

FACULDADE EVANGÉLICA MACKENZIE DO PARANÁ

CARLOS FRANCISCO MATOS PARDAL

ISABELLE GUTH

EFEITOS DA CAFEÍNA NA ENCEFALOPATIA HEPÁTICA INDUZIDA POR
MODELO EXPERIMENTAL DE CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA

CURITIBA

2019

CARLOS FRANCISCO MATOS PARDAL

ISABELLE GUTH

EFEITOS DA CAFEÍNA NA ENCEFALOPATIA HEPÁTICA INDUZIDA POR
MODELO EXPERIMENTAL DE CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA

Monografia apresentada ao curso de Medicina, com
área de concentração em gastroenterologia, como
trabalho científico de curso da Faculdade Evangélica
Mackenzie do Paraná (FEMPAR).

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Kubrusly

CURITIBA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná)

G984 Guth, Isabelle.

Efeitos da cafeína na encefalopatia hepática induzida por modelo experimental de cirrose biliar secundária / Isabelle Guth, Carlos Francisco Matos Pardal. — Curitiba, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Kubrusly.
Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Presbiteriano Mackenzie, Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curso de Medicina, 2019.

1. Encefalopatia hepática. 2. Cirrose hepática biliar. 3. Cafeína.
I. Pardal, Carlos Francisco Matos. II. Título.

CDD 616.362

CARLOS FRANCISCO MATOS PARDAL

ISABELLE GUTH

EFEITOS DA CAFEÍNA NA ENCEFALOPATIA HEPÁTICA INDUZIDA POR
MODELO EXPERIMENTAL DE CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA

Monografia apresentada ao curso de Medicina, com
área de concentração em gastroenterologia, como
trabalho científico de curso da Faculdade Evangélica
Mackenzie do Paraná (FEMPAR).

COMISSÃO EXAMINADORA

CURITIBA

2019

RESUMO

As doenças hepáticas são de grande importância para a saúde pública, visto que estão associadas a elevados custos com tratamentos e internações hospitalares. A via final comum dessas doenças é a cirrose, que pode descompensar e levar ao desenvolvimento de complicações, tais como a encefalopatia. Essa complicação, relacionada a uma alta mortalidade, indicando, portanto, a necessidade de transplante hepático em casos acentuados, tem sua etiopatogenia associada à hiperamonemia, condição desenvolvida em pacientes portadores de cirrose hepática. Sendo assim, substâncias capazes de interferir nos níveis séricos de amônia podem ser utilizadas no seu manejo, como, por exemplo, a cafeína, que aumenta a atividade do ciclo da ureia no fígado, levando a uma maior degradação de amônia. Além disso, essa substância exerce efeito hepatoprotetor, ao impedir a formação de fibrose hepática, e estimula o sistema nervoso central, ao antagonizar os receptores de adenosina. A partir disso, o presente estudo objetiva avaliar os efeitos da Cafeína na encefalopatia hepática induzida por modelo experimental de cirrose biliar secundária, por meio da ligadura de ducto biliar comum, associada à administração de ração hiperproteica (76% de proteína de soja). Para isso, foram utilizados 32 ratos machos da linhagem Wistar divididos igualmente em 4 grupos (n=8). O experimento durou 28 dias, com administração de 50mg/Kg/dia de cafeína via intragástrica. E, por fim, para avaliação dos efeitos dessa substância, foram realizados exames laboratoriais, análise histológica de fígado e encéfalo, teste comportamental de campo aberto e registros diários de comportamento. Nos animais tratados com Cafeína, observou-se diminuição da fibrose na histologia hepática, diminuição dos níveis das transaminases ALT e AST na circulação sanguínea, melhora dos sinais característicos da encefalopatia hepática e redução das alterações histológicas encefálicas. Dessa forma, pôde-se concluir que a cafeína preveniu o desenvolvimento da encefalopatia grave em associação com os seus efeitos de hepatoproteção, estimulação do sistema nervoso central e aumento da degradação de amônia.

Palavras-chave: Cafeína. Cirrose Hepática. Encefalopatia Hepática.

ABSTRACT

Liver diseases are of great importance for public health, since they are associated with high costs with treatments and hospitalizations. The common final route of these diseases is cirrhosis, which can decompensate and lead to the development of complications, such as encephalopathy. This complication, related to a high mortality, thus indicating the need for liver transplantation in severe cases, has its etiopathogenesis associated with hyperammonemia, a condition developed in patients with liver cirrhosis. Thus, substances capable of interfering with serum ammonia levels can be used in their management, such as caffeine, which increases the activity of the urea cycle in the liver, leading to a greater degradation of ammonia. In addition, this substance exerts a hepatoprotective effect, by preventing the formation of hepatic fibrosis, and stimulates the central nervous system, by antagonizing the adenosine receptors. From this, the present study aims to evaluate the effects of caffeine on hepatic encephalopathy induced by an experimental model of secondary biliary cirrhosis by means of a common bile duct ligation associated with the administration of hyperproteic ration (76% soy protein). For this, 32 male Wistar rats divided equally into 4 groups (n = 8) were used. The experiment lasted 28 days, with administration of 50mg/kg/day of intragastric caffeine. Finally, to evaluate the effects of this substance, laboratory tests, histological analysis of the liver and brain, open field behavioral test and daily behavior records were performed. In animals treated with caffeine, fibrosis decreased in liver histology, decreased levels of ALT and AST transaminases in the bloodstream, improvement of signs characteristic of hepatic encephalopathy and reduction of brain histological changes. Thus, it was concluded that caffeine prevented the development of severe encephalopathy in association with its effects of hepatoprotection, stimulation of the central nervous system and increased ammonia degradation.

Keywords: Caffeine. Hepatic Cirrhosis. Hepatic encephalopathy.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	– Ausente
A.A.	– Astrócitos de Alzheimer
Alg.	– Alargamento
ALT	– Alanina Aminotransferase
Arquit.	– Arquitetural
Aspec.	– Aspecto
AST	– Aspartato Aminotransferase
ATP	– Adenosine Triphosphate
BD	– Bilirrubina Direta
BI	– Bilirrubina Indireta
BT	– Bilirrubina Total
CFA	– Cafeína
Co	– Grupo Controle
CO ₂	– Dióxido de Carbono
D	– Discreto
Des.	– Desarranjo
Espong.	– Espongiforme
G	– Ato de Autolimpeza
GABA	– Gamma-Aminobutyric Acid
HBV	– Hepatitis B Vírus
HCV	– Hepatitis C Vírus
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMC	– Índice de Massa Corporal
Lam.	– Laminar
LDBC	– Ligadura de Ducto Biliar Comum
M/A	– Moderado/Acentuado
MELD	– Model for End-Stage Liver Disease
NaCl	– Cloreto de Sódio
Nrf2	– Nuclear Factor Erythroid 2 - Related Factor 2
OMS	– Organização Mundial da Saúde
Prl.	– Proliferação
R	– Ato de Ficar em Pé Apoiado Sobre as Patas Traseiras
RNA	– Ribonucleic Acid
Rpm	– Rotações por Minuto
S	– Quadrantes Percorridos
SNC	– Sistema Nervoso Central
SO	– Sham-Operated/Simulação de Cirurgia
TCA	– Teste Comportamental de Campo Aberto
TGF- β	– Transforming Growth Factor Beta
UV	– Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	11
2.1	OBJETIVO GERAL.....	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	FÍGADO E CIRROSE HEPÁTICA.....	12
3.1.1	Cirrose Biliar Secundária	16
3.2	PAPEL DO FÍGADO NO METABOLISMO DA AMÔNIA.....	18
3.3	ENCEFALOPATIA HEPÁTICA.....	19
3.4	CAFEÍNA.....	23
3.4.1	Farmacocinética.....	24
3.4.2	Farmacodinâmica.....	25
3.4.3	Ação no Ciclo da Ureia.....	25
3.4.4	Cafeína e Doença Hepática Crônica.....	26
3.5	MODELO EXPERIMENTAL DE CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA.....	28
4	METODOLOGIA	30
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	30
4.2	ASPECTOS ÉTICOS.....	30
4.3	ANIMAIS.....	30
4.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	31
4.5	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	31
4.5.1	Protocolos Anestésicos e Analgésicos.....	31
4.5.2	Modelo Experimental de Cirrose Biliar Secundária.....	32
4.5.3	Modelo Experimental de Encefalopatia Hepática.....	33
4.5.4	Administração de Cafeína.....	34
4.5.5	Administração de Veículo.....	34
4.5.6	Acompanhamento Diário do Experimento.....	34
4.5.7	Teste Comportamental de Campo Aberto.....	34
4.5.8	Forma de Eutanásia e Obtenção das Amostras de Tecido e Sangue.....	35
4.5.9	Análises Laboratoriais.....	35
4.5.10	Avaliação Histológica.....	36

4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
5	RESULTADOS.....	37
5.1	AVALIAÇÃO DOS EXAMES LABORATORIAIS.....	37
5.2	AVALIAÇÃO DO TESTE DE CAMPO ABERTO.....	38
5.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA.....	39
5.3.1	Tecido Hepático.....	39
5.3.2	Tecido Nervoso.....	41
5.4	ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	42
5.4.1	Macroscopia dos Órgãos.....	42
5.4.2	Outras Alterações.....	44
6	DISCUSSÃO.....	47
7	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	ANEXO 1 - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA..	64

1 INTRODUÇÃO

As doenças hepáticas são de grande importância para a saúde pública, devido ao impacto socioeconômico que desencadeiam, visto que estão associadas a elevados custos com tratamentos, longos períodos de acompanhamento ambulatorial e internações hospitalares (GINÉS et al., 1987; GIANNOUSIS et al., 2010). No Brasil, ocorreram 853.571 admissões hospitalares devido a doença hepática entre os anos de 2001 e 2010, o que equivale a 0,72% de todas as admissões no país nesse período (NADER; DE MATTOS; BASTOS, 2014). Essas patologias acarretam alta morbidade e mortalidade em consequência da progressão para cirrose, estágio final comum das doenças hepáticas crônicas (D'AMICO; GARCIA-TSAO; PAGLIARO, 2006). Nos Estados Unidos, a cirrose causou aproximadamente 49.500 mortes, sendo, nesse país, a oitava principal causa de morte em 2010, e, segundo a OMS, a 18ª causa de morte no mundo (MURRAY, 2013; BLACHIER et al., 2013). Os pacientes com cirrose apresentam um número mais elevado de comorbidades e utilizam mais serviços de saúde, ou seja, maior número de hospitalizações, consultas médicas e cuidados de enfermagem em relação a pacientes não acometidos por essa injúria, acarretando em um custo anual de aproximadamente 4.700 dólares por pessoa, quase o dobro em relação aos indivíduos sem cirrose (RAKOSKI et al., 2012).

Há inúmeras causas de doença hepática, por inflamação hepática ou colestases, que podem acabar em cirrose, patologia definida como um processo difuso de formação nodular e fibrose após necrose de células hepáticas, sendo a via final comum das lesões hepáticas crônicas, independentemente do agente etiológico causador da lesão (SHERLOCK; DOOLEY, 2008). As causas mais comuns nos Estados Unidos são hepatite C, doença hepática alcoólica e doença hepática não alcoólica, que em conjunto representam aproximadamente 80% dos pacientes na lista de espera de transplante hepático entre 2004 e 2013 (WONG et al., 2015). Dados sobre as causas de doença hepática no Brasil são raros, a maioria dos estudos aponta o alcoolismo crônico como a etiologia mais comum, seguido das hepatites crônicas virais C e B (GONCALVES et al., 2013; DE CARVALHO et al., 2018).

