

Estudo piloto: análise do fígado de ratos submetidos ao alcoolismo crônico experimental e tratados com *Morinda citrifolia* (noni)

Pilot study: analysis of the rats' liver submitted to experimental chronic alcoholism and treated with *Morinda citrifolia* (noni)

Estudio piloto: análisis del hígado de ratones sometidos a alcoholismo crónico experimental y tratados con *Morinda citrifolia* (noni)

Cristiane Akina Monma

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Estado do Pará, Belém, Pará, Brasil

Naiara Nascimento Silva

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Estado do Pará, Belém, Pará, Brasil

Tatiane Neotti

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Estado do Pará, Belém, Pará, Brasil

Victor Augusto Grécia Coutinho

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Estado do Pará, Belém, Pará, Brasil

Rosângela Baía Brito

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Estado do Pará, Belém, Pará, Brasil

Robson José de Souza Domingues

Laboratório de Morfofisiologia Aplicada à Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Estado do Pará, Belém, Pará, Brasil

Nelson Antonio Bailão Ribeiro

Laboratório de Morfofisiologia Aplicada à Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Estado do Pará, Belém, Pará, Brasil

Centro de Inovações Tecnológicas, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

RESUMO

O etilismo crônico causa dano hepático sequencial, desde esteato-hepatite até cirrose e então doença hepática em estágio final. A reparação hepática torna-se comprometida por aumento do estresse oxidativo, danos no DNA, peroxidação lipídica, mediados pela ingestão de etanol. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos protetores da *Morinda citrifolia* (noni) sobre o tecido hepático de ratos submetidos ao alcoolismo crônico. Foram utilizados 16 ratos, distribuídos em quatro grupos aleatórios ($n = 4$). O grupo controle (GC) recebeu apenas água por 20 semanas. O grupo alcoolismo (GA) recebeu água filtrada na primeira semana; na segunda, uma mistura que continha 10% de aguardente de cana; na terceira, 20%; durante a quarta e a quinta semanas, 30%; e a partir da sexta semana, uma proporção de 40% de aguardente de cana e 60% de água. O grupo desintoxicado (GD) foi submetido ao mesmo processo do GA, porém sofreu desadaptação gradativa ao álcool a partir da 14^a semana. O grupo noni (GN) foi submetido ao mesmo processo do GA, no entanto, a partir da 14^a semana recebeu sumo de noni como tratamento experimental. Na 20^a semana, os animais foram submetidos à eutanásia. O GN apresentou achados histopatológicos de tumefação focal de hepatócitos em apenas um rato, diferindo do GA, que apresentou alterações nos quatro ratos. No GD, três ratos apresentaram a mesma alteração e áreas citoplasmáticas ($138,83 \mu\text{m}^2$) e nucleares ($38,82 \mu\text{m}^2$) estatisticamente inferiores. Demonstrou-se o efeito benéfico do uso do noni após a submissão dos ratos ao alcoolismo crônico.

Palavras-chave: Alcoolismo; *Morinda*; Capacidade Antioxidante; Esteatose Hepática.

Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Nelson Antonio Bailão Ribeiro

Universidade do Estado do Pará, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Morfofisiologia Aplicada à Saúde

Trav. Perebebuí, 2623. Bairro: Marco

CEP: 66087-670 Belém-Pará-Brasil

E-mail: nelsonribeiro07@hotmail.com

INTRODUÇÃO

De acordo com relatório da Organização Mundial da Saúde, no ano de 2012 cerca de 3,3 milhões de mortes estavam relacionadas ao consumo de álcool. Desta forma, quase 6% de todas as mortes no mundo são atribuídas total ou parcialmente ao álcool¹. Dados de muitos países estimam que 6% do produto interno bruto são gastos em consequência de problemas sociais, devido ao consumo prejudicial de bebidas alcoólicas².

Há diversas condições mórbidas atribuíveis ao consumo de álcool que reduzem os anos de vida útil da população, como neoplasias malignas, condições neuropsiquiátricas, doenças cardiovasculares e cirrose³.

O dano hepático em decorrência do álcool é associado à esteatose hepática e hepatite, que é reversível quando o uso do álcool é interrompido. Porém, essa lesão pode progredir para quadros de fibrose, seguida de cirrose e doença hepática em estágio final. O etanol medeia esses efeitos inibindo a síntese de DNA, desta forma, impedindo a regeneração hepática. Além disso, a reparação torna-se comprometida por aumento do estresse oxidativo, danos no DNA, disfunção mitocondrial, peroxidação lipídica e ativação de citocinas pró-inflamatórias⁴.

