



# Avaliação da atividade hepatoprotetora do asiaticosídeo em modelo experimental de lesão hepática por paracetamol em ratos

Gustavo Henrique da Silva<sup>1\*</sup>; Pedro Paulo Barros<sup>2</sup>; Gisele Mara Silva Gonçalves<sup>2</sup>; Eder Adnan de Jesus<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas – PUC, Campinas-SP

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Biológicas – PUC, Campinas-SP

## RESUMO

O asiaticosídeo é um triterpenóide presente no extrato da *Centella asiatica*, sendo responsável pela atividade terapêutica desta planta em doenças hepáticas crônicas. O hepatócito é a célula responsável pelas funções endócrinas e exócrinas do fígado, além de converter substâncias nocivas em materiais não tóxicos excretados pela bile. Por esse motivo, o fígado é sensível à ação de alguns fármacos, como, por exemplo, o paracetamol. Assim, utilizando o paracetamol como modelo experimental de lesão hepática, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação hepatoprotetora do asiaticosídeo, na dose estabelecida como terapêutica, em ratos Wistar. Dois grupos compostos por vinte animais cada, tratados com asiaticosídeo (1mg/kg/dia v.o.) por oito dias e não tratados foram submetidos à intoxicação com elevada dose de paracetamol (3 g/kg v.o) no oitavo dia. Em seguida, os animais foram eutanasiados após 24 h ou 72 h para coleta de amostras de sangue e fragmentos de fígado. Para avaliação da atividade hepatoprotetora, foi realizada a dosagem sérica de enzimas indicativas de lesão hepática (AST, ALT e Fosfatase Alcalina) e a análise histológica e morfométrica do tecido hepático. Os resultados obtidos permitiram evidenciar que na dose utilizada, o asiaticosídeo apresenta atividade hepatoprotetora, uma vez que o grupo submetido ao tratamento prévio apresentou menos lesões histológicas e menores níveis séricos de AST e ALT quando comparado ao grupo controle. Estes resultados permitem concluir que o asiaticosídeo, na dose mais usualmente empregada na fitoterapia, apresentou atividade hepatoprotetora na hepatite aguda causada por elevada dose de paracetamol.

Palavras-chave: *Centella asiática*. Paracetamol. Morfologia. Fígado. Transaminases hepáticas.

## INTRODUÇÃO

*Centella asiatica* (Linn) Urban, pertence à família das umbelíferas e é uma erva daninha encontrada em toda a Índia, Sri Lanka e Madagascar. Na medicina ayurvédica tem sido utilizada no tratamento de doenças de pele, feridas locais, para melhorar a capacidade mental geral, icterícia e hepatite, no tratamento de dermatite, purificação do sangue, melhora da hipertensão e melhoria da memória (Kasahara & Henmi, 1986; Hashimoto, 1996). A atividade terapêutica do extrato de *Centella asiatica* em doenças hepáticas crônicas está relacionada a um triterpenóide, o asiaticosídeo, que experimentalmente impediu a ocorrência de esteatose hepática, degeneração hidrópica e necrose em ratos expostos cronicamente ao tetracloreto de carbono (Antony et al., 2006).

No Brasil, o asiaticosídeo é amplamente comercializado em farmácias magistrais. É utilizado para diversas finalidades, tais como o tratamento de celulite, melhoria da circulação periférica, eliminação de edemas e hematomas e combate a processos degenerativos do tecido conjuntivo, dentre outras (Barnes et al., 2012).

Assim, o asiaticosídeo parece ter valor na prevenção e tratamento de lesões hepáticas, incluindo lesões provocadas por drogas. A hepatite tóxica é uma lesão hepática causada por inalação, ingestão ou administração parentérica de agentes farmacológicos ou químicos (Matos & Martins, 2005). Para que ocorra a lesão celular metabólica dos hepatócitos há vários mecanismos de agressão: ligação covalente a estruturas celulares, peroxidação lipídica, reações de oxidação e depleção de glutatona, sendo que estas agressões celulares podem resultar em alterações mitocondriais, alterações no citoesqueleto celular ou alterações da homeostase iônica. Dependendo da extensão do envolvimento mitocondrial e do balanço de fatores ativadores/inibidores de vias intracelulares de sinalização, o destino da célula poderá ser a necrose ou a apoptose, sendo a primeira situação geradora de mecanismos inflamatórios (Neil, 2002).

O paracetamol é um analgésico, metabólito ativo da fenacetina e um dos fármacos mais utilizados como

*Autor correspondente:* Gustavo Henrique da Silva, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, SP.  
E-mail: gustavohs@puc-campinas.edu.br

analgésico e antipirético. Nos EUA e Reino Unido, o paracetamol é a principal causa de falência hepática fulminante, principalmente na superdosagem acidental ou intencional, sendo também o principal medicamento implicado em óbitos relatados nos centros de intoxicação nos EUA na década de 90 (Litovitz et al., 2000). É facilmente destoxificado pela fase II do sistema de metabolização hepática de drogas, mediado por glicuronidação e sulfatação (Henderson et al., 2000), com uma pequena porção passando pelo Citocromo P-450, e sofrendo N-hidroxilação com formação do intermediário tóxico, a N-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI), que inicialmente é conjugado à glutatona e é excretado (Dahlin et al., 1984). Na administração de doses tóxicas de paracetamol, as vias de glicuronidação e sulfatação se saturam e a via do citocromo P-450 adquire importância para a biotransformação da droga, ocasionando, com isso, uma maior formação da NAPQI. Assim, as reservas de glutatona hepática se esgotam e a reação com os grupos sulfídricos das proteínas hepáticas é aumentada, interrompendo o fluxo do cálcio mitocondrial e conduzindo à necrose dos hepatócitos (Heubi et al., 1998). Como há alteração do metabolismo mitocondrial, a hepatotoxicidade também ocorre pela formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radical hidroxila (HO•), espécies reativas de nitrogênio como o óxido nítrico e peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), e produtos da reação de peroxidação (James et al., 2003; Reid et al., 2005). A reação é ampliada pela ativação das células de Kupffer e pela produção de citocinas e radicais livres que conduzem à apoptose e necrose centrolobular na zona 3 (Heubi et al., 1998). A necrose ocorre nesta zona porque é o local onde se encontram os hepatócitos que apresentam maior quantidade de citocromo P-450 convertendo a droga em metabólito ativo (Zimmerman, 1999).