Independentemente do agente causador, a cirrose pode ser assintomática na sua forma compensada. Entretanto, quando descompensada, a partir de sua

progressão e, conseqüente, incapacidade funcional do fígado, ocorre o desenvolvimento de uma ou mais complicações da insuficiência hepática, tais como ascite, hemorragia gastrointestinal, caquexia, infecções bacterianas e encefalopatia hepática, sendo esta uma das mais prevalentes (LEE; STRAVITZ; LARSON, 2011; AMARAPURKAR et al., 2015). Em pacientes com cirrose hepática, a encefalopatia hepática se faz presente em cerca de 30 a 45% dos casos e a encefalopatia hepática mínima em 80% destes indivíduos (BAJAJ, 2008; MORIWAKI et al., 2010; KHUNGAR; POORDAD, 2012).

A encefalopatia hepática é um distúrbio metabólico potencialmente reversível que consiste na desordem funcional do sistema nervoso central associada à insuficiência hepatocelular, decorrente de hepatopatias agudas ou crônicas, e à presença de shunts portossistêmicos, os quais podem ser espontâneos, cirúrgicos ou devido ao shunt transjugular intra-hepático portossistêmico. A amônia é o elemento principal relacionado à sua gênese, além da interferência de várias neurotoxinas e fatores diversos, como o edema cerebral, o tônus GABAérgico e microelementos como zinco e manganês (OLIVEIRA et al., 2007; BITTENCOURT et al., 2011). Como grande parte da amônia é metabolizada em ureia no fígado, se a função hepática estiver prejudicada, o nível sérico de amônia irá aumentar, tornando possível que essa substância atravesse a barreira hematoencefálica, sendo tóxica para o sistema nervoso central (VAQUERO et al., 2003; FAINT, 2006). A partir disso, subentende-se que substâncias que diminuem esta concentração podem ser utilizadas no manejo desta complicação, dentre elas, a CFA.

A CFA é um alcaloide farmacologicamente ativo pertencente ao grupo das metilxantinas (PALUSKA et al., 2003). Está presente em diversos tipos de alimentos, como chocolates, refrigerantes, chás, bebidas energéticas e café, sendo este último a principal fonte desta substância (CAMARGO et al., 1998; DE MARIA; MOREIRA, 2007). A ingestão da CFA pode causar tanto efeitos negativos como positivos, que dependem de cada organismo, da eventual existência de patologias (considerando que certas patologias podem ser agravadas pelo seu uso), da dose ingerida e da frequência de ingestão (SMITH, 2002; JAMES, 2004; DE MARIA; MOREIRA, 2007). Recentemente, a ingestão de café tem sido relacionada à redução do risco de ocorrência de várias doenças crônicas, como, por exemplo, diabetes mellitus tipo 2, doença de Parkinson, doenças inflamatórias e doenças hepáticas (ANDERSEN et al.,

2006; FRIEDMAN, 2008; HUXLEY et al., 2009; MODI et al., 2010). E, mais especificamente, quanto às doenças hepáticas, o consumo de CFA tem sido relacionado à diminuição dos níveis de enzimas hepáticas e menor risco de fibrose em pacientes portadores de hepatite C (RUHL; EVERHART, 2005; LA VECCHIA, 2005; KLATSKY et al., 2006; FRIEDMAN, 2008; MODI et al., 2010; LAI et al., 2013).

Essa substância, mais especificamente, aumenta o nível da atividade de diversas enzimas que atuam no ciclo da ureia, como a carbamil fosfato sintase 1, ornitina transcarbamilase, argininossuccinato sintase e argininossuccinato liase (FERRER, COSTELL; GRISOLÍA, 1982; JORDA et al., 1989). Todas essas enzimas atuam a favor do ciclo, ou seja, catalisam a reação de formação de ureia, aumentando, então, sua síntese e diminuindo a concentração sérica de amônia (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008; ALDRIDGE, TRANAH; SHAWCROSS, 2015). Além disso, a CFA tem como um de seus principais efeitos a estimulação do sistema nervoso central ao antagonizar os receptores de adenosina (RIBEIRO; SEBASTIÃO, 2010).

Sendo assim, o que se propõe com o presente estudo é a análise dos efeitos da CFA sobre o desenvolvimento da fibrose hepática a partir da cirrose biliar secundária, induzida por ligadura de ducto biliar comum, e correlacionar esses efeitos com a evolução da encefalopatia hepática, induzida a partir da associação com elevada ingestão proteica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos da Cafeína na lesão hepática, induzida pela ligadura de ducto biliar comum, e correlacionar a sua utilização com o desenvolvimento de encefalopatia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação da função hepática dos animais através das transaminases ALT e AST.
- Avaliação da integridade hepática e nervosa através da macro e microscopia.
- Avaliação do comportamento dos animais durante o experimento através de registros diários.
- Avaliação da atividade exploratória dos animais através do teste comportamental de campo aberto.
- Avaliar se a administração da CFA é fator de proteção atenuando o desenvolvimento de cirrose e encefalopatia hepáticas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FÍGADO E CIRROSE HEPÁTICA

O fígado, maior órgão do organismo humano, possui um peso aproximado de 1200 a 1500 gramas e é responsável por complexas funções vitais, muitas das quais não podem ser substituídas nem pelas terapêuticas mais modernas. Sendo assim, recebe duplo suprimento sanguíneo, 70% proveniente da veia porta, rico em nutrientes, e 30% da artéria hepática, rico em oxigênio. Esta propriedade permite ao órgão absorver as substâncias de todo o intestino e, de acordo com a necessidade, remover do sangue partículas exógenas (bactérias, endotoxinas e parasitas) e partículas endógenas (eritrócitos senescentes), através das células de Kupffer e do sistema retículo endotelial, os quais atuam como um importante filtro para a circulação (ROSEN; PIMENTEL, 2005).

Este grande órgão recebe cerca de 30% do débito cardíaco e é responsável por funções vitais sintéticas, metabólicas, secretórias e excretórias, as quais lhe permitem realizar mais de 1500 funções bioquímicas essenciais para a homeostase do organismo. Entre suas atividades destacam-se a síntese de proteínas plasmáticas (albumina, ferritina, transferrina e ceruloplasmina), a síntese de proteínas envolvidas na coagulação (fibrinogênio, fatores dependentes de vitamina K e proteínas C e S), a síntese de aminoácidos não essenciais, o metabolismo energético (carboidratos e ácidos graxos), a produção e secreção de bile, a degradação de resíduos orgânicos, e o armazenamento de ferro e vitaminas lipossolúveis (GONZÁLEZ-GALLEGO; ESTELLER, 1998; ROSEN; PIMENTEL, 2005).

A nível histológico, a estrutura hepática contém um constituinte epitelial, representado pelos hepatócitos, um revestimento endotelial, macrófagos teciduais, denominados células de Kupffer, e células estreladas perivasculares ou células de Ito. Na estrutura sinusoidal, o espaço subendotelial de Disse separa os hepatócitos do endotélio sinusoidal e contém matriz de baixa densidade. Essa matriz subendotelial possui um entrelaçado de matriz extracelular que providencia um suporte celular, impossibilitando o transporte de solutos e fatores de crescimento (FRIEDMAN et al., 2003).

Há três mecanismos patológicos principais que se associam formando a cirrose: morte de células, fibrose e regeneração. Todo o processo se inicia após ter ocorrido morte de células, de forma constante e persistente, ou seja, é necessária uma atuação longa do agente etiológico para a cirrose se estabelecer (MINCIS, 2002; SHERLOCK; DOOLEY, 2008).

Embora a fibrose hepática possa ser causada por variados estímulos, os mecanismos moleculares por trás dessa alteração histológica são muito semelhantes. Em seguida ao dano hepático se inicia uma cascata de alterações moleculares e celulares. Nessa cascata ocorre íntima interação entre fatores inflamatórios, monócitos/macrófagos e células estreladas, que ao final resulta em ativação dessas células e diferenciação em miofibroblastos secretores de colágeno, com consequente deposição de matriz extracelular e alterações consecutivas funcionais e anatômicas do fígado (KUMAR et al., 2015).

Dessa forma, em resumo, a cirrose é definida como um processo patológico difuso que apresenta fibrose, formação nodular, alteração da arquitetura lobular e vascular, e necrose hepatocelular em resposta à inflamação ou à agressão tóxica ao fígado. Inicialmente, devido ao mecanismo de dano e cicatrização do fígado, a fibrose pode se manifestar ao redor dos espaços porta ou da veia central, ou pode se depositar de forma direta no espaço de Disse. Durante todo o processo patológico, o órgão acaba sendo subdividido em nódulos de hepatócitos em regeneração, ou seja, proliferação de hepatócitos com espessamento dos cordões, desorganização da estrutura parenquimatosa e tecido cicatricial, que gera consequências prolongadas e progressivas sobre o fluxo sanguíneo e a perfusão dos hepatócitos. Dessa forma, a avaliação da fibrose é essencial para a determinação do prognóstico da doença hepática, da avaliação da necessidade de medidas terapêuticas específicas e para a detecção de doença hepática grave, visto que muitas doenças hepáticas crônicas são assintomáticas ou possuem pouca expressão clínica (THAMPANITCHAWONG; PIRATVISUTH, 1999; FRIEDMAN et al., 2003; RUBIN et al., 2006; KUMAR et al., 2015).

Essa forma de hepatopatia, quando em estágio terminal, é definida por três características: fibrose presente em faixas delicadas ou largas cicatrizes, arquitetura parenquimatosa difusamente alterada por cicatrizes fibrosas e entrelaçadas e os nódulos parenquimatosos criados pela regeneração dos hepatócitos, podendo variar

de micronódulos para macronódulos. Além disso, se faz necessário atentar principalmente para as seguintes características: a lesão parenquimatosa e a fibrose subsequente são difusas, ou seja, lesões localizadas com cicatrização não constituem cirrose; a nodularidade é um pré-requisito para diagnóstico e reflete equilíbrio entre regeneração e fibrose constrictiva; a fibrose uma vez instalada, em geral, é irreversível; e a arquitetura vascular é reorganizada pelo dano parenquimatoso e cicatrização, com a formação de interconexões anormais (KUMAR et al., 2015).

A cirrose é considerada um estágio final e irreversível de diversos processos patológicos crônicos e apresenta uma série de etiologias, sendo as mais comuns a doença hepática alcoólica e a hepatite C (IIDA et al., 2005; POFFO et al., 2009). Porém, vale salientar que com o crescente aumento da prevalência de obesidade a nível mundial, outra etiologia em destaque, é a doença hepática gordurosa não alcoólica. E, além dessas causas, há também cirrose decorrente de hepatite B, hepatite D, cirrose biliar secundária, doenças autoimunes (cirrose biliar primária, hepatite autoimune, colangite esclerosante primária), hepatotoxicidade por drogas, distúrbios metabólicos (hemocromatose, deficiência de alfa1-antitripsina, doença de Wilson) e causas vasculares (Budd-Chiari). Existem, ainda, casos em que não se identifica o fator causador, sendo nomeada como cirrose criptogênica (MUZZILLO; CORTEZ-PINTO, 2005).

A classificação da cirrose pode ser realizada de diversas formas, porém as classificações evidenciadas são de acordo com a etiologia, presença ou não de complicações e estágio da doença. Sendo utilizados os critérios da classificação de Child-Turcotte-Pugh (CHILD; TURCOTTE, 1964; PUGH et al., 1973) ou de MELD (MALINCHOC et al., 2000; KAMATH et al., 2001).