Antes da instalação da esteatose hepática, os hepatócitos passam por uma alteração chamada tumefação celular, primeira manifestação de quase todas as lesões celulares, causada por aumento intracelular de água devido a desequilíbrios no gradiente osmótico em nível de membrana celular, resultante de falha na bomba de íons dependente de energia da membrana plasmática. Este colapso osmótico pode se estender do nível celular e atingir grande parte do sistema hepático, quando podem ser identificados, em nível tecidual, sinais de edema e apoptose, identificados pela presença, entre outros achados, de vacúolos claros. O efeito seguinte é a esteatose, que ocorre pela desestruturação do metabolismo hepático dos lipídios e do álcool, ambos dependentes da integridade da membrana celular e de ATP. Ocorre também prejuízo na secreção lipoproteica e aumento do catabolismo de gorduras em outros sistemas, principalmente o periférico⁵.

Alguns estudos têm mostrado que o uso de antioxidantes causa atenuação ou reversão dos danos provocados pelo consumo de etanol. As substâncias antioxidantes funcionam como defesa, combatendo os radicais livres, responsáveis pela degeneração hidrórica celular e, adicionalmente, participando nos processos de reparo de membranas e de cadeias nucleotídicas⁶. Em relação ao noni, existe uma alta concentração de compostos fenólicos, como as antraquinonas, a rutina, o asperulosídeo e a escopoletina, grupo de nutrientes com acentuada capacidade antioxidante^{7,8}. Kasdallah-Grissa et al⁹ verificaram que, em ratos nos quais foi administrado resveratrol, um potente antioxidante, houve uma maior prevenção nos danos hepáticos frente ao consumo de etanol. Nesse sentido, o fruto da *Morinda citrifolia* (noni), com propriedade

comprovadamente antioxidante^{10,11}, também poderia atenuar os danos hepáticos provocados pelo alcoolismo.

O fruto de noni é proveniente de uma planta tropical originária das ilhas do Pacífico, comumente usada na medicina popular para o tratamento de diversos tipos de doenças, como câncer, artrites, diabetes, asma, hipertensão^{12,13} e no alívio de dores¹⁴. Por essas propriedades, seu uso comercial tem apresentado importante destaque nos continentes asiático, europeu e americano¹⁵. No Brasil, a popularidade do fruto ainda é muito incipiente, mas já há pesquisadores e pequenas empresas envolvidas em sua difusão, inclusive no Estado do Pará¹³.

Diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de analisar a capacidade antioxidante do noni. A pesquisa realizada por Lin et al¹⁶, utilizando o método de cromatografia líquida de alta resolução, mostrou que o suco de noni possui três ácidos fenólicos em maior quantidade: ácido gentísico, ácido p-hidroxibenzoico e ácido clorogênico. O ácido gentísico e o clorogênico foram os responsáveis pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase, a glutationa peroxidase, a glutationina redutase e a quinona redutase, estabilizando a membrana celular e inibindo a peroxidação lipídica no fígado de hamsters que receberam uma dieta rica em gordura associada ao suco de noni. Além disso, houve redução de mediadores inflamatórios, como COX-2, TNF- α e IL1- β .

O trabalho de Wang et al¹⁷ realizado com ratos mostrou que a administração de suco de noni, antes da indução de lesão hepática aguda pelo tetracloreto de carbono (CCl_4), possui um efeito hepatoprotetor, possivelmente por inibição da resposta inflamatória e de lesões induzidas por radicais livres. Neste experimento, o grupo noni não apresentou lesão hepática tipicamente induzida por CCl_4 , hepatócitos extremamente vacuolizados (células apoptóticas) adjacentes à veia central.

Assim, tendo em vista os efeitos sistêmicos do alcoolismo crônico e as propriedades do noni, esta pesquisa objetivou analisar, em nível microscópico, alterações do tecido hepático provocadas pelo álcool, assim como atenuações de tais modificações pelo tratamento experimental com a *M. citrifolia*.

MATERIAIS E MÉTODOS

ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Morfofisiologia Aplicada à Saúde da Universidade do Estado do Pará (UEPA), após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UEPA, protocolo nº 28/12, aprovado em 5 de julho de 2013.

ESPECIFICIDADES DO NONI

O noni foi obtido em uma fazenda localizada no Município de Santa Izabel do Pará, Estado do Pará, Brasil. Para a produção de 100 mL do sumo dessa fruta, foram utilizados dois frutos maduros, de coloração amarelada, pesando aproximadamente 350 g cada.

Foram retiradas a casca e as sementes dos dois frutos. Um dos frutos foi processado em um triturador manual para obtenção da polpa. O outro fruto foi prensado, em uma prensa manual, para extração do suco. A polpa foi peneirada em um coador de plástico, juntamente com o suco de noni. O suco foi acrescentado para diminuir a consistência e possibilitar a administração do alimento por gavagem.