O modelo experimental com hepatite tóxica provocada pelo paracetamol tem sido amplamente utilizado para avaliar a atividade hepatoprotetora de fármacos e compostos vegetais. Utilizando este modelo, Oyagbemi & Odetola (2010) verificaram a atividade hepatoprotetora do extrato de *Cnidioscolus aconifolius*, Acharya & Lau-Cam (2010) avaliaram a capacidade da n-acetilcisteína, hipotaurina e taurina em atenuar as alterações bioquímicas plasmáticas e hepáticas na overdose de paracetamol, Wu et al. (2008) investigaram a atividade protetora do salidroside na hepatite tóxica por paracetamol, comparando este a n-acetilcisteína; Jambaz et al. (2002) investigaram ação da rutina na hepatite tóxica provocada por paracetamol e por CCl<sub>4</sub>; Echard et al. (2001) avaliaram a atividade hepatoprotetora de combinações de ervas medicinais (complexos fitoterápicos) na hepatite provocada pelo etanol e pelo paracetamol; Thabrew et al. (1995) analisaram a atividade hepatoprotetora de *Osbeckia octandra* na hepatite tóxica por paracetamol, entre outros.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade hepatoprotetora do asiaticosídeo, na dose estabelecida como terapêutica (Barnes et al., 2012), em lesão hepática

produzida experimentalmente pelo paracetamol em ratos Wistar.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 40 ratos albinos (*Rattus norvegicus*), machos, da linhagem Wistar, não isogênicos, fornecidos com 50 dias de idade pelo Biotério do Campus II da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC-Campinas).

Os animais foram alojados no Biotério do Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental do Centro de Ciências da Vida, PUC-Campinas, com luz e ventilação controladas, fornecimento de ração sólida Nuvilab® e água filtrada sem restrição até atingirem a idade de 60 dias. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da PUC-Campinas conforme CI CEUA N° 002/2012 protocolado sob n° 2012070332.

Os animais foram divididos em dois grupos (20 animais em cada) sendo um denominado “tratado” e outro denominado “controle”. Cada grupo foi subdividido de acordo com tipo de pré-tratamento e com o período pós-administração de paracetamol (24 ou 72 horas). O grupo tratado originou quatro subgrupos, sendo Asiaticosídeo 24 h (CA24) e Asiaticosídeo 72 h (CA72), composto por 05 animais cada, que receberam somente suspensão de Asiaticosídeo por 8 dias na dose 1mg/kg/dia por via oral (v.o.), sendo eutanasiados respectivamente 24 h e 72 h após a última administração; os outros dois subgrupos foram Asiaticosídeo+Paracetamol 24 h (AP24) e Asiaticosídeo+Paracetamol 72 h (AP72), compostos por 5 animais cada, que receberam suspensão de asiaticosídeo por 8 dias na dose 1 mg/kg/dia v.o. e junto a última administração dessa receberam solução de paracetamol (Pharma Nostra®, lote 09124425G) na dose 3 g/kg v.o., sendo eutanasiados após 24 h e 72 h respectivamente. O asiaticosídeo utilizado no experimento foi adquirido comercialmente (Pharma Nostra®, lote 09072392A), apresentando 40% de pureza o que equivale a 100% da matéria ativa encontrada na planta.

O grupo denominado “controle” também foi subdividido em outros quatro subgrupos: Controle Negativo 24 h (CN24) e Controle Negativo 72 h (CN72), compostos por 05 animais cada, que receberam somente água v.o. durante 8 dias, sendo eutanasiados respectivamente 24 h e 72 h após o término da administração desta; Controle Positivo 24 h (CP24) e Controle Positivo 72 h (CP72): composto por 05 animais cada, que receberam água v.o. por 8 dias e solução de paracetamol na dose 3g/kg v.o. no último dia, sendo eutanasiados respectivamente após 24 h e 72 h. A dose de paracetamol foi estabelecida conforme protocolo de Oyagbemi & Odetola (2010) e a de asiaticosídeo conforme descrito por Shukla e colaboradores (1999) em cobaias, no entanto, outros fatores foram considerados para definição desta e serão discutidos adiante. Todo o tratamento foi realizado por gavagem intragástrica, ou seja, pela via oral.

Concluídos os períodos de 24 h ou 72 h pós-administração de paracetamol conforme descrito acima, os animais foram anestesiados utilizando solução de Ketamina (100 mg/kg i.p.), sendo realizada incisão na região torácica para acesso ao ventrículo cardíaco esquerdo. Foi realizada punção no ventrículo para coleta de sangue visando dosagem das transaminases hepáticas e fosfatase alcalina. Houve aprofundamento da anestesia até eutanásia do animal e remoção do tecido hepático. O fígado foi fragmentado e fixado em solução de formalina 10% tamponada (visando análise histológica). A Ketamina foi escolhida como agente anestésico, pois não apresenta hepatotoxicidade, não causando assim interferência nos resultados do experimento.