A grande parte dos pacientes com cirrose hepática se apresenta assintomático ou com sintomas inespecíficos (como fadiga crônica, anorexia e perda de peso), possui uma evolução insidiosa e tem seu diagnóstico determinado através de exames laboratoriais e de imagem, o que dificulta o diagnóstico precoce e o estabelecimento da prevalência exata da doença (IIDA et al., 2005; POFFO et al., 2009). Entretanto, quando o paciente está vivenciando um quadro de cirrose descompensada, identifica-se sinais e sintomas de insuficiência hepatocelular e hipertensão portal que são, portanto, mais específicos. A insuficiência hepatocelular pode ser devido à destruição hepática maciça (hepatite fulminante) ou, na maioria das

vezes, conseqüente a uma agressão crônica e progressiva às células, como ocorre na cirrose hepática. Como a reserva funcional do fígado é bastante ampla, a falência hepática só ocorre quando há comprometimento superior a 80-90% da sua capacidade funcional, e as conseqüências clínicas disso são identificadas pela presença de ascite, esplenomegalia, circulação colateral, varizes esofagogástricas, edema de membros inferiores, desnutrição, caquexia, baqueteamento digital, icterícia, encefalopatia, entre muitas outras alterações que geram altos índices de morbidade e mortalidade. A maioria das mortes por cirrose ocorre por insuficiência hepatocelular, complicações decorrentes da hipertensão portal ou desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (IIDA et al., 2005).

A respeito dos exames laboratoriais, os achados mais frequentes em pacientes com cirrose hepática avançada são plaquetopenia, anemia (multifatorial) e alterações da função hepática, principalmente hipoalbuminemia, aumento do tempo de protrombina e hiperbilirrubinemia. A ultrassonografia é o exame de imagem realizado rotineiramente para diagnóstico da cirrose, com o qual podem ser identificadas alterações do volume do fígado, normalmente hipotrofia do lobo direito e aumento dos lobos esquerdo e caudado, além de mudanças na textura, nodulações do parênquima, ascite e sinais de hipertensão portal (aumento da veia porta, dilatação da veia esplênica e esplenomegalia). A elastografia transitória por ultrassom (FibroScan) e a elastografia por ressonância magnética se destacam por serem os exames de imagem de maior potencial para estratificação da fibrose. Entretanto, a biópsia hepática ainda é considerada o método padrão-ouro para diagnóstico de cirrose e pode auxiliar na elucidação da etiologia da doença, porém só deve ser realizada em casos selecionados devido ao risco de complicações. No exame histopatológico, podem ser identificados padrão micro ou macronodular, septos fibrosos e alterações da arquitetura lobular, bem como anormalidades na relação entre a veia porta e a veia centro-lobular (MUZZILLO; CORTEZ-PINTO, 2005; COBBOLD; MORIN; TAYLOR-ROBINSON, 2007).

O tratamento da cirrose consiste em cuidados gerais, tratamento da etiologia, quando possível, e tratamento das complicações. O paciente deve receber, independente da causa, orientações nutricionais, assegurando uma dieta adequada que contenha 35-40 kcal e 1,2-1,5 g de proteínas/kg de peso por dia. As dietas hipoproteicas, com o objetivo de evitar a encefalopatia hepática, não têm eficácia e

podem causar efeito contrário e piorar a desnutrição, pois causam aumento do catabolismo e, portanto, devem ser proscritas (MUZZILLO; CORTEZ-PINTO, 2005; FERREIRA et al., 2009). Todos os pacientes com hepatopatia crônica devem ser submetidos à vacinação contra pneumococo, influenza, hepatite A e B. Além disso, devem ser orientados a evitar o uso de álcool, drogas e medicamentos que tenham potencial de hepatotoxicidade. É importante o rastreamento do hepatocarcinoma com a realização a cada 6 meses de ultrassonografia de rotina e dosagem de alfa-fetoproteína (controverso). Pacientes que estejam com um quadro de descompensação devem ser encaminhados para transplante hepático, uma vez que este é o tratamento definitivo da cirrose hepática (MUZZILLO; CORTEZ-PINTO, 2005; SKAGEN; LUCEY; SAID, 2009).

3.1.1 Cirrose biliar secundária

A cirrose biliar secundária é uma complicação crônica e difusa do fígado devido à obstrução, mais comumente total, benigna e prolongada, das vias biliares, com alterações da estrutura e função, seja intra ou extra-hepáticas. A causa pode estar, após determinado período, associada a qualquer processo de obstrução da árvore biliar, como, por exemplo, cálculos, tumores, estenoses, compressões extrínsecas etc. (MINCIS, 2002).

Funcionalmente, a colestase se caracteriza pelo fluxo biliar diminuído ao longo do canalículo e secreção reduzida de água, bilirrubina e ácidos biliares pelo hepatócito. O diagnóstico clínico baseia-se no acúmulo de substâncias no sangue, as quais são, normalmente, transferidas para a bile, como a bilirrubina, o colesterol e os ácidos biliares; e na presença de atividade elevada de determinadas enzimas no sangue, principalmente a fosfatase alcalina (SILVA; D'ALBUQUERQUE, 1986; RUBIN et al., 2006).

A secreção de bile no canalículo e sua passagem pelo sistema coletor biliar dependem de vários fatores como características estruturais e funcionais das microvilosidades canaliculares, permeabilidade da membrana plasmática canalicular,

sistema contrátil intracelular que circunda o canalículo (microfilamentos, microtúbulos) e interação de ácidos biliares com o aparelho secretor (RUBIN et al., 2006).

A obstrução crônica da via biliar extra-hepática resulta em estase biliar, áreas focais de necrose centrolobular e periportal, proliferação e dilatação dos ductos biliares, colangite estéril ou infecciosa com infiltração de polimorfonucleares, e edema e fibrose dos espaços porta. O dano hepático colestático é característica da cirrose biliar secundária e é determinado através de parâmetros histopatológicos e bioquímicos bem definidos. Nesses casos, quando ocorre uma obstrução de longa duração, a principal causa de dano hepático é o acúmulo de ácidos biliares tóxicos, ocorrendo o estabelecimento de necrose e, conseqüentemente, de fibrose hepática. Os ácidos biliares são citotóxicos devido a diversos mecanismos, incluindo as suas propriedades detergentes, a alteração da homeostase do cálcio intracelular, a depleção de ATP e o dano mitocondrial (ABDEL-AZIZ et al., 1990; PAROLA et al., 1996; PASTOR et al., 1997; ORELLANA et al., 2000).

Quanto às características anatomopatológicas, a colestase tanto intra quanto extra-hepática é caracterizada pela presença inicial de pigmento biliar visível na zona centrolobular, no interior dos canalículos dilatados e nos hepatócitos. Essa injúria apresenta-se, na primeira fase, como cirrose portal e de aspecto micronodular, podendo, com a progressão do comprometimento hepático, ser indistinguível da de outros tipos de cirrose (MAJETHIA; PATIL; KALGUTKAR, 2016). Além disso, quando a colestase persiste, desenvolvem-se anormalidades morfológicas secundárias, o pigmento passa a acometer a periferia do lóbulo e há hepatócitos necróticos dispersos, que refletem o efeito tóxico da bile em excesso. Nestes casos prolongados, geralmente consequência da obstrução biliar extra-hepática, ocorre a manifestação de características histopatológicas que pertencem à tríade denominada degeneração plumosa, a qual é representada por grupos de hepatócitos que manifestam degeneração hidrópica, impregnação difusa de pigmento biliar e aspecto reticulado. A necrose dessas células somada ao acúmulo de bile extravasada resulta em uma concentração com coloração amarelo-dourada de pigmento extracelular e resíduos, chamada infarto biliar ou lago biliar (MINCIS, 2002; RUBIN et al., 2006).

3.2 PAPEL DO FÍGADO NO METABOLISMO DA AMÔNIA

A quantidade de proteínas necessária para suprir a necessidade corpórea de nitrogênio é de 100 gramas/dia. Essa ingesta proteica, em sua maioria, é metabolizada no fígado e o excesso é convertido em formas não tóxicas que são excretadas. Esse processo ocorre através de reações enzimáticas estratificadas em hepatócitos periportais e perivenosos (BITTENCOURT et al., 2011).

Aproximadamente 57% do nitrogênio que chega ao fígado é transformado em ureia, 23% secretado como aminoácidos livres, 14% é usado para a síntese de proteína estrutural hepática e 6% é utilizado para a síntese de proteínas séricas (MORAES, 1987).

Os hepatócitos periportais possuem enzimas que fazem parte do ciclo da ureia, em que a amônia é convertida em ureia, resultado do metabolismo do nitrogênio. Para cada molécula de ureia sintetizada são utilizados dois grupos amino, um proveniente da amônia e outro do aspartato, e três moléculas de ATP, sendo um ciclo dependente de gasto energético (HÄUSSINGER, 1983).

A presença de glutaminase ativada pelo fosfato nestes hepatócitos, agindo na produção de glutamato intramitocondrial, provoca a síntese de enzimas que agem na regulação do ciclo da ureia. Sendo assim, amônia e glutamina, provenientes da veia porta, são os principais substratos para a síntese de ureia por meio do ciclo de Krebs (HÄUSSINGER, 1983; NELSON; LEHNINGER; COX, 2008).

O ciclo da ureia é composto por cinco passos enzimáticos, sendo que os dois primeiros acontecem no interior da mitocôndria e os últimos três no citoplasma celular. No primeiro passo do ciclo, a amônia, catalisada pela enzima carbamil fosfato sintetase 1, se une ao CO₂, originando carbamil fosfato, após gasto energético de duas moléculas de ATP. No segundo passo, a ornitina, presente na matriz mitocondrial, recebe um grupo carbamil, proveniente do carbamil fosfato, e forma a citrulina por uma reação catalisada pela enzima ornitina transcarbamilase. Na fase seguinte, a citrulina passa para o citosol e um segundo grupo amino, proveniente do aspartato, é adicionado, originando o argininossuccinato, por intermédio da enzima argininossuccinato sintetase e com gasto energético de uma molécula de ATP. No

quarto passo, o argininossuccinato é degradado em arginina e fumarato pela argininossuccinato liase. Por fim, no último e quinto passo, a enzima arginase tipo 1 hidrolisa a arginina em ornitina e ureia. A ornitina formada é transportada para a mitocôndria e reinicia o ciclo, enquanto que a ureia é liberada no sangue para posterior excreção através dos rins (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008).

Há menos hepatócitos perivenosos que os periportais e, estes, não possuem o mesmo conteúdo enzimático. Entretanto, a grande quantidade de glutamino-sintetase presente nesses hepatócitos permite que eles convertam a amônia em glutamina. Assim, a amônia que não é detoxificada nos hepatócitos periportais pode passar por esse processo nos perivenosos. Como nestes hepatócitos há tanto glutaminase ativada pelo fosfato como glutamino-sintetase, eles têm função regulatória de controlar os níveis de amônia circulante. Deste modo, em fígados normais, mesmo no período pós-absortivo, não ocorre hiperamonemia na presença de fluxo hepático adequado (HÄUSSINGER, 1983).

A diminuição da atividade metabólica em hepatócitos periportais e perivenulares é característica dos processos de dano hepatocelular e reduz a capacidade de detoxificação da amônia, apesar de ocorrer apenas em fase tardia. Então, os níveis de amônia arterial no período pós-absortivo encontram-se discretamente elevados na cirrose (40 a 60 $\mu\text{mol/L}$), aumentados nos casos de lesão aguda em fígado crônico (70 a 90 $\mu\text{mol/L}$) e ainda mais na falência hepática aguda (200 a 240 $\mu\text{mol/L}$). Em contrapartida, no sangue venoso os níveis de amônia não possuem relação direta com o grau de encefalopatia hepática, ou seja, são de valor diagnóstico muito restrito (HÄUSSINGER, 1983; CLEMMESSEN et al., 1999).