Nesse processo, foi obtida uma quantidade de sumo de noni de aproximadamente 100 mL. O sumo foi produzido semanalmente e conservado em um refrigerador à temperatura de 3° C dentro de recipiente de plástico limpo e protegido da ação da luz.

IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO NONI

A espécie vegetal *M. citrifolia* teve a confirmação taxonômica feita por profissionais qualificados do Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental (CPAU), tendo sido registrada com o número de exsicata 189493.

AMOSTRA

O estudo foi de caráter descritivo e experimental. Foram utilizados 16 ratos pertencentes à espécie *Rattus norvegicus* (linhagem Wistar), sendo machos, adultos, entre 90 e 120 dias, pesando entre 180 e 250 g, procedentes do Biotério da Universidade Federal do Pará. Esses animais foram previamente adaptados ao biotério do Laboratório de Morfofisiologia Aplicada à Saúde, por um período de 15 dias antes do início do experimento e mantidos em ambiente com fatores controlados: umidade a 55%, temperatura de 23° C e exposição à luz por um período diário de 12 h (7 h às 19 h) durante todo o estudo.

Os animais foram distribuídos por randomização em quatro grupos, cada qual com quatro animais, conforme explicitado a seguir.

GRUPO CONTROLE (GC): recebeu água filtrada como dieta líquida por 20 semanas e ração *ad libitum*.

GRUPO ALCOOLISMO (GA): recebeu aguardente de cana (39° GL), diluída a 40° Gay Lussac (40° v/v), misturada à água, tendo sido a ração administrada *ad libitum*, seguindo-se um modelo de alcoolismo crônico determinado de "semivoluntário"¹⁸. Na primeira semana, os animais receberam somente água filtrada. Já na segunda semana, receberam uma mistura que continha 10% de aguardente de cana. Na terceira semana, a proporção de aguardente aumentou para 20% e, durante a quarta e a quinta semanas, para 30%. A partir da sexta semana, manteve-se constante uma proporção de 40% de aguardente de cana e 60% de água. Os animais foram submetidos à eutanásia na 20ª semana. Neste grupo foram analisados os efeitos do alcoolismo crônico no fígado dos ratos.

GRUPO DESINTOXICADO (GD): passou pelo mesmo processo do GA, no entanto, os ratos tiveram um breve período de desadaptação gradativa ao álcool, recebendo uma dieta líquida de etanol a 40%, 30%, 20% e 10% na 13^a, 14^a, 15^a e 16^a semanas, respectivamente, e uma dieta líquida à base de água filtrada da 17^a até a

20^a semana, quando sofreram eutanásia. Neste grupo foi analisado se a reversão das alterações provocadas pelo alcoolismo crônico ocorreu devido ao noni, ou simplesmente pela desintoxicação alcoólica.

GRUPO NONI (GN): passou pelo mesmo processo do GA, no entanto, a partir da 14^a semana, foi administrado aos animais sumo de noni. Neste grupo foi analisado o efeito do noni nos fígados de ratos submetidos ao alcoolismo crônico.

O sumo foi administrado a uma quantidade de 0,5 mL/dia, até a 20^a semana, por meio de gavagem com uma agulha de aço inox da marca Aton, com 38 mm de comprimento.

A dose diária de noni foi calculada com base na dose de ataque de 180 mL/dia para uso em adultos, na qual ocorre a saturação das células hepáticas, segundo Neil¹². Essa quantidade foi estimada para um adulto de 70 kg, tendo como valor proporcional para um rato de 300 g o volume de 0,5 mL/dia.

PROCESSAMENTO DO MATERIAL HISTOLÓGICO

Após a 20^a semana, os animais de todos os grupos foram submetidos à eutanásia. Depois de retirado o fígado, o lobo direito foi cortado em fatias de 0,5 cm, submetido à rotina histológica e cortado com espessura de 4 µm. Para cada animal, foram confeccionadas duas lâminas histológicas, coradas com hematoxilina-eosina (HE).

ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A análise foi realizada em fotomicroscópio, modelo Zeiss Axio Scope.A1, acoplado a um computador, com o software Axionvision® rel.4.7. Para a mensuração da área nuclear e citoplasmática dos hepatócitos, em µm², foram escolhidas 75 células de cada animal, com contorno totalmente visível, através de cinco fotos de regiões diferentes da mesma lâmina, tendo sido, em cada foto, mensuradas aleatoriamente as áreas nucleares e a área celular total de 15 células. O aumento utilizado para obter as fotos foi de 40x, permitindo melhor visualização das células¹⁹. O valor da área citoplasmática foi obtido subtraindo-se, da área celular total, o valor da área nuclear. Após as mensurações da área nuclear e da área citoplasmática dos hepatócitos, determinou-se a relação núcleo-citoplasma.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram calculadas a média e o desvio padrão dos dados morfométricos dos grupos controle, alcoolismo, desintoxicado e noni. Ao final da coleta dos dados, foi verificado se as distribuições numéricas atendiam aos padrões de normalidade pela análise dos coeficientes de assimetria e curtose. Em seguida, foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA), um critério tipo Tukey, a fim de comparar as variáveis numéricas dos quatro grupos estudados e estabelecer as semelhanças e diferenças entre eles. O nível de significância estatística ou margem de erro foi estipulado em $p \leq 0,05$. Os programas Microsoft Excel® 2010 e BioEstat® 5.3 foram utilizados para realizar a análise estatística descritiva e inferencial, respectivamente.