### **Processamento histológico**

Os espécimes de tecido hepático foram submetidos ao processamento padrão para inclusão em parafina histológica (Synth®), obtendo-se cortes de 05 micrômetros de espessura em Micrótomo Rotativo Leica® RM2245. As lâminas foram coradas com Hematoxilina – Eosina (HE), Picrosirius Red e Ácido Periódico de Schiff (PAS) e as imagens capturadas digitalmente para obtenção dos resultados utilizando fotomicroscópio (Nikon Eclipse E200®) com câmera acoplada (Nikon Colpix 4500®). Para cada um dos grupos foi avaliado o tipo e a intensidade das lesões hepáticas, observando-se a presença de infiltrado inflamatório, fibrose e necrose.

### **Dosagem das Transaminases Hepáticas e Fosfatase Alcalina**

Após coleta de sangue, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, separando-se então o soro dos demais componentes. No soro foram quantificadas as enzimas Alanina-aminotransferase (ALT), Aspartato-Aminotransferase (AST) e Fosfatase Alcalina (FAIc) pois estas são indicadoras de dano hepatocelular. A análise foi realizada por meio de kits enzimáticos LaborLab® (método cinético-colorimétrico) com leitura em espectrofotômetro UV Varian®, conforme as especificações destes kits. Para análise dos parâmetros bioquímicos foi utilizado um n igual a quatro.

### **Análise dos resultados**

A análise histológica do fígado foi realizada com uma metodologia específica para cada parâmetro. Para a avaliação da necrose foi determinado o número de veias centrolobulares (vcl) afetadas pela lesão nas lâminas coradas em HE (uma secção de 02 fragmentos hepáticos de lóbulos diferentes) e os resultados expressos em vcl/cm<sup>2</sup>. Para a quantificação, foi utilizado o software TPS Dig® 1.30; para avaliação de fibrose, 05 micrografias da região centrolobular e 05 micrografias da região portal das lâminas coradas em Picrosirius Red (total de 50 micrografias por grupo) obtidas aleatoriamente na ampliação de (480x) foram analisadas utilizando-se o software AreaMed®, mensurando-se a área comprometida por fibrose (fibras

colágenas); para a avaliação da distribuição do glicogênio e outros 1,2-glicóis, foram feitas análises qualitativas das lâminas coradas em PAS, comparando-se os animais tratados com os grupos controles negativo e positivo, e os resultados foram expressos por meio de micrografias.

A análise estatística dos resultados morfométricos e das dosagens de transaminases e fosfatase alcalina foi realizada com auxílio do programa Graph Pad Prism® 3.0. A diferença entre os grupos foi determinada por Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni, sendo considerados significativos os valores de  $p < 0.05$ .

## **RESULTADOS**

### **Análise histológica e morfométrica**

A coloração dos cortes do tecido hepático com Hematoxilina-Eosina possibilitou a realização de uma análise histológica geral, permitindo a identificação de estruturas tissulares, células, inclusões e alterações histopatológicas. Após a observação das amostras do Grupo Controle Positivo foi verificado que não havia incidência de esteatose, mas fibrose e necrose com infiltração de polimorfonucleados. A necrose foi observada predominantemente na região centro-lobular, sobretudo, nos animais de 72 h. Esta constatação direcionou para a quantificação dos focos inflamatórios/necróticos nesta região, enquanto que a fibrose foi quantificada em zona 1 e 3 acinar nas lâminas coradas em Picrosirius Red.

Observando as micrografias da figura 01, é possível verificar que nos animais dos grupos Controle Negativo e Asiaticosídeo o tecido hepático permaneceu preservado, porém nos grupos Controle Positivo (CP) e Asiaticosídeo+Paracetamol houve inúmeros focos de infiltrado inflamatório, acompanhados ou não de necrose. Nos grupos CP24 e CP72 houve maior predominância deste tipo de lesão, principalmente neste último, seja em número de regiões centro-lobulares acometidas quanto no número de animais que foram comprometidos. Neste sentido verificou-se que em todos os animais do grupo Controle Positivo, seja em 24 ou 72 horas, houve presença de necrose e infiltração inflamatória na zona 01, entretanto, no grupo em que houve o pré-tratamento com asiaticosídeo, apenas três animais no grupo com 24 horas e dois animais no grupo com 72 horas apresentaram estas alterações histopatológicas, o que representa uma redução de incidência de, respectivamente, 40% e 60%.

Nas lâminas coradas em Picrosirius Red foi verificado que as fibras colágenas estavam presentes nas zonas acinares 1 e 3, desta forma, a quantificação destas foi realizada nestas regiões. Em todos os grupos a deposição de colágeno foi bastante discreta, próxima aos animais do grupo Controle Negativo. A Figura 02 mostra micrografias das zona 1 e 3 acinares. Não foi evidenciada alteração significativa relacionada à fibrose, apesar de ser possível observar uma redução na deposição de colágeno na região portal quando se compara AP24h com CP24h (figura 03).