3.3 ENCEFALOPATIA HEPÁTICA

A encefalopatia hepática é um distúrbio metabólico, com possibilidade de reversão, que consiste na alteração da funcionalidade do sistema nervoso central associada à insuficiência hepatocelular, decorrente de hepatopatias agudas ou crônicas; e à presença de shunts portossistêmicos, os quais podem ser espontâneos, cirúrgicos ou devido ao shunt transjugular intra-hepático portossistêmico. A amônia é

o elemento principal relacionado à sua gênese, além da interferência de várias neurotoxinas e diversos fatores, como edema cerebral, tônus GABAérgico, zinco e manganês (OLIVEIRA et al., 2007; BITTENCOURT et al., 2011).

Em pacientes com cirrose hepática, a encefalopatia hepática se faz presente em cerca de 30 a 45% dos casos e a encefalopatia hepática mínima em 80% desses indivíduos (BAJAJ, 2008; MORIWAKI et al., 2010; KHUNGAR; POORDAD, 2012). Na presença de doença hepática, o desenvolvimento de encefalopatia anuncia uma descompensação do quadro, condição esta que apresenta alta mortalidade, indicando então a necessidade de transplante hepático (HIRODE; VITTINGHOFF; WONG, 2019). Além disso, a encefalopatia é a causa mais comum, possivelmente reversível, de readmissão hospitalar, contribuindo para um aumento significativo do custo para o sistema de saúde (HIRODE; VITTINGHOFF; WONG, 2019).

De acordo com a teoria mais atual sobre a fisiopatogenia da encefalopatia hepática, a amônia e outros fatores desencadeantes, resultantes da não metabolização hepática de substâncias nitrogenadas geralmente advindas do intestino, promovem aumento do edema cerebral, estresse oxidativo e estresse nitrosativo, alterando, dessa forma, expressões gênicas, de proteínas e RNA, que levam à disfunção astrocítica e neuronal. Sendo assim, ocorre alteração da rede oscilatória sináptica, produzindo sinais e sintomas característicos, os quais são representados por um grande espectro de mudanças no estado de consciência, como distúrbios da atenção, alterações do sono e distúrbios motores, que progridem desde simples letargia a estupor, coma ou morte; e por alterações neurológicas flutuantes, como mudanças eletroencefalográficas inespecíficas, rigidez e hiperreflexia dos membros, tremor adejante das mãos, denominado asterixe ou flapping, reflexos hiperativos nos estágios iniciais e postura de descerebração nos estágios terminais (RUBIN et al., 2006; HÄUSSINGER; SCHLISS, 2008; KUMAR et al., 2015).

Na maioria dos casos ocorrem alterações anatomopatológicas no cérebro, como edema, reação astrocítica caracterizada pelos astrócitos de Alzheimer tipo 2, os quais são astrócitos modificados que se encontram em maior número e apresentam tumefação, núcleo aumentado e inclusões nucleares; e, além disso, camadas profundas do córtex cerebral e da substância branca subcortical, núcleos basais e cerebelo com necrose laminar e aspecto esponjiforme (RUBIN et al., 2006; KUMAR et al., 2015).

Essa complicação neuropsiquiátrica evolui com base nos seguintes estágios: estágio 1, caracterizado por distúrbios do sono, irritabilidade e alterações da personalidade; estágio 2, caracterizado por letargia e desorientação; estágio 3, caracterizado por sonolência profunda; e estágio 4, caracterizado pelo coma. Essa sequência pode ocorrer durante um período de muitos meses ou evoluir durante alguns dias nos casos de insuficiência hepática fulminante. Apesar das medidas de suporte intensivas poderem constituir uma terapia adequada nos estágios iniciais, os pacientes em estágios 3 e 4 em geral são salvos apenas por transplante de fígado (RUBIN et al., 2006).

A encefalopatia hepática é classificada de acordo com o grau de comprometimento da função hepática, duração, características do distúrbio neurológico ou pela presença de fatores desencadeantes. Várias terminologias já foram empregadas para descrever as manifestações clínicas da encefalopatia hepática, e, dentre elas, tem-se a nomenclatura estabelecida no 11º Congresso Mundial de Gastroenterologia, realizado em Viena no ano de 1998, que classificou esta complicação em tipos A, B e C de acordo com as diferentes formas de acometimento hepático. O tipo A refere-se à associação com a falência hepática aguda, o tipo B é devido a shunts portossistêmicos não associados à insuficiência hepatocelular, e o tipo C é a encefalopatia associada à cirrose e hipertensão portal. A encefalopatia associada à cirrose (tipo C) pode se apresentar de diversas formas clínicas: encefalopatia hepática esporádica (precipitada, espontânea e recorrente), encefalopatia hepática persistente (leve, grave, tratamento-dependente) e encefalopatia hepática mínima, caracterizada por manifestações pré-clínicas (FERENCI et al., 2002; BITTENCOURT et al., 2011).

Entretanto, recomenda-se que o diagnóstico e a análise do grau da encefalopatia hepática em pacientes com cirrose sejam baseados na história clínica, exclusão de outras causas, como, por exemplo, distúrbios metabólicos (uremia), doenças infecciosas, processos expansivos do sistema nervoso central (hematomas, neoplasias), distúrbios psiquiátricos e alterações de comportamento, principalmente abstinência alcoólica; e emprego dos critérios de West Haven (Tabela 1) e/ou escala de Coma de Glasgow, na qual a melhor resposta a estímulos verbais e à dor determina um escore que se correlaciona com a gravidade do processo, sendo a encefalopatia grave definida por um escore menor que 12. Outros métodos complementares, como,

por exemplo, testes psicométricos e investigações eletrofisiológicas, são úteis também para o diagnóstico de encefalopatia hepática mínima (BITTENCOURT et al., 2011).

TABELA 1 – CRITÉRIOS DE WEST-HAVEN

Estágio	Consciência	Intelecto e Comportamento	Achados Neurológicos
0	Normal	Normal	Exame normal; testes psicomotores prejudicados
1	Leve perda de atenção	Redução na Atenção; Adição e Subtração prejudicadas	Tremor ou flapping leve
2	Letárgico	Desorientado; Comportamento Inadequado	Flapping evidente; fala arrastada
3	Sonolento, mas responsivo	Desorientação severa; comportamento bizarro	Rigidez muscular e clonus; hiperreflexia
4	Coma	Coma	Postura de descerebração

Fonte: Bittencourt et al (2011).

Métodos de ressonância magnética mostram que na encefalopatia hepática do paciente com cirrose ocorre, inicialmente, edema cerebral ainda na fase de encefalopatia hepática mínima e aumenta na continuidade do processo. Este edema, exacerbado pela amônia e pela indução de estresse oxidativo e nitrosativo, pode reverter nos casos de tratamento eficaz ou após transplante hepático, e em grau leve, mesmo quando assintomático, pode ser um gatilho para alterações astrocíticas e disfunção neuronal. Além disso, o aumento de citocinas inflamatórias, o uso de benzodiazepínicos e distúrbios hidroeletrólíticos também podem contribuir para o edema cerebral (CÓRDOBA et al., 2001; SHAH et al., 2008).

A encefalopatia hepática episódica habitualmente está associada ao surgimento de fatores precipitantes e, dentre estes fatores, os mais importantes e mais difíceis de controlar são a hemorragia digestiva alta e as infecções bacterianas. Além destes, outras possíveis causas são alterações hidroeletrólíticas, como uma simples desidratação, procedimentos cirúrgicos, sobrecarga proteica e obstipação intestinal. Sendo assim, a busca ativa destes fatores é tarefa prioritária, devendo ser iniciada nos primeiros sinais de encefalopatia. Frequentemente, o controle efetivo do fator

precipitante é suficiente para reverter o curso da complicação, porém deve ser iniciado precocemente (BITTENCOURT et al., 2011).

Quanto aos fármacos, em casos como este, tanto em fases iniciais como durante a progressão, a eficácia do uso de dissacarídeos não absorvíveis é discutível. Estes medicamentos atuam reduzindo a concentração de substratos amonigênicos no lúmen colônico de duas formas: diminuindo o pH colônico com produção de ácidos orgânicos pela fermentação das bactérias, e pelo mecanismo catártico osmótico. Porém, embora a literatura seja abundante em relação a estas drogas, as quais são utilizadas há muito tempo, a maioria dos estudos avaliando a segurança e a eficácia destas substâncias não são suficientemente elaborados, têm pequeno número de pacientes e não são conclusivos. Então, existem poucas evidências da sua eficácia, apesar da experiência clínica mundial coloca-los na primeira linha de tratamento (ALS-NIELSEN; GLUUD; GLUUD, 2004; OLIVEIRA et al., 2007; BITTENCOURT et al., 2011).

Em relação aos antibióticos pouco absorvíveis, podem ser empregados o sulfato de neomicina e o metronidazol, os quais atuam diminuindo a produção intestinal de amônia pelas bactérias, porém, em metanálises comparativas, não evidenciaram superioridade em comparação com os dissacarídeos. Além disso, deve-se ressaltar eventual ototoxicidade ou nefrotoxicidade para a neomicina e neuropatia periférica para o metronidazol (BITTENCOURT et al., 2011).

Outra opção medicamentosa é o aspartato de ornitina, que atua aumentando a capacidade hepática de detoxificação da amônia. Este medicamento foi o foco de estudos científicos e metanálises que sugeriram efetividade em reduzir a concentração de amônia circulante e melhorar a encefalopatia hepática manifesta, porém poucos trabalhos de alta qualidade foram produzidos (BITTENCOURT et al., 2011).

3.4 CAFEÍNA

A CFA é um alcaloide farmacologicamente ativo pertencente ao grupo das metilxantinas (PALUSKA et al., 2003). Está presente em diversos tipos de alimentos,

como chocolates, refrigerantes, chás, bebidas energéticas e no café, sendo este último a principal fonte dessa substância (CAMARGO et al., 1998; DE MARIA; MOREIRA, 2007).

O consumo de café no Brasil é um dos mais elevados do mundo, sendo o consumo per capita de 4,94 kg/habitante/ano. Além disso, de acordo com uma pesquisa do IBGE, o café é consumido diariamente por 78% da população acima de 10 anos de idade (ABIC, 2012). Porém, para efeitos de estudo, a estimativa da dose ingerida de CFA requer o conhecimento de suas quantidades nas diferentes fontes, como por exemplo alimentos e medicamentos, o que torna difícil quantificar o seu consumo (CAMARGO et al., 1998).

A sua ingestão pode causar tanto consequências negativas como positivas, que dependem de cada organismo, da eventual existência de patologias (considerando que certas patologias podem ser agravadas pelo seu uso), da dose ingerida e da frequência de ingestão (SMITH, 2002; JAMES, 2004; DE MARIA; MOREIRA, 2007).

3.4.1 Farmacocinética

A CFA é uma substância lipossolúvel, é absorvida pelo trato intestinal de forma rápida e completa, e apresenta uma biodisponibilidade de 100%. O tempo para se alcançar uma concentração plasmática máxima é de 30-120 minutos, podendo ser maior se acompanhada pela ingestão de alimentos (PALUSKA et al., 2003).