RESULTADOS

Em relação à análise histopatológica do tecido hepático, tanto no GC quanto no GN, apenas um rato apresentou alteração. No GC, observou-se uma coleção focal de células inflamatórias perivasicular e, no GN, tumefação focal de hepatócitos.

Os grupos GD e GA apresentaram maior número de alterações. Na maioria dos ratos do GD foi encontrada tumefação focal de hepatócitos associada a células inflamatórias no espaço porta. Em todos os ratos do GA houve tumefação de hepatócitos predominantemente multifocal. Além disso, todos tiveram infiltração de

células inflamatórias no parênquima ou espaço porta e, em um rato, observou-se esteatose unifocal e macrovacuolar (Quadro 1).

Em relação à morfometria, houve diferença estatística ($p < 0,01$) entre a média da mensuração da área nuclear dos hepatócitos dos grupos GA ($47,95 \mu\text{m}^2$) e GN ($38,82 \mu\text{m}^2$) e dos grupos GD ($46,29 \mu\text{m}^2$) e GN (Tabela 1). A dissociação núcleo-citoplasma foi encontrada principalmente nos GA (Figura 1) e no GD (Figura 2).

A análise da área citoplasmática mostrou que o GA teve a maior área, seguido pelo GD, vindo em seguida o GC e, finalmente, o GN (Tabela 2).

Quadro 1 – Achados histopatológicos do tecido hepático dos ratos de acordo com cada grupo. Belém, Estado do Pará, Brasil, 2013

Grupo	Alterações histopatológicas	Incidência
GC	Coleção focal de CI perivasicular, predominância de PMN	1/4
	Sem alterações	3/4
GA	Foco único TH	1/4
	TH multifocal	3/4
	Coleção focal de CI no espaço porta, predominância de PMN	3/4
	Esteatose unifocal, com predominância de alterações macrovacuolares	1/4
GD	Foco único TH	3/4
	Coleção focal de CI no espaço porta, predominância de PMN	3/4
	Necrose focal de hepatócitos	1/4
GN	Foco único de TH no parênquima	1/4
	Sem alterações	3/4

Fonte: Protocolo de pesquisa.

TH: tumefação de hepatócito; CI: células inflamatórias; PMN: polimorfonucleares; SA: sem alterações significativas.

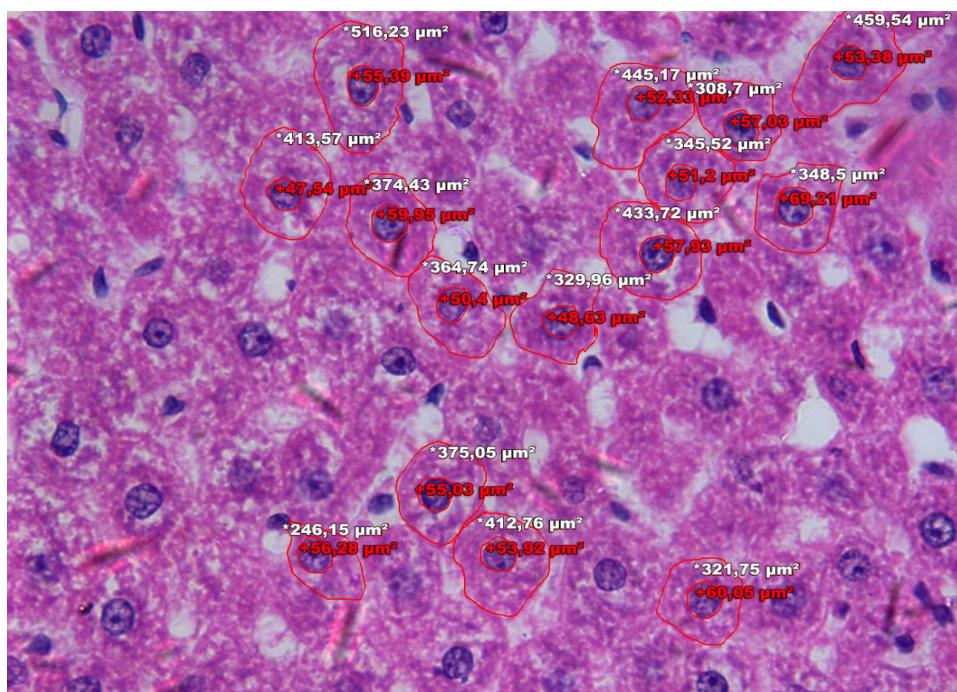
Tabela 1 – Média das áreas citoplasmáticas dos animais estudados, em μm^2 , de acordo com cada grupo. Belém, Estado do Pará, Brasil, 2013