Realizando-se a observação das secções coradas em

PAS (figura 04), foi verificado que os animais tratados com elevada dose de paracetamol (3 g/kg, v.o.) apresentaram uma grande diminuição das inclusões PAS positivas na região centro-lobular evidenciada pela diminuição da coloração rósea das células. Esta observação fica bastante clara quando comparamos as micrografias do grupo Controle Positivo (CP 24 e CP 72) com as micrografias do grupo Controle Negativo (CN24 e CN72). Observando as figuras do grupo Asiaticosídeo+Paracetamol (AP24 e AP72), verifica-se que o asiaticosídeo interferiu pouco neste processo em 24 horas, entretanto foi mais efetivo em 72 horas, reduzindo parcialmente as inclusões PAS positivas na zona 3.

### Dosagem das Transaminases Hepáticas e Fosfatase Alcalina

As dosagens das transaminases hepáticas AST (Aspartato-amino Transferase) e ALT (Alanino-amino Transferase) mostraram que a dose de paracetamol administrada (3 g/kg, v.o.) no grupo CP, como esperado, causa elevação das duas transaminases. O pré-tratamento com asiaticosídeo (1 mg/kg, v.o., 8 dias) provocou uma diminuição significativa de AST e de ALT (figura 05) após a administração do paracetamol (grupo AP), protegendo o fígado destes animais. Como pode ser observado na mesma figura, não houve alterações significativas na fosfatase alcalina entre os grupos, principalmente tendo-se em vista que o grupo CP não sofreu grande elevação em relação ao valor normal desta enzima.

### DISCUSSÃO

Os espécimes reativos de oxigênio (ERO), conhecidos como radicais livres, são formados continuamente nos organismos vivos durante o processo de produção de energia. A maioria dos organismos apresenta mecanismos de proteção dos seus constituintes celulares contra estes oxidantes reativos (Gasparri, 2005). No entanto, existem condições nas quais ocorre aumento da produção e intensificação da atividade das ERO, nas quais os mecanismos de proteção celular se tornam ineficazes, possibilitando a ocorrência de danos teciduais. A busca de novas moléculas ou substâncias com capacidade antioxidante, como é caso do asiaticosídeo, torna-se importante para o combate de doenças e lesões desencadeadas pelas ERO, sendo no caso do presente estudo, a intoxicação pelo paracetamol.

O modelo experimental utilizado para verificar a atividade hepatoprotetora do asiaticosídeo é bastante efetivo e tem sido utilizado com a mesma finalidade para o estudo de diversos extratos vegetais como o de *Trichosanthes lobata* (Rajasekaran & Periyasamy, 2012), de *Cyathea gigantea* (Kiran et al., 2012), de *Cnidioscolus aconitifolius* (Oyagbemi & Odetola, 2010), de *Clitoria ternatea* (Nithianantham et al., 2011), de 6-Gingerol (Sabina et al., 2011) e de *Polyalthia longifolia* e *Cassia spectabilis* (Jothy et al., 2012). Em todos estes estudos apenas um período

de pré-tratamento foi realizado, sendo o mais frequente de 07 dias (Rajasekaran & Periyasamy, 2012; Kiran et al., 2012; Oyagbemi & Odetola, 2010; Nithianantham et al., 2011; Sabina et al., 2011). O período pós-administração de paracetamol até a eutanásia dos animais foi de 24h em todos estes estudos. No presente trabalho, optou-se por utilizar dois períodos pós-overdose (24h e 72h) visando verificar progressão das alterações por curto tempo tendo em vista se tratar de lesões agudas.

A dose utilizada de 1mg/kg/dia de asiaticosídeo foi definida considerando-se três fatores: (a) o experimento realizado por Shukla et al. (1999) avaliando a ação do asiaticosídeo no processo de cicatrização em cobaias, com obtenção de resultados positivos; (b) extrapolação da dose utilizada terapêuticamente, que é de 60-90mg (Barnes et al., 2012) e considerando-se que para um indivíduo com peso entre 60 e 90 kg, a dose seria de aproximadamente 1mg/kg; (c) existência de relatos de que os componentes ativos da *Centella asiatica* podem provocar toxicidade hepática em pacientes (Jorge & Jorge, 2005) ou experimentalmente em ratos (Neves et al., 2007). Neste último estudo, as lesões hepáticas ocorreram em dez dias devido à administração de infusão de *Centella asiatica* 10g/L. Diante destes fatores, optou-se pela utilização de uma dose que apresentasse atividade terapêutica, minimizando o risco de uma possível reação adversa.

A análise histológica mostrou que o paracetamol, na dose utilizada, provocou necrose e infiltração inflamatória hepática em todos os animais dos grupos 24h e 72h, porém, neste último, as lesões foram mais intensas. Como descrito anteriormente, o asiaticosídeo preveniu as ações lesivas do paracetamol no fígado, uma vez que houve a redução de até 60% no número de animais atingidos pelas lesões no grupo tratado quando comparado ao grupo controle positivo.

Em estudos experimentais em ratos foi verificado que a administração de *Centella asiatica* (pó de folhas) minimizou a taxa de mortalidade de ratos com deficiência de proteína bruta, aumentou as proteínas nitrogenadas no sangue evitando a esteatose hepática (Patil et al., 1998). Zhang et al. (2010) observaram em modelo experimental de lesão hepática induzida com lipopolissacarídeo/d-galactosamina, que a administração prévia de asiaticosídeo diminuiu a intensidade de necrose e infiltração leucocitária.

