

**ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO DO USO DO ANTIOXIDANTE  
*Ilex Paraguariensis* NA LESÃO DE ISQUEMIA  
E REPERFUSÃO HEPÁTICA**

ANA LUÍSA MAZORCO\*  
RODRIGO RODRIGUES SILVA\*\*  
WENDEL ESPÍNDOLA\*\*\*  
ANA LUIZA MUCILLO-BAISCH\*\*\*\*  
SUSI HELIENE LAUZ MEDEIROS\*\*\*\*\*

**RESUMO**

A isquemia hepática, devido à interrupção do fluxo sanguíneo, é utilizada na ressecção hepática, transplante e em sangramentos decorrentes de traumas. O objetivo deste trabalho foi estudar a proteção do parênquima hepático durante período de isquemia e reperfusão sob efeito de *Ilex paraguariensis*. Dezoito ratos Wistar com três meses foram distribuídos em três grupos: grupo controle com administração de soro glicosado 5%, grupo N-acetilcisteína 10%, grupo *Ilex paraguariensis* (900 µg/mL), todos com clampeamento da tríade hepática e 30 minutos de isquemia seguidos por 15 minutos de reperfusão. Os animais foram levados à eutanásia, sob anestesia por exosanguinação. O fígado foi analisado por microscopia óptica, observando-se dilatação, congestão da veia centrolobular e dos sinusóides. Concluiu-se que *Ilex paraguariensis* é capaz de manter a estrutura morfológica do parênquima hepático quando comparada à ação da N-acetilcisteína na lesão de isquemia e reperfusão hepática em ratos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fígado, Isquemia, Reperfusão.

**ABSTRACT**

**USE OF THE ANTIOXIDANT *Ilex Paraguariensis* IN THE INJURY OF  
LIVER ISCHEMIA AND REPERFUSION: A HISTOMORPHOLOGIC  
STUDY**

Due to the blood flow interruption, liver ischemia is used in surgical procedures of hepatic resection, transplantation, and secondary hemorrhage from trauma. The objective of this study was to protect the liver parenchyma during ischemia and reperfusion under the effect of *Ilex paragiariensis*. Eighteen three-month-old Wistar mice were divided into three groups: control group with administration of serum glucose 5%, group N-acetylcysteine 10%, and group *Ilex paraguariensis* 900 mg/mL. Every group had the liver triad clamped and thirty minutes of ischemia followed by 15 minutes of reperfusion. The animals were taken to euthanasia under anesthesia by blood removal. Their livers were examined by optical microscopy, and they were found as expanded and with the

---

\* Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – FURG. E-mail: almazorco@gmail.com

\*\* Acadêmico do Curso de Medicina – FURG. E-mail: 33641rodrigo@gmail.com

\*\*\* Acadêmico do Curso de Medicina – FURG. E-mail: wendelespindola@hotmail.com

\*\*\*\* Professora do Instituto de Ciências Biológicas – FURG; Doutora em Biologia da Saúde. E-mail: anabaisch@gmail.com

\*\*\*\*\* Professora da Faculdade de Medicina – FURG; Doutora em Cirurgia. E-mail: susilauz@gmail.com

center-lobular vein and sinusoids congested. In conclusion, *Ilex paraguariensis* was verified as capable of maintaining the morphological structure of the liver parenchyma compared to the effect of N-acetylcysteine in the injury of liver ischemia and reperfusion in mice.

**KEYWORDS:** Liver, Ischemia, Reperfusion.

## INTRODUÇÃO

A lesão de isquemia e reperfusão tem sido objeto de estudo graças ao avanço nas cirurgias de transplantes de fígado e hepatectomias, seja por afecções tumorais ou no trauma<sup>1</sup>. Nesses estudos, modelos experimentais têm sido utilizados e a descompressão do território venoso esplâncnico torna-se procedimento necessário para garantir a estabilidade das condições circulatórias e metabólicas durante o período de isquemia hepática<sup>2,3</sup>. Entretanto, com um tempo padronizado de no máximo 30 minutos é possível realizar uma isquemia (manobra de Pringle) como modelo para estudo da lesão de isquemia<sup>4</sup>.

Sabe-se que o processo isquêmico gera lesões que envolvem mecanismos e vias metabólicas celulares complexas. Entretanto, na reposição do fluxo sanguíneo, no período de reperfusão, verifica-se um agravamento na lesão do parênquima<sup>5,6</sup>.