Grupo	Média da área citoplasmática
GN*	138,83
GC†	168,40
GD	175,80
GA‡	183,23

Tabela 2 – Média das áreas nucleares dos animais estudados, em μm^2 , de acordo com cada grupo. Belém, Estado do Pará, Brasil, 2013

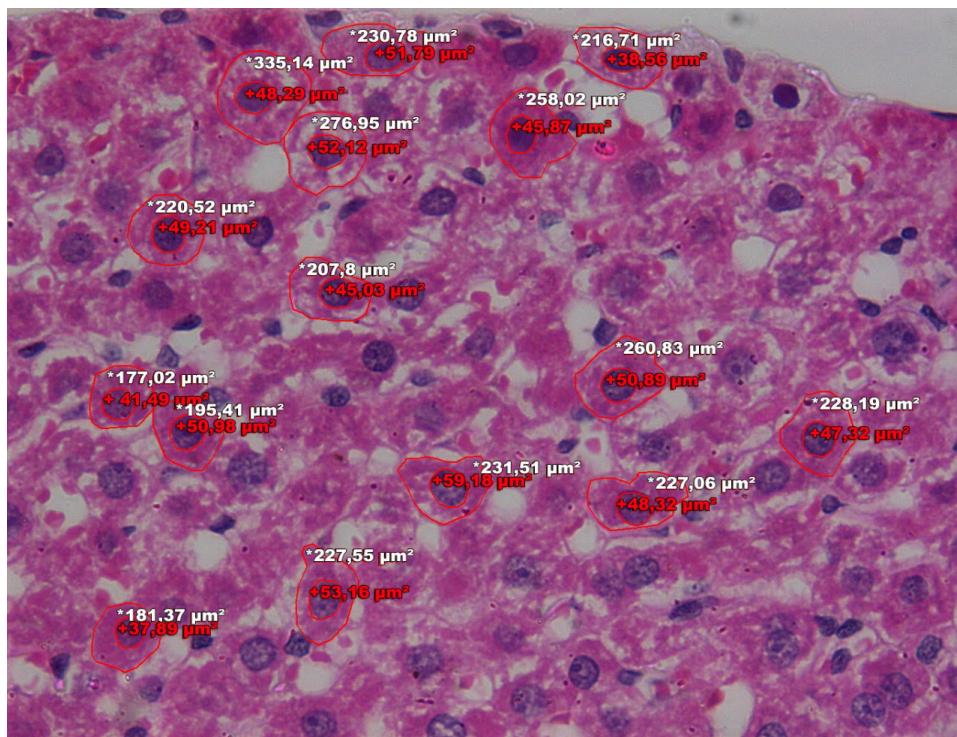
Grupo	Média da área nuclear
GN	38,82
GC*	39,30
GD†	46,29
GA‡,§	47,95

Fonte: Protocolo de pesquisa.
* $p < 0,01$ (ANOVA) médias de GA e GN; † $p < 0,01$ (ANOVA) médias de GC e GN; ‡ $p < 0,01$ (ANOVA) médias de GA e GC; § $p < 0,01$ (ANOVA) médias de GA e GN.



Fonte: Lâmina histológica da pesquisa.

Figura 1 – Dissociação núcleo-citoplasma nos ratos do GA. Belém, Estado do Pará, Brasil, 2013



Fonte: Lâmina histológica da pesquisa.

Figura 2 – Dissociação núcleo-citoplasma nos ratos do GD. Belém, Estado do Pará, Brasil, 2013

DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, a alteração morfológica comum aos grupos GN, GD e GA foi a tumefação celular (Quadro 1). O metabolismo do álcool em nível celular resulta na produção de uma grande quantidade de acetaldeído e radicais livres. Os radicais livres causam lesão na membrana celular, principalmente pelo rompimento de ligações covalentes e liberações de radicais alquila, os quais seguem em cascata de

degradação estrutural, com prejuízo funcional importante a longo prazo. As alterações no nível das organelas, como mitocôndrias e retículo endoplasmático, provocadas pela peroxidação lipídica, levam à degeneração hidrópica da célula²⁰. A tumefação celular ou degeneração hidrópica é uma lesão reversível, na qual as células tornam-se incapazes de manter a homeostase iônica e líquida, resultando no acúmulo de gordura, água e proteínas que normalmente são exportadas⁵.