As secções coradas com Picrosirius Red possibilitaram a realização da quantificação das fibras colágenas na perspectiva de identificação de fibrose. Após análise computacional das imagens verificou-se que não havia diferença significativa entre os grupos, seja na zona 01 ou 03 acinares. Este resultado se justifica devido à baixa intensidade de fibras colágenas observadas e mensuradas no grupo controle positivo, o que corrobora com muitos relatos na literatura científica, que não descrevem presença de fibrose na hepatite tóxica por paracetamol (Matos & Martins, 2005; Wu et al., 2008; Belardinelli et al., 2008; Acharya & Lau-Cam, 2010). Destaca-se que como o desenvolvimento da fibrose hepática é progressivo e depende da ativação das células de Ito, os períodos de 24h e

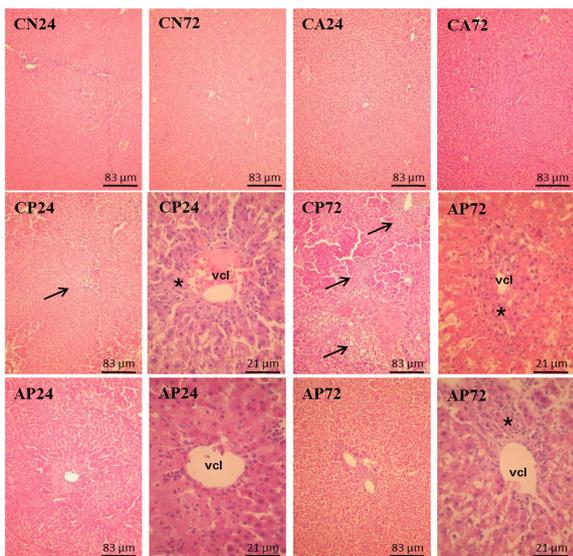


Figura 01: Micrografias de luz mostrando a presença e/ou ausência de necrose e focos inflamatórios nos diversos grupos experimentais. Notar que nos grupos Controle Negativo (CN24 e CN72) Asiaticosídeo (CA24 e CA72) a histologia hepática permaneceu preservada. No grupo Controle Positivo (CP24 e CP72) é possível verificar a presença marcante de infiltrado inflamatório polimorfonuclear e necrose, principalmente 72 horas pós-overdose de paracetamol. Verificar que no grupo Asiaticosídeo+Paracetamol (AP24 e AP72) há a presença mais discreta de infiltrado inflamatório e ausência de necrose. Infiltrado inflamatório (\*); foco necrótico (setas); veia centro-lobular (vcl). Hematoxilina e Eosina.

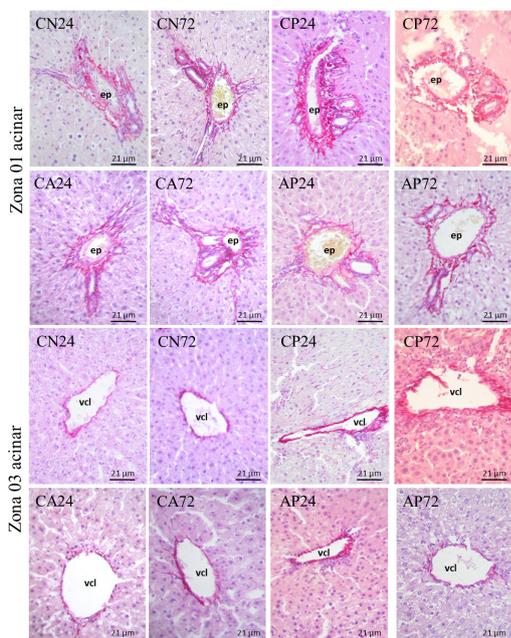


Figura 02: Micrografias de luz mostrando a distribuição de colágeno na zonas acinares 01 e 03. As fibras colágenas são identificadas pela sua coloração rósea intensa, dispostas principalmente ao redor dos espaços porta (zona 01) e das veias centrolobulares (zona 03). Notar que a deposição de colágeno é discreta em todos os grupos, indicando ausência de fibrose. CN: Grupo Controle Negativo; CA: Grupo Controle Asiaticosídeo; AP: Grupo Asiaticosídeo + Paracetamol; CP: Grupo Controle Positivo. Espaço porta (ep); veia centro-lobular (vcl). Picosirius Red.

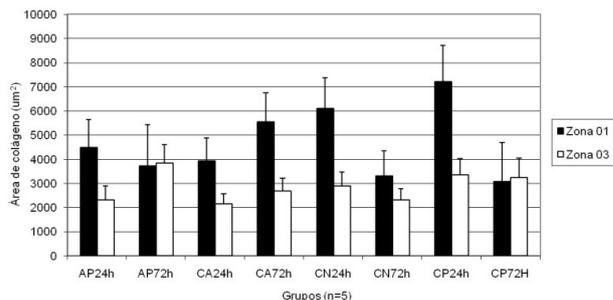


Figura 03: Resultado da quantificação de fibras colágenas na região portal (zona 01) e centro-lobular (zona 03). Observar a discreta variação de valores entre os grupos, não havendo diferença significativa entre estes. CN: Grupo Controle Negativo; CA: Grupo Controle Asiaticosídeo; AP: Grupo Asiaticosídeo + Paracetamol; CP: Grupo Controle Positivo. ANOVA seguido do teste de Bonferroni, considerando-se significativo valores de  $p < 0,05$ .