Nos organismos submetidos a isquemia hepática seguida de reperfusão, ocorre interação complexa entre alterações microvasculares, liberação de mediadores inflamatórios, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), ativação de neutrófilos, plaquetas,

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dezoito ratos Wistar, machos, com idade de três

células de Kupffer e células endoteliais sinusoidais. A ativação dessas células pode levar à liberação de fator de necrose tumoral e fator de ativação plaquetária, que causam danos à membrana celular, membrana mitocondrial interna e endotélio, levando aos distúrbios na microcirculação hepática<sup>6</sup>.

Esclarecendo os mecanismos de ocorrência da lesão, pode-se alterar sua evolução empregando estratégias de proteção ao órgão. Dentre estas, destaca-se o emprego de substâncias que, por diferentes mecanismos de ação, promovem redução do dano celular, seja atuando como antioxidantes ou minimizando a ação dos produtos decorrentes da fase isquêmica ou na vigência de uma doença crônica, reduzindo o dano hepático e contribuindo para melhorar a função hepática<sup>7</sup>.

Dessa forma, visando à preservação do parênquima hepático, o objetivo foi estudar substâncias com capacidade já conhecida como antioxidante, um tiol de baixo peso molecular, a N-Acetilcisteína, e comparar com o componente fenólico presente na *Ilex paraguariensis*, nas fases de isquemia e reperfusão.

meses, oriundos do Biotério Central da FURG. Foram alimentados com ração

apropriada para a espécie e oferta livre de água potável, e distribuídos em três grupos de seis animais: grupo controle, grupo N-acetilcisteína (NAC) e grupo *Ilex paraguariensis*. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética CEPAS/FURG nº 44/2007.

No grupo controle foram realizados os seguintes procedimentos: os animais foram anestesiados com Tiopental 200mg.Kg<sup>-1</sup> de peso, tendo via de acesso intraperitoneal na região lateral da pata traseira direita, sendo considerado anestesiado o animal que perdeu o reflexo córneo-palpebral e o reflexo de retirada ao estímulo doloroso por preensão da pata traseira. A antisepsia foi feita com solução de clorexidina 4% na área operatória, sendo utilizado um campo fenestrado esterilizado. Após, foi realizada laparotomia mediana, inspeção da cavidade abdominal e identificação do pedículo hepático. A seguir, a artéria hepática, a veia porta e o ducto hepático comum foram clampeados, utilizando-se pinça vascular para cirurgia microscópica.

Após os 30 minutos de isquemia, o clampeamento foi removido e foi realizada a reperfusão por 15 minutos. A seguir, o animal foi levado à eutanásia ainda sob efeito da anestesia e foi feita a ressecção do fígado para posterior análise histológica. O soro glicosado 5%

foi administrado 15 minutos antes do clampeamento da tríade hepática (0,2 mL).

No grupo NAC, o procedimento anestésico, bem como o operatório, seguiu conforme o protocolo cirúrgico do grupo controle, sendo a NAC administrada 15 minutos antes do clampeamento da tríade hepática, numa solução a 10% (0,2 mL). Isso também foi válido para o grupo *Ilex paraguariensis*, no qual a substância foi ministrada 15 minutos antes do clampeamento da tríade hepática, na concentração de 900µg de solução (0,2 mL).

A eutanásia foi realizada por exsangüinação, com o animal sob anestesia, em seguida do período de reperfusão. Logo, o fígado removido foi submetido a cortes de aproximadamente 1cm x 1cm que foram conservados em solução de formaldeído 10%, para exame histológico pela coloração de hematoxilina-eosina, sendo observada a presença ou ausência de congestão da veia centrolobular, espaço porta e sinusóides hepáticos, bem como a presença de vasodilatação.

Os achados foram graduados em cruzes, de acordo com a sua intensidade, em discreta (+), moderada (++) e acentuada (+++); quando ausentes foi utilizado o sinal (-).