Tem uma meia vida de 4-6 horas (PAN; KASTIN, 2016) e se distribui pelo corpo com uma concentração de 0,6-0,7 L/kg. Atravessa a barreira hematoencefálica e a barreira placentária, e pode ser encontrada no leite materno, saliva, bile e sêmen. A fração de CFA unida a proteínas plasmáticas, sobretudo a albumina, varia entre 10-35%, podendo ser reduzida em idosos (LOZANO et al., 2007).

A isoenzima CYP1A2 do citocromo P-450 do fígado, metaboliza por desmetilação a maioria da CFA (95%), transformando-a em paraxantina (85%), teobromina (10%) e teofilina (5%). Uma pequena porção é também metabolizada pelas enzimas CYP2E1 e CYP3A3. Apenas 1-2% da dose ingerida de CFA será

excretada diretamente pelos rins (LOZANO et al., 2007). A meia vida é de 4-6 horas em adultos (AUGELLO, 2002), e a sua dose letal em humanos é 10 g/pessoa, podendo já ser fatal acima de 6,5 g (JORDA et al., 1989).

3.4.2 Farmacodinâmica

A CFA, ao atravessar a barreira hematoencefálica, tem diversos efeitos neuronais, tendo como principal ação a inibição dos receptores de adenosina, portanto, agindo como estimulante do sistema nervoso central (RIBEIRO; SEBASTIÃO, 2010). Além disso, essa substância também tem efeitos agonistas sobre medicamentos analgésicos, como o tramadol e a morfina (DÍAZ-REVAL et al., 2010; HABIBI et al., 2011), e, quando consumida em doses baixas (2-10mg/Kg), provoca alterações brandas, como leve taquicardia, alívio da fadiga, taquipneia, aumento do metabolismo e diurese. Em doses mais altas, pode causar nervosismo, insônia, tremores e desidratação (CONLEE, 1991).

A CFA é comumente utilizada por esportistas com a finalidade de melhoria no desempenho físico devido a sua ação no sistema nervoso central, aumentando a propagação de sinais entre o cérebro e a junção neuromuscular, agindo diretamente nos músculos alterando o gradiente iônico, aumentando a oxidação de gorduras, reduzindo a oxidação de carboidratos, e induzindo a liberação dos neurotransmissores dopamina e glutamato principalmente no Núcleo Accumbens (SPRIET, 1995; NAWROT et al., 2003; BLACK et al., 2015). Ademais, de forma geral, possui propriedades antioxidantes que reduzem a incidência de câncer, diabetes e doenças hepáticas, além de possivelmente exercer efeito benéfico em casos de doença de Parkinson (PAN; KASTIN, 2016).

3.4.3 Ação no ciclo da ureia

A CFA aumenta o nível de atividade de diversas enzimas que atuam no ciclo da ureia, como a carbamil fosfato sintase 1, ornitina transcarbamilase,

argininossuccinato sintase e argininossuccinato liase (FERRER, COSTELL; GRISOLÍA, 1982; JORDA et al., 1989). Dessas enzimas, as mais diretamente envolvidas no controle do ciclo são a carbamil fosfato sintase 1 e a argininossuccinato sintase, pois fazem a ligação da amônia com o CO₂ e a citrulina, respectivamente (MEIJER; HENSGENS, 1982; NELSON; LEHNINGER; COX, 2008). A atividade do N-acetilglutamato, cofator natural da carbamil fosfato sintase 1, também é estimulada pela ingestão de CFA (JORDA et al., 1989). Todas estas enzimas atuam a favor do ciclo, ou seja, catalisam a reação de formação de ureia, aumentando então sua síntese e diminuindo a concentração sérica de amônia, que é um dos fatores que podem levar ao desenvolvimento de encefalopatia hepática (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008; ALDRIDGE, TRANAH; SHAWCROSS, 2015).

3.4.4 Cafeína e doença hepática crônica

Recentemente, a ingestão de café tem sido relacionada à redução do risco de ocorrência de várias doenças crônicas, como, por exemplo, diabetes mellitus tipo 2, doença de Parkinson, doenças inflamatórias e doenças hepáticas (ANDERSEN et al., 2006; FRIEDMAN, 2008; HUXLEY et al., 2009; MODI et al., 2010). E, mais especificamente, quanto às doenças hepáticas, o consumo de CFA tem sido relacionado à diminuição dos níveis de enzimas hepáticas e menor risco de fibrose em pacientes portadores de hepatite C (RUHL; EVERHART, 2005; LA VECCHIA, 2005; KLATSKY et al., 2006; FRIEDMAN, 2008; MODI et al., 2010; LAI et al., 2013).

Em um estudo dos Estados Unidos, no qual 5.944 adultos portadores de hepatite B e hepatite C foram avaliados durante seis anos, demonstrou-se que o aumento da atividade de ALT está associada com o baixo consumo de CFA (RUHL; EVERHART, 2005). Da mesma forma, já foi descrito na literatura que indivíduos com hepatite C e fibrose avançada ou cirrose possuem uma associação inversa significativa entre o consumo regular de café e a progressão da doença hepática (FREEDMAN et al., 2009). Além disso, a ingestão de café também pode agir reduzindo a inflamação, já que a resposta inflamatória à lesão hepática é decorrente de fibrose hepática e cirrose hepática (FRIEDMAN, 2008).

Modi et al (2010) avaliou o papel protetor da CFA sobre a fibrose e, depois de controlar outros fatores conhecidos que interferem (idade, raça, sexo, IMC e consumo de álcool), o aparente efeito protetor da CFA persistiu. De acordo com a redução da fibrose hepática na biópsia, os pacientes com maior consumo de CFA também apresentaram menores valores médios de ALT, AST, bilirrubinas e aumento dos níveis de albumina. Juntos, estes dados sugerem que o maior consumo de CFA está associado com a fibrose hepática menos avançada, e que o efeito benéfico requer o consumo de CFA acima de um limite próximo a cerca de 2 xícaras de café por dia (≥ 222 mg/dia) (MODI et al., 2010).

Miofibroblastos hepáticos, advindos das células estreladas e de fibroblastos portais, são as principais células envolvidas na formação de fibrose hepática (KARIN et al., 2016). Estas células expressam receptores de adenosina, que, quando ativados, geralmente por injúrias hepáticas, estimulam a formação de fibrose pelo miofibroblasto. A CFA é um antagonista dos receptores de adenosina, ou seja, impede a sua ativação e conseqüentemente diminui a formação de tecido fibrótico (DRANOFF et al., 2014). A TGF- β é a principal citocina regulatória do fígado e uma de suas funções é ativar as células estreladas do fígado estimulando a formação de fibrose, portanto, níveis de TGF- β encontram-se aumentados em modelos experimentais de cirrose, mas quando há administração de CFA, os níveis de TGF- β mostram-se menores. Ou seja, há uma menor ativação das células estreladas devido a um down-regulation dessa citocina (DOOLEY; TEN DIJKE, 2012; SHIM et al., 2013; ARAUZ et al., 2014).

Ademais, estudos in vitro referem que a CFA também impede a ativação das células estreladas do fígado ao inibir o fator de transcrição Snail-1, que é fundamental na ativação dessas células (MURIEL; ARAUZ, 2010; GORDILLO-BASTIDAS et al., 2013), e ativa a enzima Nrf2, a qual regula a expressão de proteínas antioxidantes. Dessa forma, ela age diminuindo o estresse oxidativo, que é um dos causadores da fibrose hepática (GORDILLO-BASTIDAS et al., 2013).

3.5 MODELO EXPERIMENTAL DE CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA

A disponibilidade de modelos animais é fundamental para o estudo das doenças humanas, principalmente para aquelas com um componente metabólico e/ou não hereditário, como por exemplo a cirrose hepática. Conseqüentemente, a compreensão atual dos mecanismos relacionados à cirrose hepática e à fisiopatologia das complicações associadas é, em grande parte, baseada em modelos experimentais de doença hepática (GINÈS et al., 2005).

As opções atuais são muitas e a escolha do método deve se basear principalmente nas condições de realização do trabalho. Apesar da grande quantidade de modelos experimentais que induzem doença hepática, a ligadura de ducto biliar comum tem se mostrado um método versátil, viável e com boa reprodutibilidade, devido ao seu baixo custo e mortalidade se comparados a outros métodos de indução (TAG et al., 2015).

Este modelo provoca nítida proliferação de ductos e canalículos biliares pela estase biliar, áreas focais de necrose centro-lobular, necrose periportal, colangite estéril ou infecciosa com infiltração de polimorfonucleares, edema e fibrose dos espaços porta, levando, dessa forma, a alterações sistêmicas. Além disso, devido a lesão hepatocelular, não ocorre a correta filtração do sangue, promovendo o desenvolvimento de “shunts” portossistêmicos e grande diminuição da capacidade fagocitária do fígado, permitindo a entrada de bactérias e endotoxinas na circulação (FALLON, et al., 1997).

A obstrução prolongada do ducto biliar em ratos induz cirrose biliar secundária e, conseqüentemente, fibrose, sendo estabelecidas as características próprias da patologia em torno de vinte e oito dias. Nesse período, a obstrução provoca dilatação do ducto biliar, edema, reações inflamatórias agudas pelo refluxo biliar e aparecimento de fibrose periportal devido a alterações na síntese e degradação de proteínas matriciais como o colágeno, as glicoproteínas e os proteoglicanos, causando uma desorganização da arquitetura natural do parênquima (KOUNTOURAS, BILLING, SCHEUER, 1984; PASTOR et al., 1997; PERES et al., 2000; REZAEI et al., 2008). Ademais, na vigência desse modelo experimental, observa-se hepatomegalia e

esplenomegalia, que acontecem principalmente por aumento do tecido conjuntivo, assim como do epitélio biliar (YAARI et al., 1992).

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo possui caráter experimental qualitativo-quantitativo, a partir do qual foi realizada a indução de cirrose biliar secundária por meio da LDBC, a SO nos grupos controles, e, por fim, a indução de encefalopatia hepática ao associar a LDBC com ração hiperproteica.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná (FEMPAR). Os procedimentos foram realizados de acordo com os critérios do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, preconizado pela National Academy of Sciences e publicada pela National Institutes of Health.

4.3 ANIMAIS

Foram utilizados 32 ratos machos da linhagem Wistar, espécie *Rattus norvegicus*, com peso entre 200 e 350 gramas, obtidos por intermédio Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil). Os animais foram mantidos durante todo o experimento no biotério do Instituto de Pesquisas Médicas (Curitiba, Brasil) em caixas plásticas, de 47x34x18 cm, forradas com maravalha, em ciclo de doze horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas) e temperatura entre 20 e 22°C, com acesso à água filtrada e comida *ad libitum*.

4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

O modelo utilizado foi o de indução de cirrose biliar secundária através da LDBC, segundo o método de TAG et al (2015). Os animais foram divididos igualmente em quatro grupos ($n = 8$):

- Grupo 1 – SO + CFA: Grupo submetido à simulação da cirurgia de ligadura de ducto biliar comum e à administração de cafeína durante 28 dias por via intragástrica;
- Grupo 2 – SO + H₂O: Grupo submetido à simulação da ligadura de ducto biliar comum e à administração de veículo (H₂O) durante 28 dias por via intragástrica;
- Grupo 3 – LDBC + CFA: Grupo submetido à cirurgia de ligadura de ducto biliar comum e à administração de cafeína durante 28 dias por via intragástrica;
- Grupo 4 – LDBC + H₂O: Grupo submetido à cirurgia de ligadura de ducto biliar comum e à administração de veículo (H₂O) durante 28 dias por via intragástrica.

