, 1997). De acordo com MEYER, COLES, RICH (1995) e CENTER (1997) a diminuição da

concentração enzimática da AST observada nos grupos experimentais tratados com silimarina e alcachofra podem significar situações diversas, como melhora e resolução da hepatotoxicidade, alteração da arquitetura intra-hepática, limitada magnitude da resposta à lesão ou a carência de hepatócitos viáveis capazes de liberar enzima. Desta forma, os resultados encontrados no presente experimento sugerem que a silimarina e a alcachofra não diminuíram a quantidade de hepatócitos necrosados, porém atuaram nas demais células melhorando sua atividade metabólica, principalmente naquelas com alterações leves, não avaliadas neste experimento. Diante do exposto, demonstrou-se que o extrato das plantas silimarina e alcachofra não agem em áreas hepáticas altamente lesadas ou necrosadas, podendo agir somente em hepatócitos viáveis, levando a uma menor liberação das enzimas uma vez que, o aumento das transaminases está correlacionado à lesão hepatocelular, alteração da permeabilidade da membrana celular e número de células envolvidas (CENTER, 1997).

Observando-se o que é descrito em alguns trabalhos sobre as diversas ações benéficas a respeito da silimarina (LENG-PESCHLOW & STRENGE-HESSE, 1991; FLORA et al., 1998; LANG et al., 1991; DEHMLow, ERHARD, GROOT, 1996), era esperado que o tratamento experimental com este produto minimizasse as áreas de necrose, ou seja, estabilizasse as lesões e impedisse o avanço das mesmas até necrose. O mesmo fato deveria ter ocorrido com o tratamento utilizando a alcachofra (GEBHARDT, 1997; ADZET, CAMARASA, LAGUNA, 1987).

Tratamentos eficazes utilizando o extrato de silimarina foram obtidos por DESPLACES et al. (1975), HRUBY et al. (1984), VOGEL et al. (1984), SZILARD, SZENTGYORGYI, DEMETER (1988) e MEREISH et al. (1991) em intoxicações experimentais, no entanto, estes autores não realizaram a análise histopatológica, muito mais eficaz para avaliar a ação regeneradora e protetora e, portanto, necessária para confirmar os testes enzimáticos (SHERLOCK, 1991; MEYER, COLES, RICH, 1995; CENTER, 1997).

Já os estudos realizados por LETTÉRON et al. (1990) e AKTAY, et al. (2000), demonstraram ações hepatoprotetoras da silimarina e alcachofra quando utilizadas como tratamento preventivo da intoxicação induzida por CCL₄. Entretanto, quando utilizadas como tratamento, ou seja, em hepatopatias já instaladas, os extratos das plantas demonstraram ineficazes, o que foi confirmado no presente trabalho.

Em relação aos grupos tratados com Ornitargin, Acrosin e mel não foram observadas diferenças em relação ao grupo intoxicado e não tratado (CCL₄). Estes

dados vêm confirmar as citações sobre a inexistência de ação hepatoprotetora destas substâncias (SHERLOCK, 1991; FERREYRA, FENOS, CASTRO, 1983); HEITKAMP & BUSCH-STOCKFISCH, 1986). É importante salientar que o grupo intoxicado e não tratado (CCl₄) demonstrou evolução semelhante ou até mesmo melhor que os grupos tratados com estas substâncias. Isto demonstra o porque muitos clínicos atribuem a estas substâncias ação terapêutica em hepatopatias pré-instaladas, pois mesmo quando não tratada a tendência destas hepatopatias é evoluir rapidamente para cura quando retirada a causa primária (FARBER & EL-MOFTY, 1975; RECKNAGEL & GLENDE JUNIOR, 1973). Portanto, quando utilizados estes tratamentos, provavelmente a evolução da patologia seria a mesma se não fosse tratada.

Também é importante salientar que em todos os grupos, após 72 horas da intoxicação, já existia uma clara tendência à resolução das lesões, mesmo no grupo não tratado (CCl₄), independente do método de análise.

HEMMINGS et al. (2002) avaliaram as implicações do CCl₄ na hepatotoxicidade e verificaram que 24 horas após administração do tóxico, os ratos apresentavam hipoglicemia. Esta, segundo SHERLOCK (1991) é rara hepatite fulminante, mas pode ocorrer e ser persistente ao tratamento podendo causar morte rápida dos pacientes. No entanto, é um aspecto do distúrbio que pode ser tratado satisfatoriamente através de administração endovenosa ou oral de glicose. Constatamos que o mel não possui efeitos protetores significativos no tratamento da hepatotoxicidade aguda, entretanto, seu uso pode ser indicado na prevenção da hipoglicemia como tratamento de suporte nos casos de hepatopatias.

CONCLUSÕES

A silimarina, alcaçofra, mel e aminoácidos com levulose, e com proteólidos de fígado como tratamento da hepatotoxicidade aguda induzida por tetracloreto de carbono em camundongos não foram eficientes para diminuir ou impedir a formação de áreas de necrose hepática.

Não há diferença significativa na evolução da recuperação das áreas lesadas pelo CCl_4 entre os grupos tratados ou não.