A tumefação celular foi predominante no GA e quase não esteve presente no GN, com apenas um animal afetado. A probabilidade de semelhança definida pelo cálculo do p-valor entre esses dois grupos, pelo teste exato de Fisher, é de 14%, o que mostra uma tendência protetora do noni e sugere que novos estudos com resultados significativos podem ser feitos, porém com amostras maiores. Esse resultado pode ser atribuído às propriedades nutracêuticas deste fruto. Alimentos nutracêuticos são aqueles que proporcionam benefícios médicos diretos ou indiretos sobre uma determinada patologia ou sobre o estado geral de saúde, podendo ser fibras dietéticas, ácidos graxos poli-insaturados, proteínas, peptídios, aminoácidos ou cetoácidos, minerais, vitaminas antioxidantes e outros antioxidantes²¹.

Após a análise dos resultados desta pesquisa e estudos prévios, nota-se que o efeito de proteção hepática é bem correlacionado com a propriedade antioxidante da *M. citrifolia*. Na pesquisa de Nayak et al²², ratos diabéticos tratados com suco de noni tiveram redução da degeneração gordurosa do hepatócito em comparação aos não tratados, provavelmente devido à propriedade antioxidante dos componentes flavonoides do noni.

Outra pesquisa mostrou que o suco de noni promove hepatoproteção contra a lesão induzida pelo álcool por meio da regulação da homeostase lipídica, do estado antioxidant, do metabolismo alcoólico e da resposta anti-inflamatória. Houve diminuição dos níveis de gordura hepática e dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), e aumento da excreção diária de lipídios fecais nos ratos com dieta à base de álcool que ingeriram o suco de noni. Além disso, ocorreu aumento da betaoxidação de ácidos graxos e aceleração da eliminação de álcool por meio do aumento da atividade hepática das enzimas álcool-desidrogenase (ADH) a acetaldeído desidrogenase (ALDH)²³.

Em concordância com o estudo anteriormente citado, nesta pesquisa os grupos GD e GA apresentaram mais alterações histopatológicas quando comparados com o GN, dado que pode ser observado no quadro 1. Em todos os ratos do GA observou-se tumefação dos hepatócitos e, na maioria, colecões focais de células inflamatórias no parênquima hepático, com predominância de polimorfonucleares; apenas um rato apresentou esteatose, unifocal e macrovacuolar. No grupo desintoxicado, a maioria dos ratos apresentou uma tumefação de hepatócitos focal e uma colecção focal de células inflamatórias no espaço porta, com predominância de polimorfonucleares, que pode ser explicada pela produção de grande

quantidade da quimiocina IL-8 por parte das células de Kupffer, ativadas não só pelos metabólitos do etanol (acetaldeído e radicais livres), como pelos produtos bacterianos absorvidos do intestino; também os hepatócitos em estresse oxidativo produzem e liberam citocinas (IL-1 e TNF) e quimiocinas (IL-8), que favorecem a migração dos neutrófilos²⁰. Estudos posteriores com maior tamanho amostral são necessários para identificar a origem da diferença encontrada entre os ratos do GC, GA e GD quanto à inflamação do tecido hepático.

O único grupo que apresentou necrose focal de hepatócitos foi o GD, mostrando-se uma tendência de diferença estatística entre esse e os demais grupos da pesquisa, calculada pelo teste exato de Fisher com p-valor igual a 14%. O padrão de inflamação com necrose focal e sem fibrose pode estar associado a uma doença sistêmica como pneumonia intersticial. Esse padrão foi semelhante ao encontrado na pesquisa de Bosma et al²⁴.

Em relação à análise morfométrica, verificou-se que a área citoplasmática do GA foi estatisticamente superior à do GN (Tabela 1). Esse fato pode estar vinculado às substâncias antioxidantes encontradas no noni, as quais provavelmente estão relacionados ao processo reparador de lesões causadas pelos radicais livres produzidos durante a metabolização do álcool, tanto em nível citoplasmático como nuclear⁵.

Em relação à área nuclear, o GA teve a maior área nuclear média, seguido pelos grupos GD, GC e GN (Tabela 2), fato semelhante à pesquisa de Bravo et al²⁵, na qual a área nuclear foi estatisticamente maior entre os ratos alcoólicos, se comparados aos do GC. O núcleo é o centro de controle das atividades metabólicas da célula²⁶ e o tamanho do núcleo está diretamente relacionado ao metabolismo celular²⁷. Sendo assim, pode-se inferir que o maior valor da área nuclear deve-se ao maior metabolismo dos hepatócitos do GA.