4.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.5.1 Protocolos Anestésicos e Analgésicos

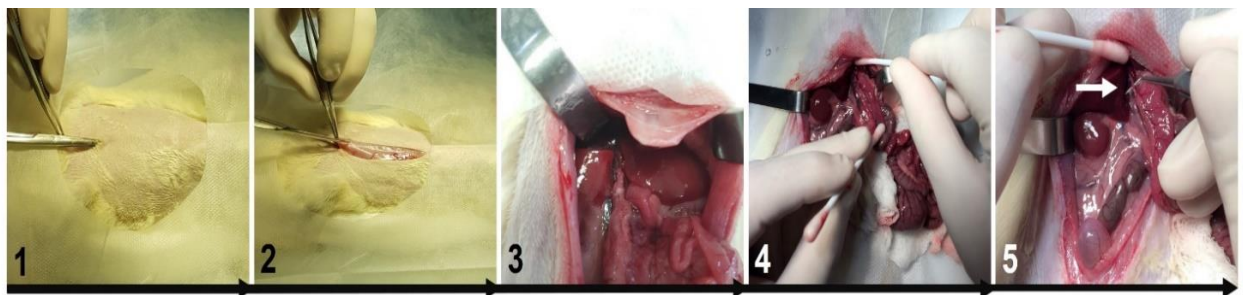
Para a realização dos procedimentos cirúrgicos e da eutanásia, os animais foram mantidos em jejum de 4 horas e a anestesia foi realizada com a administração intraperitoneal de uma mistura de Cloridrato de Xilazina 10mg/Kg e Cloridrato de Cetamina 90 mg/Kg de peso corporal. Os procedimentos só iniciaram após a completa sedação do animal, que pôde ser avaliada pela não presença dos reflexos de cauda, palmar, do focinho e palpebral. No pós-operatório, os animais foram submetidos à analgesia e à antibioticoterapia, com administração subcutânea de Tramadol 5mg/kg e Amoxicilina 20mg/kg, ambas por 7 dias.

4.5.2 Modelo Experimental de Cirrose Biliar Secundária

A intervenção cirúrgica para a indução de cirrose biliar secundária por LDBC foi iniciada com a realização de tricotomia e desinfecção da região abdominal com Clorexidina 2%, seguida de uma laparotomia ventral média de 3 cm de comprimento. Após elevação do fígado e rebaixamento do intestino, com gaze embebida em 0,9% NaCl, para exposição do ducto biliar comum, foram realizados dois nós cirúrgicos, um proximal e outro distal, utilizando fio de Poliglactina 7.0 (TAG et al., 2015). Posteriormente, foi realizado o fechamento da cavidade abdominal através de pontos contínuos no peritônio e na camada muscular abdominal com Poliglactina 5.0, e pontos simples na pele com Nylon 4.0. Os grupos controles, submetidos à cirurgia simulada, passaram pelos mesmos procedimentos, porém sem ligadura do ducto biliar comum.

Todo o procedimento foi realizado de forma estéril, com adequada assepsia, utilização de luvas cirúrgicas, campo cirúrgico e instrumentos autoclavados e individuais para cada animal.

FIGURA 1 - ETAPAS DA LIGADURA DE DUCTO BILIAR COMUM



Fonte: o autor (2018). Legenda: 1 – Campo Cirúrgico; 2 – Incisão Xifopúbica; 3 – Cavidade Abdominal; 4 – Elevação do Fígado e Rebaixamento do Intestino; 5 – Ducto Biliar Comum (Seta Branca).

Após o procedimento cirúrgico, os animais permaneceram em esteira térmica por 40 minutos e foram constantemente monitorados quanto ao retorno de seus reflexos. Posteriormente, foram alocados em caixas plásticas forradas com maravalha devidamente identificadas.

O experimento teve duração de 28 dias, tempo necessário para o desenvolvimento da cirrose biliar secundária através da LDBC (TAG et al., 2015).

4.5.3 Modelo Experimental de Encefalopatia Hepática

Além da LDBC, já descrita no item 4.5.2, foi necessário associar a ingesta de ração hiperproteica. Essa ração foi incluída no experimento para que os níveis séricos de amônia, produto da degradação das proteínas, aumentassem. Então, durante a quarta e última semana do experimento (do 21º ao 28º dia) foi disponibilizada aos animais ração *ad libitum* com 76% de proteína de soja.

Esta ração foi produzida artesanalmente com base na média de consumo diário de cada animal (35 g/dia), e, portanto, a quantidade exata de ração necessária para a suplementação adequada durante 7 dias. Dessa forma, foi realizada uma mistura de ração padrão triturada, proteína de soja, água e farinha de trigo, resultando em uma massa de consistência amolecida. Esta foi dividida em pequenos cilindros com aproximadamente 3 cm de diâmetro e levada ao forno a 200°C por 45 minutos, adquirindo consistência semelhante a ração padrão (Figura 2). A ração foi mantida refrigerada para uma boa conservação e as sobras substituídas diariamente. A proteína de soja e a farinha de trigo foram obtidas em Pop House Alimentos (Curitiba, Brasil). Este modelo, porém, com adaptações, foi descrito por Jover et al (2006).

FIGURA 2 - ETAPAS DA PRODUÇÃO ARTESANAL DE RAÇÃO



Fonte: o autor (2018). Legenda: 1 – Ração padrão triturada; 2 – Proteína de soja; 3 – Mistura das partes para produção da massa modelável; 4 – Ração dentro do forno a 200°C; 5 – Ração pronta.

4.5.4 Administração da Cafeína

A CFA, obtida em Quallita (Curitiba, Brasil), foi dissolvida em 2 ml de água morna (45°C) para, então, ser administrada por via intragástrica, aos grupos SO + CFA e LDBC + CFA, na dose de 50mg/kg por dia. Esse tratamento ocorreu do primeiro dia de experimento até a data de morte dos animais, totalizando 28 dias.

4.5.5 Administração do Veículo (H₂O)

O veículo, H₂O, foi administrado por via intragástrica, aos grupos SO + H₂O e LDBC + H₂O, na quantidade de 2ml ao dia. A administração ocorreu do primeiro dia de experimento até a data de morte dos animais, totalizando 28 dias.

4.5.6 Acompanhamento Diário do Experimento

Durante todo o desenvolvimento do experimento, diariamente foram registradas as condições físicas e psíquicas em que os animais se encontravam. Foram analisados sinais característicos da cirrose biliar, tais como icterícia, acolia e colúria, e outras mudanças como irritabilidade, estresse, apatia, agressividade, fraqueza e isolamento social.

4.5.7 Teste Comportamental de Campo Aberto

O TCA foi realizado em uma caixa aberta quadrada de madeira MDF (120 cm x 120 cm x 40 cm) com piso quadriculado, confeccionada em Rudegon Marcenaria (Curitiba, Brasil). No último dia de experimento, cada animal foi colocado no centro da caixa e exposto individualmente durante 5 minutos, sendo feita a filmagem de toda a

caixa em uma visão superior através de uma câmera Nikon D3400 (GUILHERMITTI, 2011).

A análise dos vídeos ocorreu através da contagem de quadrantes percorridos, ato de ficar em pé apoiado apenas sobre as patas traseiras e ato de autolimpeza de cada animal (WALSH; CUMMINS, 1976).

O teste foi aplicado para todos os animais pela mesma pessoa em uma sala fechada e afastada de sons externos, para evitar quaisquer mudanças nos hábitos de comportamento dos ratos (WALSH; CUMMINS, 1976).

4.5.8 Forma de Eutanásia e Obtenção das Amostras de Tecido e Sangue

No 28º dia de experimento, os animais foram anestesiados com uma mistura de Cloridrato de Xilasina 10 mg/Kg e Cloridrato de Cetamina 90 mg/Kg de peso corporal. Inicialmente, foi feita tricotomia e desinfecção da região abdominal com Clorexidina 2%, e logo após realizada a coleta de aproximadamente 10 ml de sangue arterial por meio de punção cardíaca. E, após a morte dos animais, por exsanguinação, ocorreu a retirada do fígado e do encéfalo.

4.5.9 Análises Laboratoriais

As amostras de sangue foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 20 minutos e os soros resultantes foram armazenados sob -20º C. Estes, então, foram encaminhados ao laboratório de análises clínicas Bionostic (Curitiba, Paraná). Os testes de integridade hepática foram realizados por método cinético UV para ALT e AST e método colorimétrico para bilirrubina e frações.

4.5.10 Avaliação Histológica

Para realização do processo histológico, os órgãos coletados foram colocados em formol tamponado por 48 horas. Na etapa seguinte, foram selecionados fragmentos para processamento de acordo com a técnica histológica convencional. Os fragmentos de fígado e encéfalo foram incluídos em paraplast e orientados para que os cortes obtidos resultassem em secções transversais. Para análise das alterações histopatológicas, os cortes de fígado foram corados em Hematoxilina-Eosina e em Tricrômio de Masson, e os cortes de encéfalo em Hematoxilina-Eosina.

Em relação ao protocolo anatomopatológico, as lâminas foram analisadas em quatro aspectos para tecido hepático (desarranjo arquitetural do parênquima; alargamento dos espaços portais; proliferação de ductos biliares; e fibrose hepática, segundo a escala de METAVIR) e em quatro para tecido nervoso (presença de astrócitos de Alzheimer tipo 2; edema; aspecto espongiforme e necrose laminar). Estes critérios foram classificados em ausente, discreto ou moderado/acentuado.

A escala de METAVIR utilizada classifica a fibrose hepática em cinco categorias: F0 (fibrose ausente); F1 (fibrose portal sem septos); F2 (fibrose portal com raros septos); F3 (numerosos septos sem formação de nódulos/cirrose) e F4 (fibrose extensa com formação de nódulos/cirrose) (FRENCH METAVIR COOPERATIVE STUDY GROUP; BEDOSSA, 1994).

O exame histológico foi realizado por um patologista não informado acerca das especificidades de cada grupo experimental.

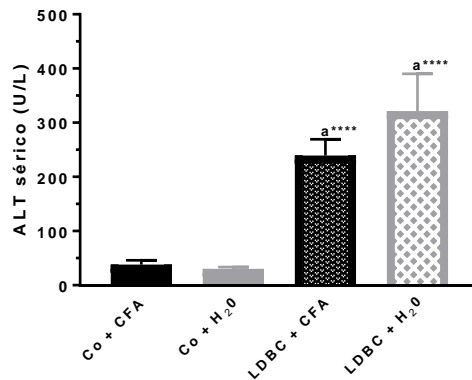
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir dos dados coletados, as médias e o desvio padrão de cada grupo foram calculados, utilizando para análise estatística o software Graphpad Prism, versão 7.0 para Windows 10. Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida de teste Tukey-Kramer para múltiplas comparações, sendo o nível de significância adotado de 5% ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS

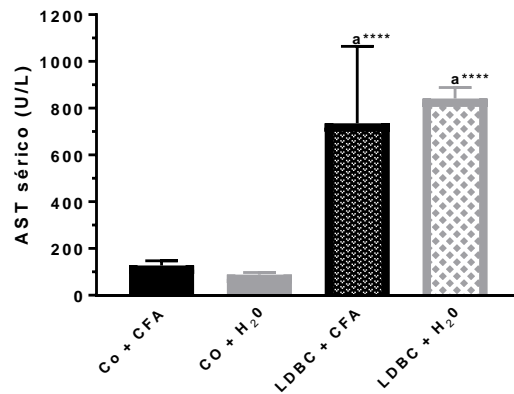
5.1 AVALIAÇÃO DOS EXAMES LABORATORIAIS

GRÁFICO 1 - VALORES DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE ALT



Fonte: o autor (2018). Legenda: Média \pm DP. a = diferença significativa entre os grupos LDBC e seus respectivos controles. Os asteriscos representam o grau de significância (****P < 0,0001).