A silimarina e a alcaçofra utilizadas no tratamento de hepatopatia aguda induzida por tetracloreto de carbono em camundongos foram eficazes para melhorar os níveis séricos da enzima aspartato aminotransferase (AST) nas primeiras 24 horas após a intoxicação, porém após 48 horas, apresentavam níveis semelhantes aos demais tratamentos e ao grupo intoxicado e não tratado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADZET, T.; CAMARASA, J.; LAGUNA, J.C. Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCL₄ toxicity in isolated rat hepatocytes. **Journal of Natural Products**, Barcelona, v. 50, n. 4, p. 612-617, Jul./Aug. 1987.
- AKTAY, G. et al. Hepatoprotective effects of Turkish folk remedies on experimental liver injury. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 73, p. 121-129, 2000.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. Report of the AVMA panel on euthanasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 218, p. 669, 2001.
- BOARI, C. et al. Silymarin in the protection against exogenous noxae. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, Göteborg, v. 7, p. 115-120, 1981.
- BRINKER, F. Herb contraindications and drug interactions. **Eclectic Medical**, Sandy, v. 190, p. 103-104, 1998.
- CENTER, S.A. Fisiopatologia e diagnóstico laboratorial das afecções hepatobiliares. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: moléstias do cão e do gato**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997. v. 2. cap. 106-A, p.1760-1765.
- DEHMLow, C.; ERHARD, J.; GROOT, de H. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. **Hepatology**, Baltimore, v. 23, n. 4, p. 749-754, 1996.
- DESPLACES, A. et al. The effects of silymarin on Experimental Phalloidine Poisoning. **Arzneim-Forsch (Drug Research)**, Reims, v. 25, n. 1, p. 89-96, 1975.

EDWARDS M. J. et al. The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 119, San Diego, p. 275-279, 1993.

FARBER, J. L.; EL-MOFTY, S. K. The biochemical pathology of liver cell necrosis. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 40, p. 237-250, 1975.

FERREYRA, E. C. de; FENOS, O.M. de; CASTRO, J.A. Tryptophan potentiation of the late cysteine preventive effects in carbon tetrachloride – induced necrosis. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, Westbury, v. 40, p. 515-518, 1983.

FLORA, M.D.K. et al. Milk Thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. **The American Journal of Gastroenterology**, Portland, v. 93, n. 2, p. 139-143, 1998.

GEBHARDT, R. Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus L.*) against hydroperoxide-induced oxidative stress in culture rat hepatocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 144, p. 279-286, 1997.

HEITKAMP, K; BUSCH-STOCKFISCH, M. The pros and cons of honey- are statements about the effects of honey “scientifically verified?” **Zeitschrift fur Lebensmittel – Untersuchung und Forschung**, Berlin, v. 182, p. 279-286, 1986.

HEMMINGS, S. J. et al. Differential inhibitory effects of carbon tetrachloride on the hepatic plasma membrane, mitochondrial and endoplasmic reticular calcium transport systems: implications to hepatotoxicity. **Cell Biochemistry and Function**, Chichester, v. 20, p. 47-59, 2002.

HRUBY, C. Silibinin in the tratment of deathcap fungus poisoning. **Forum**, Washington, v. 6, p. 23-26, 1984.

KAMINSKI, N.E. et al. The role of metabolism in carbon tetrachloride-mediated immunosuppression: *in vivo* studies. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 102, p. 9-20, 1990.

LANG, I. et al. Immunomodulatory and hepatoprotective effects of *in vivo* treatment with free radical scavengers. **Italian Journal of Gastroenterology**, Padova, v. 181, p. 162-174, 1991.

LENG-PESCHLOW, E.; STRENGE-HESSE, A. Die mariendistel (*Silbum marianum*) und silymarin als lebertherapeutikum. **Zeitschrift fur Phytotherapie**, Hanover, v. 12, p. 162-174, 1991.

LETTÉRON, P. et al. Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 39, n. 12, p. 2027-2034, June 1990.

MANSOUR, M. A. Protective effects of thymoquinone and desferrioxamine against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in mice. **Life Sciences**, Elmsford, v. 66, p. 2583-2591, 2000.

MEREISH, K. A. et al. Protection against microcystin-LR-induced hepatotoxicity by Silymarin: biochemistry, histopathology and lethality. **Pharmacological Research**, London, v. 8, n. 2, p. 273-277, Feb. 1991.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. Anormalidades em testes hepáticos. In: _____. **Medicina de Laboratório Veterinária: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995. cap. 5, p. 47-53.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. São Paulo: E.P.U., 1980, 277 p.

PEPPING, J. Milk thistle: *Silybum marianum*. **Alternative Therapies**, Bethesda, v. 56, n. 15, p. 1195-1197, 1999.

RECKNAGEL, R. O.; GLENDE JUNIOR, E. A. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of letal cleavage. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 2, p. 263-297, 1973.

SHERLOCK, S. Avaliação da função hepática. In: _____. **Doenças do fígado e do sistema biliar**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap.2, p. 24-80.

SZILARD, S.; SZENTGYORGYI, D.; DEMETER, I. Protective effect of Legalon in workes exposed to organic solvents. **Acta Medica Academiae Scientiarum Hungaricae**, Budapest, v. 45, p. 249-256, 1988.

VOGEL, G. et al. Protection by silybinin against *Amanita phalloides* intoxication in beagles. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 73, p. 355-362, 1984.

WONG, F. W. Y; CHAN, W. Y.; LEE, S. S. T. Resistance to Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in mice Which Lack CYP2E1 Expression. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 153, p. 109-118, 1998.

XU, Q. et al. Astilbin selectively induces dysfunction of liver-infiltrating cells – novel protection from liver damage. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 377, p. 93-100, 1999.