CONCLUSÃO

Analizando os resultados, conclui-se que a tumefação foi mais incidente nos grupos GD e GA, os quais foram submetidos ao efeito deletério do alcoolismo sem a administração do noni. Mesmo o GD, para o qual o álcool não foi administrado nas últimas três semanas do experimento, apresentou maior proporção de ratos com tumefação de hepatócitos do que o GN. Além disso, os valores estatisticamente inferiores das áreas citoplasmáticas e nucleares demonstram o efeito benéfico da utilização do noni após o modelo de alcoolismo crônico utilizado nesta pesquisa.



Pilot study: analysis of the rats' liver submitted to experimental chronic alcoholism and treated with *Morinda citrifolia* (noni)

ABSTRACT

Chronic alcohol consumption causes sequential liver damage from cirrhosis to steatohepatitis and then liver disease in end stage. Hepatic repair becomes compromised by increased oxidative stress, DNA damage, lipid peroxidation, mediated by the ingestion of ethanol. The aim of this study was to analyze the protective effects of *Morinda citrifolia* (noni) on the liver tissue of rats subjected to chronic alcoholism. Sixteen rats were used, divided into four random groups ($n = 4$). The control group (CG) received only water for 20 weeks. The alcoholism group (AG) received filtered water in the first week; the second, a mixture containing 10% of sugar cane liquor; in the third one, 20%; during the fourth and fifth weeks, 30%; and from the sixth week, a proportion of 40% of sugar cane liquor and 60% water. The detoxified group (DG) was subjected to the same process of AG, but it suffered gradual maladjustment to the alcohol from the week 14. The noni group (NG) was subjected to the same process of AG, however, from the week 14, it received noni juice as an experimental treatment. During the week 20, the animals were euthanized. NG presented histopathological findings of focal tumefaction of hepatocytes in only one rat different from AG that presented changes in four rats. In DG, three rats showed the same change and cytoplasmic ($138.83 \mu\text{m}^2$) and nuclear ($38.82 \mu\text{m}^2$) areas statistically lower. It has been shown the positive effect of using noni after submitting rats to chronic alcoholism.

Keywords: Alcoholism; Morinda; Antioxidants Capacity; Fatty Liver.

Estudio piloto: análisis del hígado de ratones sometidos a alcoholismo crónico experimental y tratados con *Morinda citrifolia* (noni)

RESUMEN

El etilismo crónico causa daño hepático secuencial, desde esteatohepatitis hasta cirrosis y entonces, enfermedad hepática en estadio final. La reparación hepática se torna comprometida por el aumento del estrés oxidativo, daños al ADN, peroxidación lipídica, mediados por ingestión de etanol. El objetivo de este estudio fue el de analizar los efectos protectores de *Morinda citrifolia* (noni) sobre el tejido hepático de ratones sometidos a alcoholismo crónico. Se utilizaron 16 ratones, distribuidos en cuatro grupos aleatorios ($n = 4$). El grupo control (GC) recibió apenas agua por 20 semanas. El grupo alcoholismo (GA) recibió agua filtrada la primera semana; la segunda, una mezcla que contenía 10% de aguardiente de caña; la tercera, 20%; durante la cuarta y la quinta semanas, 30%; y a partir de la sexta semana, una proporción de 40% de aguardiente de caña y 60% de agua. El grupo desintoxicado (GD) fue sometido al mismo proceso del GA, pero, también fue sometido a una desadaptación gradual al alcohol a partir de la 14^a semana. El grupo noni (GN) fue sometido al mismo proceso del GA, sin embargo, a partir de la 14^a semana recibió zumo de noni como tratamiento experimental. En la 20^a semana, los animales fueron sometidos a eutanasia. El GN presentó hallazgos histopatológicos de tumefacción focal de hepatocitos en solamente un ratón, distinto al GA, en el cual los cuatro ratones presentaron alteraciones. En el grupo GD, tres ratones presentaron la misma alteración y áreas citoplasmáticas ($138,83 \mu\text{m}^2$) y nucleares ($38,82 \mu\text{m}^2$) estadísticamente inferiores. Se demostró el efecto benéfico del uso de noni luego de someter los ratones a alcoholismo crónico.

Palabras clave: Alcoholismo; Morinda; Capacidad Antioxidantes; Hígado Graso.