GRÁFICO 2 - VALORES DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE AST



Fonte: o autor (2018). Legenda: Média \pm DP. a = diferença significativa entre os grupos LDBC e seus respectivos Co. Os asteriscos representam o grau de significância (****P < 0,0001).

TABELA 2 - VALORES DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DAS BILIRRUBINAS EXPRESSAS EM MG/DL

	Co + CFA	Co + H2O	LDBC + CFA	LDBC + H2O
BD	0,16 ± 0,05	0,1 ± 0	4,16 ± 0,6 ^{a****}	5,22 ± 1,6 ^{a****}
BI	0,1 ± 0	0,14 ± 0,05	1,04 ± 0,18 ^{a***}	1,18 ± 0,17 ^{a****}
BT	0,26 ± 0,05	0,24 ± 0,05	5,2 ± 0,67 ^{a****}	6,38 ± 1,61 ^{a****}

Fonte: o autor (2018). Legenda: Média ± DP. a = diferença significativa entre os grupos LDBC e seus respectivos Co. Os asteriscos representam o grau de significância (**P < 0,001, ****P < 0,0001).

Foi possível observar um aumento significativo dos valores das transaminases ALT e AST (Gráfico 1 e 2) e das bilirrubinas direta e indireta nos animais com LDBC quando em comparação com os seus respectivos controles (Tabela 2). O grupo LDBC + CFA apresentou médias inferiores ao grupo LDBC + H2O, apesar de não significativo.

5.2 AVALIAÇÃO DO TESTE DE CAMPO ABERTO

TABELA 3 - VALORES DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS NO TESTE DE CAMPO ABERTO

	Co + CFA	Co + H2O	LDBC + CFA	LDBC + H2O
S	120 ± 25,5	106,8 ± 12,4	108,4 ± 7,9 ^{c*}	56,8 ± 30,5 ^{a*}
R	25,13 ± 7,4	25,6 ± 4,16	23,4 ± 6,9	16,6 ± 8,3
G	4,37 ± 2,6	2,8 ± 0,84	4,4 ± 2,4	2,6 ± 0,55

Fonte: o autor (2018). Legenda: Média ± DP. a = diferença significativa entre os grupos LDBC e seus respectivos Co. c = diferença significativa entre os grupos LDBC + CFA e LDBC + H2O. Os asteriscos representam o grau de significância (*P < 0,05).

O número de quadrantes percorridos pelos animais cirróticos mostrou-se significativamente superior no grupo tratado quando comparado ao grupo LDBC + H2O. Além disso, não houve diferença entre a média de quadrantes percorridos entre o grupo LDBC + CFA e o seu controle. Por sua vez, o grupo LDBC + H2O apresentou uma redução da média em comparação com o seu grupo controle. Em relação ao ato

de ficar em pé sobre patas traseiras, a média do grupo LDBC + H2O mostrou-se inferior ao seu controle. Já para o ato de autolimpeza, não houve diferenças intergrupos (Tabela 3).

5.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA

5.3.1 Tecido Hepático

TABELA 4 – AVALIAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS DE FÍGADO

Resultados	Co + CFA			Co + H2O			LDBC + CFA			LDBC + H2O		
	A	D	M/A	A	D	M/A	A	D	M/A	A	D	M/A
Des. Arquit.	100	0	0	100	0	0	0	40	60	0	0	100
Alg. Portal	100	0	0	0	0	0	0	40	60	0	0	100
Pri. Ductal	100	0	0	0	0	0	0	20	80	0	0	100

Fonte: o autor (2018). Valores expressos em porcentagem.

Todos os animais dos grupos controles apresentaram grau ausente nos quatro parâmetros avaliados (Tabela 4 e 5).

Em relação ao desarranjo arquitetural do parênquima e alargamento dos espaços portais, o grupo LDBC + H2O apresentou o pior resultado, com 100% dos animais apresentando grau moderado/acentuado. O grupo LDBC + CFA apresentou resultados melhores, sendo grau discreto em 40% e moderado/acentuado em 60% dos animais (Tabela 4).

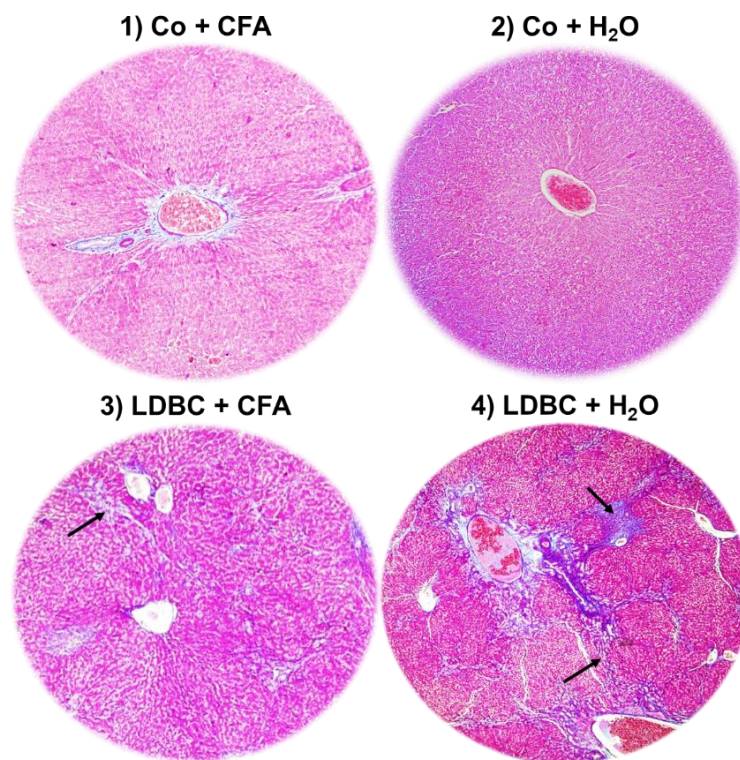
Na proliferação de ducto biliares, o grupo LDBC + H2O foi 100% classificado como moderado/acentuado e o grupo LDBC + CFA apresentou 80% dos animais com proliferação moderado/acentuada e 20% discreta (Tabela 4).

TABELA 5 - ESCALA METAVIR DE FIBROSE HEPÁTICA

Resultados	Co + CFA	Co + H2O	LDBC + CFA	LDBC + H2O
F0	100	100	0	0
F1	0	0	0	0
F2	0	0	60	0
F3/F4	0	0	40	100

Fonte: o autor (2018). Valores expressos em porcentagem.

FIGURA 3 – LÂMINAS DE TECIDO HEPÁTICO



Fonte: o autor (2019). Coloração Tricômio de Masson, 100x. Nos grupos cirróticos 3 e 4, nota-se formação de fibrose (em azul; setas pretas), dilatação e proliferação de ductos biliares, desarranjo arquitetural e alargamento do espaço portal.

Para graduação de fibrose hepática, utilizou-se a classificação de METAVIR, sendo F0 ausência de fibrose e F4 fibrose intensa (FRENCH METAVIR COOPERATIVE STUDY GROUP, 1994). O grupo LDBC + CFA apresentou resultados melhores se comparado ao grupo LDBC + H2O, com 60% dos animais com grau F2 (fibrose portal discreta e com raros septos) e 40% F3/F4 (fibrose acentuada e

formação de nódulos). Em relação ao grupo LDBC + H₂O, 100% dos animais apresentaram fibrose em grau F3/F4 (Tabela 5 e Figura 3).

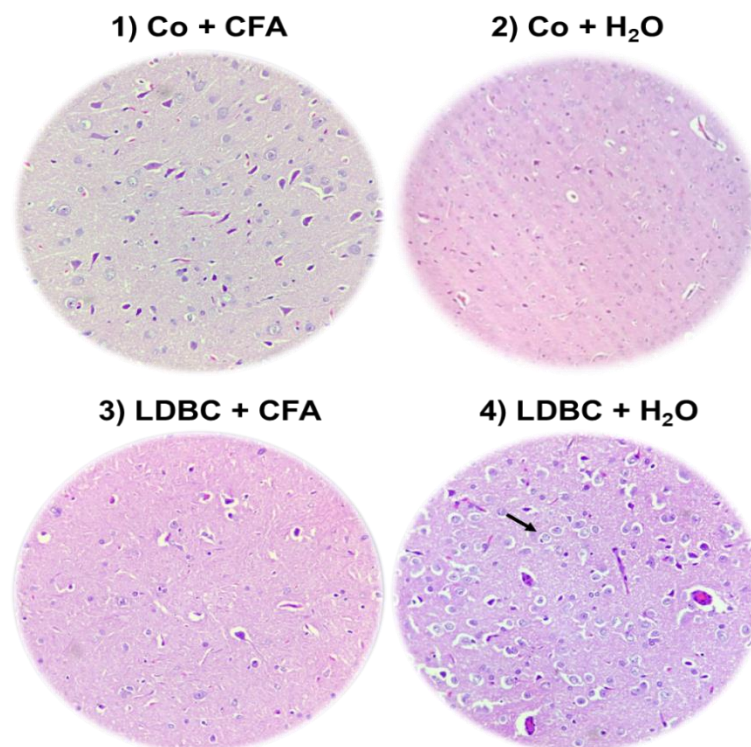
5.3.2 Tecido Nervoso

TABELA 6 – AVALIAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS DE ENCÉFALO

Resultados	Co + CFA			Co + H ₂ O			LDBC + CFA			LDBC + H ₂ O		
	A	D	M/A	A	D	M/A	A	D	M/A	A	D	M/A
Necrose Lam.	25	75	0	50	50	0	0	80	20	0	20	80
Aspec. Espong.	25	75	0	0	100	0	0	100	0	0	20	80
Edema	12,5	87,5	0	0	100	0	0	80	20	0	0	100
A.A Tipo 2	0	100	0	0	100	0	0	80	20	0	0	100

Fonte: o autor (2018). Valores expressos em porcentagem.

FIGURA 4 – LÂMINAS DE ENCÉFALO



Fonte: o autor (2019). Coloração Hematoxilina-Eosina, 100x. No grupo 4, pode-se observar intensa proliferação de Astrócitos de Alzheimer tipo 2 (seta preta), edema, aspecto espongiforme e necrose laminar. O grupo cirrótico 3 apresenta características semelhantes ao seu grupo controle.

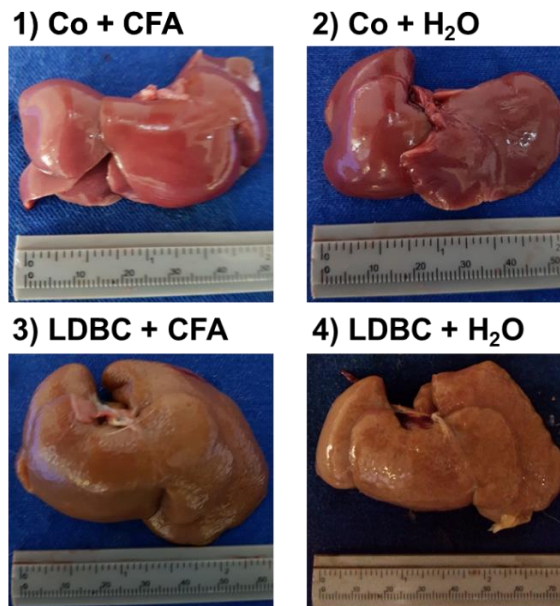
Em relação a presença de astrócitos de Alzheimer tipo 2, edema e necrose laminar, o grupo cirrótico tratado apresentou melhora significativa. 80% deles apresentaram estes parâmetros em grau discreto e apenas 20% em grau moderado/acentuado. Já o grupo LDBC + H₂O apresentou necrose moderada/acentuada em 80% dos animais e astrócitos de Alzheimer tipo 2 e edema em 100% deles. Sobre o aspecto esponjiforme, o grupo LDBC + CFA apresentou 100% dos animais com grau discreto. Em contrapartida, no grupo LDBC + H₂O, 80% apresentaram aspecto moderado/acentuado e 20% discreto (Tabela 6 e Figura 4).