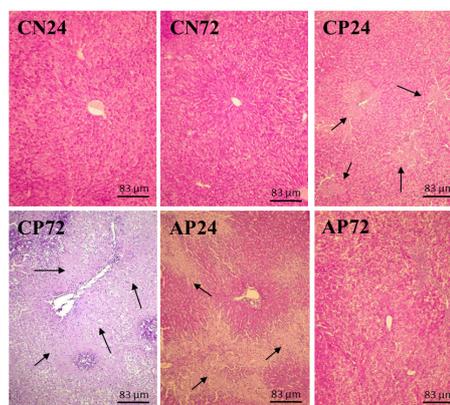


Figura 04: Micrografias da zona 03 acinar mostrando a distribuição do glicogênio e outros 1,2-glicósios. Notar que há diminuição na intensidade da coloração rósea (setas) nas imagens do grupo controle positivo, evidenciando o consumo de glicogênio. Nas imagens AP24 e AP72 observa-se que o asiaticosídeo impediu esta condição, sobretudo no grupo com 72horas. CN: Grupo Controle Negativo; CA: Grupo Controle Asiaticosídeo; AP: Grupo Asiaticosídeo + Paracetamol; CP: Grupo Controle Positivo. Ácido Periódico de Schiff (PAS).

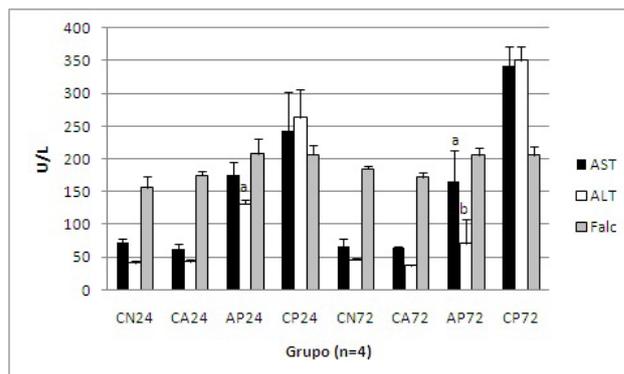


Figura 05: Resultado da dosagem de Aspartato-amino transferase (AST), Alanino-amino transferase (ALT) e Fosfatase Alcalina (Falc). Verificar a redução significativa de AST nos animais previamente tratados com Asiaticosídeo (AP24 e AP72) em relação ao grupo controle positivo (CP24). Para ALT, foi observada redução significativa somente no grupo com 24 horas (AP24). CN: Grupo Controle Negativo; CA: Grupo Controle Asiaticosídeo; AP: Grupo Asiaticosídeo + Paracetamol; CP: Grupo Controle Positivo. ANOVA seguido do teste de Bonferroni,  $ap < 0,05$  e  $bp < 0,001$  em relação aos respectivos grupos CP. Valor de referência em ratos: ALT - 51 U/l, AST - 81 U/l e Falc - 124 U/l (Dantas et al., 2006).

72h são bastante curtos para observação de quantidades significativas de fibras de colágeno. As células de Ito, fisiologicamente desempenham funções relacionadas ao metabolismo de retinóis, além de secreção de proteínas, fatores de crescimento e citocinas; no entanto, em algumas condições patológicas, adquirem características de miofibroblastos e apresentam papel efetivo no processo de fibrose (Junqueira & Carneiro, 2008).

A coloração pelo ácido periódico de Schiff mostrou que os animais tratados com elevada dose de paracetamol apresentaram uma grande diminuição das inclusões PAS positivas na região centro-lobular quando comparados com o grupo controle negativo. A diminuição de glicogênio hepático pelo paracetamol foi relatada por Itinose, Sakuno & Bracht (1989) e está relacionada à sua ligação irreversível a um metabólito reativo ou a inibição do metabolismo energético mitocondrial. Apesar da não realização de uma análise quantitativa, foi possível observar que o pré-tratamento com o asiaticosídeo interferiu pouco neste processo em 24 horas, entretanto foi mais efetivo em 72 horas, reduzindo parcialmente as inclusões PAS positivas na zona 3.

Com relação às transaminases hepáticas, na dose utilizada, o asiaticosídeo apresentou potencial efeito hepatoprotetor, pois os grupos que sofreram pré-tratamento com asiaticosídeo (24 e 72 horas), quando comparados ao grupo controle positivo, mostraram expressiva diminuição dos valores de AST e ALT, sendo significativos para AST em 72 horas e para ALT em 24 e 72 horas conforme figura 05. Resultados semelhantes a estes foram encontrados por Antony et al. (2006) em modelo experimental de injúria hepática causada por tetracloreto de carbono em ratos e por Zhang et al. (2010) em modelo experimental de lesão hepática induzida com lipopolissacarídeo/d-galactosamina em camundongos.

A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima encontrada em concentração elevada no músculo cardíaco, fígado e músculo esquelético e mais discretamente nos rins e pâncreas. Na célula hepática, a AST localiza-se no citoplasma (40%) e na mitocôndria (60%). A alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima encontrada predominantemente no fígado, em concentração moderada nos rins e em menores quantidades no coração e nos músculos esqueléticos. Na célula hepática, a ALT localiza-se no citoplasma (90%) e na mitocôndria (10%). Qualquer lesão tissular ou doença afetando o parênquima hepático liberará uma maior quantidade destas enzimas para a corrente sanguínea, elevando os níveis séricos da AST e ALT, o que indica doença hepatocelular.

A elevação das transaminases ocorre em muitos distúrbios hepáticos, como nas hepatites autoimune, A e B, na ação de substâncias tóxicas, na doença gordurosa, no alcoolismo e em tumores (Johnston, 1999). Drogas com capacidade de moderar ou impedir a elevação plasmática destas enzimas, apresentam importância terapêutica, uma vez que podem ser utilizadas na prevenção e

no tratamento de distúrbios hepáticos, sobretudo nas hepatites tóxicas, em que se observam elevações que podem variar de 300 a 10.000 U/l (Giannini et al., 2005).