REFERÊNCIAS

- 1 World Health Organization. Global status report on alcohol and health - 2014. Geneva: WHO; 2014.
- 2 Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Bol Epidemiol. 2007;29:4.
- 3 Meloni NJ, Laranjeira R. Custo social e de saúde do consumo do álcool. Rev Bras Psiquiatr. 2004 mai;26 supl 1:7-10.
- 4 Monte SM, Longato L, Tong M, Denucci S, Wands JR. The liver-brains axis of alcohol-mediated neurodegeneration role of toxic lipids. Int J Environ Res Public Health. 2009 Jul;6(7):2055-75.
- 5 Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, editores. Robbins e Cotran patologia: bases patológicas das doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.
- 6 Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Rev Nutr. 1999 mai-ago;12(2):123-30.
- 7 Chan-Blanco Y, Vaillant F, Peres AM, Reynes M, Brilhouet JM, Brat P. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): a review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. J Food Compos Anal. 2006 Sep-Nov;19(6-7):645-54.
- 8 Wang M, Su C. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (noni). Ann N Y Acad Sci. 2001 Dec;952:161-8.

- 9 Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, El May M, Gharbi N, et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci.* 2007 Feb;80(11):1033-9.
- 10 Correia AAS, Gonzaga MCL, Aquino AC, Souza PHM, Figueiredo RW, Maia GA. Caracterização química e físico-química da polpa do noni (*Morinda citrifolia*) cultivado no estado do Ceará. *Alim Nutr.* 2011 out-dez;22(4):609-15.
- 11 Dussossoy E, Brat P, Bony E, Boudar F, Poucheret P, Mertz C, et al. Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). *J Ethnopharmacol.* 2011 Jan;133(1):108-15.
- 12 Neil S. O fruto tropical de 101 aplicações medicinais: sumo de noni (*Morinda citrifolia*), o fruto insular. Geneva: Direct Source; 1999. p. 5-33.
- 13 Pola CC, Junqueira MS, Carvalho RS, Teixeira LJQ, Saraiva SH. Efeito do processamento na capacidade antioxidante do noni (*Morinda citrifolia*). *Encycl Biosfera.* 2011;7(12):1-16.
- 14 Wang MY, West BJ, Jensen CJ, Nowicki D, Su C, Palu AK, et al. *Morinda citrifolia* (noni): a literature review and recent advances in noni research. *Acta Pharmacol Sin.* 2002 Dec;23(12):1127-41.
- 15 European Food Safety Authority. Opinion on a request from the Commission related to the safety of noni juice (juice of the fruits of *Morinda citrifolia*). *EFSA J.* 2006;(376):1-12.
- 16 Lin YL, Chang YY, Yang DJ, Tzang BS, Chen YC. Beneficial effects of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice on livers of high-fat dietary hamsters. *Food Chem.* 2013 Sep;140(1-2):31-8.
- 17 Wang MY, Nowicki D, Anderson G, Jensen J, West B. Liver protective effects of *Morinda citrifolia* (noni). *Plant Foods Hum Nutr.* 2008 Jun;63(2):59-63.
- 18 Cagnon VM, Garcia PJ, Martinez FE, Martinez M, Padovani CR. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of rats submitted to experimental chronic alcoholism. *Prostate.* 1993;22(4):317-24.
- 19 Taffarel AA. Morfologia e histomorfometria do fígado de ratas submetidas à suplementação com l-arginina [tese]. Mogi das Cruzes (SP): Faculdade do Clube Náutico Mogiano; 2011.
- 20 Gonçalves CS, Gomes MPZ, Gonçalves PL, Gonçalves LL, Pereira FEL. Hepatite alcoólica. *J Bras Gastroenterol.* 2006;6(2):59-68.
- 21 Moraes FP, Colla LM. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Rev Eletr Farm.* 2006;3(2):99-112.
- 22 Nayak BS, Marshall JR, Isitor G, Adogwa A. Hypoglycemic and hepatoprotective activity of fermented fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) in diabetic rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011(ID875293):1-5.
- 23 Chang YY, Lin YL, Yang DJ, Liu CW, Hsu CL, Tzang BS, et al. Hepatoprotection of noni juice against chronic alcohol consumption: lipid homeostasis, antioxidation, alcohol clearance, and anti-inflammation. *J Agric Food Chem.* 2013 Nov;61(46):11016-24.
- 24 Bosma A, Scifert WF, Wilson JHP, Roholl PIM, Brouwer A, Knook DL. Chronic administration of ethanol with high vitamin A supplementation in a liquid diet to rats does not cause liver fibrosis: 1. morphological observations. *J Hepatol.* 1991 Sep;13(2):240-8.
- 25 Bravo MG, Batista AL, Antich RMC, Segui GP. Alteraciones morfométricas de los hepatócitos de ratas albinas que ingeren alcohol desde la adolescencia. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2003 jun;22(2):117-122.
- 26 Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Biologia molecular da célula. 4. ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 2004.
- 27 Andrade CGTJ, Jordão BQ. O núcleo da célula. In: Junqueira L, Carneiro J, editores. Biologia celular e molecular. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 52-66.

Recebido em / Received / Recibido en: 29/8/2015
Aceito em / Accepted / Aceito en: 19/11/2015