## RESULTADOS

A intensidade da congestão vascular dos sinusóides hepáticos e da dilatação da veia centrolobular em ratos submetidos a 30 minutos de isquemia e

15 minutos de reperfusão do parênquima hepático de animais dos grupos controle, N-acetilcisteína e *Ilex paraguariensis*, foi observada à microscopia óptica pela

coloração hematoxilina-eosina e (Tabelas 1 e 2, Figuras 1, 2 e 3).  
 quantificada pelo método de cruzes

TABELA 1 – Intensidade da congestão vascular dos sinusóides hepáticos

	Controle I/R	NAC	<i>Ilex paraguariensis</i>
Congestão vascular dos sinusóides hepáticos	+++	+	+

+ = discreta; ++ = moderada; +++ = acentuada; - = ausente

I/R= isquemia e reperfusão NAC= N-Acetilcisteína

TABELA 2 – Intensidade da dilatação da veia centrolobular

	Controle I/R	NAC	<i>Ilex paraguariensis</i>
Dilatação da veia centrolobular	+++	+	+

+ = discreta; ++ = moderada; +++ = acentuada; - = ausente

I/R= isquemia e reperfusão NAC= N-Acetilcisteína

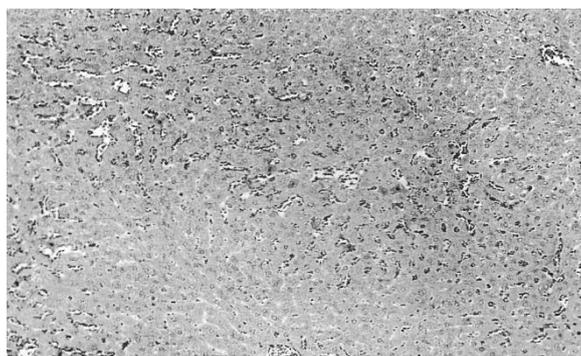


FIGURA 1 – Fotomicrografia mostrando parênquima hepático de rato pertencente ao grupo Controle. Observa-se parênquima hepático congestionado e com vasodilatação. H.E.100X.

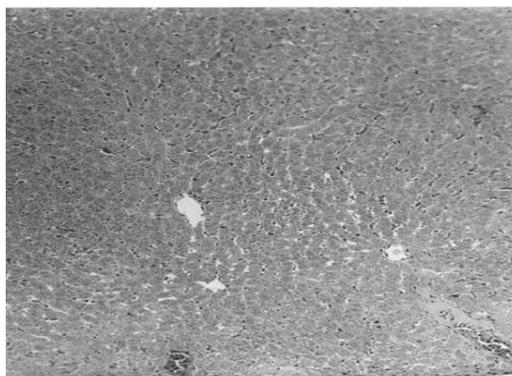


FIGURA 2 – Fotomicrografia mostrando parênquima hepático de rato pertencente ao grupo NAC. Observa-se presença discreta de congestão vascular. H.E. 100X.

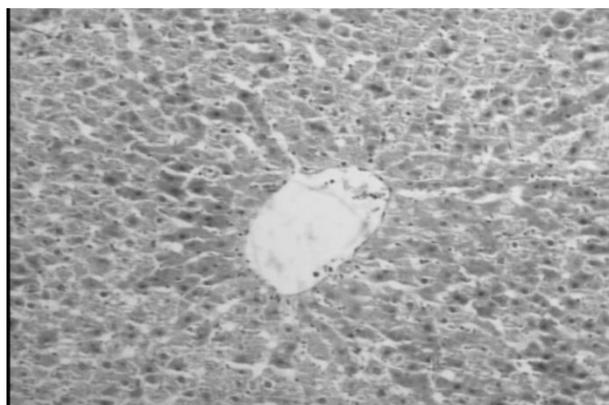


FIGURA 3 – Fotomicrografia mostrando parênquima hepático de rato pertencente ao grupo *Ilex paraguariensis*, presença de congestão vascular dos sinusóides hepáticos e dilatação da veia centrolobular. H.E. 10 X100X.

## DISCUSSÃO

Estudos têm sido realizados sobre a lesão de isquemia e reperfusão hepática, visando a minimizar as injúrias ao parênquima que podem ser causadas por choque hemorrágico, sepse tardia, cirurgia por grandes traumas, ressecção de tumores e o próprio transplante hepático<sup>8</sup>.

O modelo de isquemia hepática total sem derivação porto-sistêmica, durante 30 minutos (manobra de Pringle) possibilita um estudo da lesão de isquemia e reperfusão hepática<sup>4</sup>. Assim, este modelo de isquemia e reperfusão permite estudar as lesões do parênquima hepático e o uso de substâncias capazes de atuar como antioxidantes com comprovação *in vitro* ou *in vivo*.