A fosfatase alcalina compreende um grupo de enzimas fosfohidrolases que apresentam atividade máxima em pH alcalino, próximo de 10. A enzima é encontrada em vários tecidos, com maiores concentrações no fígado, no epitélio do trato biliar e no osso. A elevação dos níveis séricos desta enzima nas doenças hepáticas indica comprometimento ductular. No presente estudo, não foi verificada grande elevação da concentração sanguínea de fosfatase alcalina em nenhum dos grupos, incluindo-se aqui o grupo controle positivo e nem diferença significativa entre os grupos (figura 05). A ausência de elevação de FAalc no grupo controle positivo (e nos demais) está de acordo com os achados histológicos, uma vez que não foram observadas alterações em ductos biliares na microscopia de luz; indicando, assim, que a hepatotoxicidade por paracetamol seja citolítica e não colestática, conforme Matos & Martins (2005).

A atividade hepatoprotetora do asiaticosídeo, verificada neste e nos estudos realizados por Antony et al. (2006) e Zhang et al. (2010), está relacionada à sua propriedade antioxidante (Guo et al., 2004). Para o caso específico do paracetamol, o asiaticosídeo atua neutralizando os radicais livres formados pela ativação da via metabólica do Citocromo P450, devido à saturação da via preferencial de metabolização deste analgésico por glicuronidação e sulfatação. Outras propriedades atribuídas ao asiaticosídeo certamente estão relacionadas à sua ação antioxidante, principalmente aquelas em que a inflamação está presente, como na celulite, nas doenças de pele, feridas, dermatite, processos degenerativos do tecido conjuntivo (Barnes et al., 2012), haja vista que no processo inflamatório há produção de radicais livres e diversas citocinas. É evidente que a ação do asiaticosídeo neste tipo de processo é potencializada pela sua atividade bioativante da circulação periférica e revascularizante (Shukla et al., 1999).

Os resultados obtidos contribuem para a confirmação da atividade hepatoprotetora do asiaticosídeo quando utilizado em dose terapêutica já estabelecida, podendo esta ser incluída com segurança em seu espectro de indicações clínicas. Com base nos resultados, pode-se concluir que o asiaticosídeo, na dose usualmente empregada na fitoterapia, apresentou atividade hepatoprotetora na hepatite aguda causada por elevada dose de paracetamol, evidenciada pela diminuição histológica de necrose e focos inflamatórios, e redução dos níveis séricos de ALT e AST.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a Pontifícia Universidade Católica de Campinas pelo suporte financeiro.

## ABSTRACT

*Hepatoprotective activity of asiaticoside in experimental liver injury induced by paracetamol in rats*

**Asiaticoside is a triterpenoid present in *Centella asiatica* extract, responsible for the therapeutic activity of this plant in chronic liver disease. The hepatocyte is the cell responsible for the endocrine and exocrine functions of the liver, in addition to the conversion of harmful substances into non-toxic compounds that are excreted in the bile. That is why the liver is sensitive to the action of some drugs, such as paracetamol. Hence, paracetamol was used as an experimental model of liver damage, with the aim of assessing the effectiveness of asiaticoside, in a standard therapeutic dose, as a hepatoprotector in Wistar rats. In this experiment, 40 animals were used and divided into two groups: those treated with asiaticoside and the untreated control group. Animals from the first group were subjected to pretreatment with the active ingredient (1mg/kg/dia P.O.) for eight days and exposed to a toxic dose of paracetamol (3 g/kg P.O.) on the eighth day. After 24 h and 72 h, these rats were sacrificed for the collection of blood samples and liver fragments. To assess hepatoprotective activity, serum enzymes (AST, ALT and alkaline phosphatase) indicative of liver damage were measured and histological and morphological analyses of liver tissue were performed. The results obtained showed that asiaticoside exerted hepatoprotective action, since it promoted a reduction in histological lesions and a decrease in serum levels of AST and ALT. From these results, we conclude that asiaticoside, in the dose most commonly used in herbal medicine, protects the liver against acute hepatitis induced by paracetamol.**

Keywords: *Centella asiatica*. Paracetamol. Morphology. Liver. Hepatic transaminases.

## REFERÊNCIAS

- Acharya M, Lau-Cam CA. Comparison of the protective actions of N-acetylcysteine, hypotaurine and taurine against acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *J Biomed Sci*. 2010;17(1):S35. DOI: 10.1186 / 1423-0127-17-S1-S35.
- Antony B, Santhakumari G, Merina B, Sheeba V, Mukkadan J. Hepatoprotective effect of *Centella asiatica* (L) in carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Indian J Pharm Sci*. 2006;68(6):772-6.
- Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. *Fitoterápicos*. Trad. Rosário BA, Pizzato R. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2012.
- Belardinelli MC, Pereira F, Baldo G, Vicente-Tavares AM, Kieling CO, DA Silveira TR, Meurer L, Soares-Duarte ME, Giugliani R, Matte U. Adult derived mononuclear bone marrow cells improve survival in a model of acetaminophen-induced acute liver failure in rats. *Toxicology*. 2008;247(1):1-5.
- Dahlin DC, Miwa GT, Lu Ayh, Nelson SD. N-Acetyl-p-benzoquinone imine; a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1984;81:1327-31.
- Dantas, J.A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Acta Sci Health Sci*. 2006;28(2):165-70.
- Echard BW, Talpur NA, Fan AY, Bagchi D, Preuss HG. Hepatoprotective ability of a novel botanical formulation on mild liver injury in rats produced by acute acetaminophen and / or alcohol ingestion. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 2001; 110(1-2):289-93.
- Gasparri S. Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal de *Costus spicatus*. [Dissertação]. Canoas: Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular, Universidade Luterana do Brasil; 2005.
- Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Can Med Assoc J*. 2005;172(3):367-79.
- Guo JS, Cheng CL, Koo MWL. Inhibitory effects of *Centella asiatica* water extract and asiaticoside on inducible nitric oxide synthase during gastric ulcer healing in rats. *Planta Med*. 2004;70:1150-4.
- Hashimoto G. *Illustrated Cyclopedia of Brazilian Medicinal Plants*. Japan: ABOC-SHA; 1996.
- Heubi J, Barbacci M, Zimmerman H. Therapeutic misadventures with acetaminophen: Hepatotoxicity after multiple doses in children. *J Pediatr*. 1998;132:22-7.
- Itinose AM, Sakuno ML, Bracht A. Metabolic effects of acetaminophen. Studies in the isolated perfused rat liver. *Cell Biochem Funct*. 1989;7(4):263-73.
- Jambaz KH, Sheikh AS, Anwar HG. Protective effect of rutin of paracetamol and CCl<sub>4</sub> induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia*. 2002;73(7-8):557-63.
- James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos*. 2003;31:1499-506.
- Johnston DE. Special considerations in interpreting liver function tests. *Am Fam Phys*. 1999;59(8):2223-30.
- Jorge OA, Jorge AD. Hepatotoxicity associated with the ingestion of *Centella asiatica*. *Rev Esp Enferm Dig (Madrid)*. 2005;97:115-24.
- Jothy LS, Aziz A, Chen Y, Sasidharan S. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Polyalthia longifolia* and *Cassia spectabilis* leaves against Paracetamol-induced liver injury. *Evid Bas Comp Altern Med*. 2012;2012,ID61284:1-10. doi: 10.1155/2012/561284. Epub 2012 Nov 8.

- Junqueira LC, Carneiro J. Órgãos associados ao trato digestivo. In: Histologia Básica: texto e atlas. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan; 2008:317-38.
- Kasahara S, Henmi S. Medical Farb Index in Indonesia. Indonesia: P.T. Eisai, 1986.
- Kiran PM, Raju AV, Rao BG. Investigation of hepatoprotective activity of *Cyathea gigantea* (Wall. ex. Hook.) leaves against paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. Asian Pacific J Trop Biomed. 2012;2(5):352-6.
- Litovitz TL, Klein-Schwartz W, White S, Cobaugh DJ, Youniss J, Drab A, Berson BE. 1999 annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. Am J Emerg Med. 2000;18(5):517-74.
- Matos LC, Martins B. Hepatites tóxicas: revisão da literatura. Med Intern. 2005;12(4): 239-58.
- Neil K. Biochemical and Cellular Mechanisms of Toxic Liver Injury. Semin Liver Dis. 2002;22(2):137-44.
- Neves JS, Kasai A, Souza MA, Lopes PEVP, Totti AMG, Lopes RA, Sala MA, Petenusci SO. Hepatotoxicidade de plantas medicinais. LXIII. Ação da infusão de *Centella asiatica* (L.) Urban no rato. Investigação: Rev Cien Univ Franca. 2007;7:33-38.
- Nithianantham K, Shyamala M, Chen Y, Latha LY, Jothy SL, Sasidharan S. Hepatoprotective potential of *Clitoria ternatea* leaf extract against Paracetamol induced damage in mice. Molecules. 2011;16:10134-45.
- Oyagbemi AA, Odetola AA. Hepatoprotective effects of ethanolic extract of *Cnidocolus aconitifolius* on paracetamol-induced hepatic damage in rats. Pak J Biol Sci. 2010;13(4):164-9.
- Patil JS, Nagavi BG, Ramesh M, Vijaykumar GS. A study on the Immunostimulant activity of *Centella asiatica* in rats. Indian Drugs. 1998;35:711-4.
- Rajasekaran A, Periyasamy M. Hepatoprotective effect of ethanolic extract of *Trichosanthes lobata* on paracetamol-induced liver toxicity in rats. Chinese Med. 2012; 7(12):1-6.
- Reid AB, Kurten RC, McCullough SS, Brock RW, Hinson JA: Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. J Pharmacol Exp Ther. 2005;312:509-16.
- Sabina EP, Pragasam SJ, Kumar S, Rasool M. 6-Gingerol, an active ingredient of ginger, protects acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. Chin J Integr Med. 2011; 9(11):1264-9.
- Shukla A, Rasik AM, Jain GK, Shankar R, Kulshrestha DK, Dhawan BN. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. J Ethnopharmacol. 1999;65(1):1-11.
- Thabrew MI, Hughes RD, Gove CD, Portmann B, Williams R, McFarlane IG. Protective effects of *Osbeckia octandra* against paracetamol-induced liver injury. Xenobiotica. 1995;25(9):1009-17.
- Wu YL, Piao DM, Han XH, Nan JX. Protective Effects of Salidroside against Acetaminophen-Induced Toxicity in Mice. Biol Pharm Bull. 2008;31(8):1523-9.
- Zhang L, Li HZ, Gong X, Luo FL, Wang B, Hu N, Wang CD, Zhang Z, Wan JY. Protective effects of Asiaticoside on acute liver injury induced by lipopolysaccharide/D-galactosamine in mice. Phytomedicine. 2010;17:811-9.
- Zimmerman HJ. Hepatotoxicity. The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.

Recebido em 08 de julho de 2013

Aceito em 01 de outubro de 2013