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição ou redução das lesões causadas pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células durante a isquemia. Na fase de reperfusão há um aumento da produção dessas EROs. Esse aumento é provocado pela ativação de células de Kupffer e de neutrófilos, ação da

xantina oxidase, pela conversão da adenosina a xantina e hipoxantina e pela conversão de óxido nítrico a peroxinitrito. Estudos têm evidenciado que os antioxidantes endógenos como, por exemplo, a glutathione permitem às células uma proteção aos danos provocados pelas EROs<sup>7</sup>.

No período de 30 minutos de isquemia, autores observaram congestão vascular e aumento no número de lisossomas à microscopia óptica. Lauz et al. constataram vasodilatação com congestão vascular progressiva, diretamente proporcional ao tempo de isquemia<sup>6</sup>, e que, ao utilizar um tiol de baixo peso molecular, a estrutura do parênquima hepático ficava preservada no período de isquemia. Houve manutenção da arquitetura tecidual do fígado, com a veia centrolobular sem dilatação ou discreta congestão vascular, capilares sinusóides sem alterações, mostrando ação protetora ao tecido na fase isquêmica<sup>6</sup>.

Na busca de outras substâncias capazes de minimizar a injúria causada no período de isquemia e reperfusão,

optou-se neste estudo pela *Ilex paraguariensis*, substância que apresenta na sua constituição um componente fenólico com propriedades antioxidantes, já estudado no grupo de Baisch et al<sup>9</sup>. Essa substância demonstrou propriedades relaxantes sobre o músculo liso vascular em um estudo *in vitro* em mesentério de ratos. Em outro estudo *in vivo*, foi observado que, após o uso via oral da *Ilex*, esta mostrou menor produção de EROs quando foi avaliada a quantidade de peróxido de hidrogênio<sup>9</sup>.

Neste estudo foi realizada uma análise histomorfológica, a fim de observar a estrutura do parênquima hepático, bem como a microcirculação. Foi observada a manutenção da arquitetura das colunas de hepatócitos que se estendem entre o espaço porta e a veia centrolobular, bem como os sinusóides (foto 1, foto 2, foto 3).

## AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi realizado graças à participação dos professores MSc. Obirajara Rodrigues e MSc. Alexandra

Desta feita, observou-se a presença de dilatação discreta ou quase ausente dos sinusóides com o uso da NAC e da *Ilex paraguariensis*. O emprego dessas substâncias, apesar das diferenças bioquímicas, obteve resultados morfológicamente semelhantes, quando comparado em um método quantitativo, que dispensou a análise estatística.

A *Ilex paraguariensis* apresenta um componente fenólico cuja ação antioxidante já é conhecida, e seu uso neste estudo mostra que, após sua utilização, não há perda da estrutura histomorfológica do parênquima hepático, após isquemia e reperfusão hepática, quando comparada à ação da NAC na lesão de isquemia e reperfusão no fígado de ratos. Cabe ressaltar que o mecanismo pelo qual se faz tal proteção é um dos motivos para dar continuidade a este estudo.

Medeiros de Freitas, que realizaram a análise histomorfométrica.

## REFERÊNCIAS

1. Câmara Neto RD, et al. Um novo modelo para estudos sobre lesão de isquemia e reperfusão hepática em cães. *Acta Cir Bras.* 2000; 15(2).
2. Hall RJ et al. Biliary atresia: perspective on transplantation. *Pediatr Surg Int.* 1990;(5).
3. Sébe AA. Estudo do efeito da isquemia no fígado de ratos em diferentes tempos. São Paulo, 1999. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo – EPM.
4. Pringle JH. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. *Ann Surg.* 1908.
5. Peralta C., et al. Hepatic microcirculatory failure. *Acta Cir. Bras.* 2006; 21(1).
6. Lauz S, et al. O papel de um flavonóide – *Ilex paraguariensis* – comparado com a N-acetilsisteína na isquemia normotérmica do fígado. *Rev Col Bras Cirurgiões*, Rio de Janeiro: CBC, 2004.

7. Evora PR, et al. As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado. Revisão. Acta Cir Bras 2004; 19(1).
8. Hannoun L., et al. Liver resection with normothermic ischaemia exceeding 1 h. Br. J. Surg, 1993; (80).
9. Baisch ALM, et al. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* on mesenteric arterial bed of rats. J Ethnopharmacol 1998;(60).