5.4 ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS

5.4.1 Macroscopia dos Órgãos

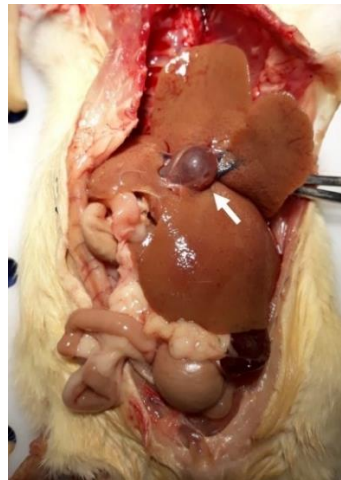
Em relação ao fígado, os animais dos grupos controles apresentaram macroscopia normal (figura 5), com coloração marrom-avermelhada, formato triangular, bordos bem delimitados, superfície lisa e brilhante, consistência amolecida e ausência de hepatomegalia. Entretanto, nos animais cirróticos, pôde-se observar coloração marrom-amarelada e em alguns casos esverdeada, formato ovalado, bordos bem delimitados, porém facilmente friáveis, superfície irregular com aspecto micronodular, consistência fibroelástica e hepatomegalia importante (Figura 5 e 6). Alguns animais apresentaram também dilatação excessiva da veia porta (Figura 6), possivelmente como consequência da hipertensão portal.

FIGURA 5 – MACROSCOPIA DO FÍGADO



Fonte: o autor (2018).

FIGURA 6 - DILATAÇÃO DE VEIA PORTA



Fonte: o autor (2018). Legenda: Dilatação de veia porta (seta branca).

Em relação ao encéfalo, não foram observadas diferenças na macroscopia. O órgão apresentava coloração rósea-esbranquiçada de consistência mole e friável (Figura 7).

FIGURA 7 – MACROSCOPIA DO ENCÉFALO



Fonte: o autor (2018).

5.4.2 Outras Alterações

Os animais cirróticos, por volta do 7º dia, começaram a apresentar sinais de icterícia (Figura 8), mais visíveis em região de patas, orelhas e dorso. A coloração se intensificou com o passar dos dias, sendo mais evidente ao final do experimento. Os grupos controles não apresentaram sinais de icterícia, assim, considera-se uma característica observada apenas nos grupos ligados. Entre estes grupos, com administração ou não de CFA, não foi possível observar diferenças entre as intensidades da icterícia.

FIGURA 8 – COLORAÇÃO ANICTÉRICA E ICTÉRICA

1) Grupos Controles



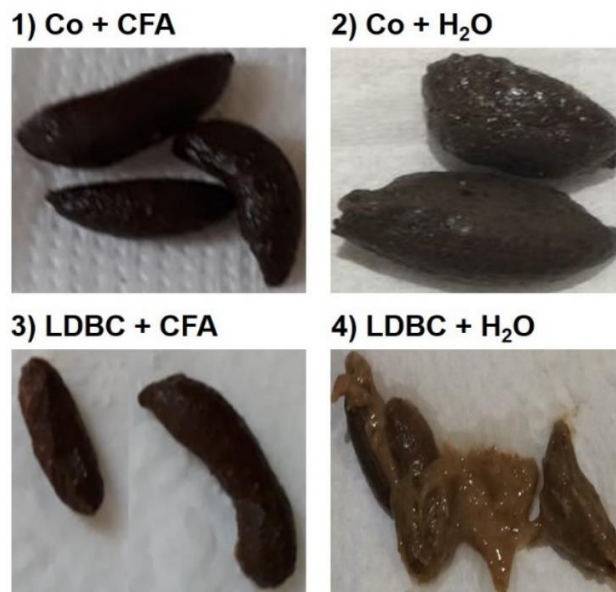
2) Grupos Cirróticos



Fonte: o autor (2018). Coloração da pele dos ratos no 14º dia de experimento, evidenciando icterícia no grupo cirrótico.

Em relação as fezes, os animais do grupo LDBC + H₂O apresentaram intensa acolia, a qual foi modulada pela administração de CFA no grupo LDBC + CFA (Figura 9). Além disso, os animais cirróticos também apresentaram colúria (Figura 10), sinal característico de hiperbilirrubinemia. E, nesse quesito, não foi possível observar diferenças entre os grupos tratados e não tratados. Os grupos Controles não apresentaram alterações no padrão de coloração das fezes e urina.

FIGURA 9 - FEZES DOS RATOS CIRRÓTICOS



Fonte: o autor (2018). Fezes dos ratos no dia anterior à data final do experimento.

FIGURA 10 - COLÚRIA DE RATO CIRRÓTICO



Fonte: o autor (2018). Legenda: intensa colúria (seta preta) em rato cirrótico.

Ao longo do experimento, foram realizados registros diários acerca do comportamento dos animais. Dessa forma, foi possível notabilizar que o grupo cirrótico não tratado apresentou evidentes sinais de apatia, sonolência e desorientação, visíveis principalmente na última semana de experimento. Este padrão de comportamento não foi observado em nenhum outro grupo.

6 DISCUSSÃO

As enzimas hepáticas ALT e AST são marcadores de toxicidade e severidade de lesão hepática, e a sua liberação na corrente sanguínea demonstra a presença de lesão no parênquima hepático (BONA et al., 2012). No presente estudo, a LDBC induziu ao dano hepático, que pôde ser evidenciado pelo aumento significativo dessas enzimas no sangue, fato já corroborado por outros estudos que utilizaram esse modelo experimental (TAG et al., 2015; YOKOTA et al., 2018). Além disso, assim como em outros trabalhos semelhantes, o tratamento com CFA diminuiu a liberação dessas enzimas na corrente sanguínea, mostrando um efeito hepatoprotetor e possivelmente melhora na arquitetura do tecido hepático (SHIN et al., 2010; GORDILLO-BASTIDAS et al., 2013).

Com a LDBC, a bilirrubina direta proveniente do fígado não consegue completar seu fluxo, através das vias biliares, até o intestino, regurgitando e acumulando-se no fígado, sendo captada pelos sinusoides hepáticos e aumentando, então, a sua concentração sérica (RUBIN et al., 2006). Com a cronificação da obstrução biliar, os ácidos biliares acumulados no fígado começam a lesar as células responsáveis por conjugar a bilirrubina indireta, proveniente da hemólise, em bilirrubina direta, o que faz com que o nível sérico de bilirrubina indireta também aumente (RUBIN et al., 2006; SHERLOCK; DOOLEY, 2008).

No estudo em questão, tanto a bilirrubina direta como a indireta mostraram valores aumentados nos animais cirróticos. O grupo não tratado submetido a ligadura apresentou a maior média de bilirrubina total dentre os grupos. Por sua vez, o grupo tratado com CFA, apresentou uma diminuição da bilirrubina indireta em comparação ao grupo cirrótico não tratado, demonstrando, então, que a administração dessa substância propiciou redução dos danos às células responsáveis pela conjugação da bilirrubina indireta em direta.

Ademais, os animais tratados com CFA não apresentaram acolia, sinal característico de cirrose biliar, o qual pôde ser visualizado no grupo não tratado (SHERLOCK; DOOLEY, 2008). E, segundo a literatura, níveis de bilirrubina total superiores a 2 ou 3 mg/dL são suficientes para que o pigmento extravase para a pele e mucosas, e leve ao desenvolvimento de icterícia (HERRINE, 2018). Em vista disso,

notou-se que em ambos os grupos cirróticos a quantidade de bilirrubina foi superior a 2 mg/dL, o que explica a intensa coloração amarelada visível nos animais após o 7º dia de experimento.

A hepatomegalia também ficou evidente na macroscopia, condição que é frequentemente associada a doenças hepatobiliares, sendo causada pela retenção de conteúdo biliar no tecido hepático e pelo dano difuso causado pelo seu acúmulo (YAARI et al., 1992; ROCHA DE OLIVEIRA et al., 2014).

A avaliação histopatológica hepática nos grupos submetidos à LDBC demonstrou desde áreas com apenas leve desarranjo arquitetural do parênquima até áreas com intensa fibrose, semelhante a outros estudos que utilizaram este modelo (KOUNTOURAS, BILLING; SCHEUER, 1984; TAG et al., 2015). Os parâmetros avaliados (desarranjo arquitetural, alargamento do espaço porta, proliferação ductal e fibrose hepática) foram considerados moderados/acentuados em todos os animais cirróticos não tratados.

Os miofibroblastos hepáticos, derivados das células estreladas e de fibroblastos portais, são as principais células envolvidas na formação de fibrose hepática (KARIN et al., 2016). Estas células expressam receptores de adenosina que, quando ativados, geralmente por injúrias hepáticas, estimulam a formação de fibrose pelo miofibroblasto. Em vista disso e sendo a CFA um antagonista dos receptores de adenosina, o tratamento com essa substância impede a ativação desses receptores e, conseqüentemente, diminui a formação de tecido fibrótico (DRANOFF et al., 2014).

A TGF- β é a principal citocina regulatória do fígado e uma de suas funções é ativar as células estreladas do fígado estimulando a formação de fibrose (DOOLEY; TEN DIJKE, 2012). Segundo a literatura, níveis de TGF- β encontram-se aumentados em modelos experimentais de cirrose, mas quando há administração de CFA, os níveis de TGF- β mostram-se menores. Ou seja, há uma menor ativação das células estreladas devido a um down-regulation dessa citocina (ARAUZ et al., 2014; SHIM, et al., 2013).

Estudos in vitro relatam que a CFA também impede a ativação das células estreladas do fígado ao inibir o fator de transcrição Snail-1, que é fundamental na ativação dessas células (MURIEL; ARAUZ, 2010; GORDILLO-BASTIDAS et al., 2013). Além disso, a CFA ativa a enzima Nrf2, a qual regula a expressão de proteínas

antioxidantes. Dessa forma, também age diminuindo o estresse oxidativo, que é um dos mecanismos causadores da fibrose hepática (GORDILLO-BASTIDAS et al., 2013).

No presente estudo, os animais cirróticos tratados com CFA apresentaram, no geral, um tecido hepático com padrão histológico mais semelhante ao fisiológico. O dano hepático causado pela indução da cirrose é visível na microscopia, porém em intensidade menor do que o observado no grupo cirrótico não tratado. O resultado mais significativo é em relação a diminuição de fibrose, ou seja, com base na escala de METAVIR, 60% dos animais apresentaram grau de fibrose F2 (presença de fibrose com raros septos) e apenas 40% dos animais F3/F4 (fibrose com numerosos septos ou formação de nódulos), diferente do grupo cirrótico não tratado, que apresentou 100% grau F3/F4 de fibrose (FRENCH METAVIR COOPERATIVE STUDY GROUP; BEDOSSA, 1994). Todos os outros parâmetros histológicos avaliados também se mostraram significativamente menos intensos na administração de CFA.

Com isso, pôde-se perceber que a CFA, na vigência de indução à fibrose hepática, exerceu efeito hepatoprotetor, dado que corrobora com os recentes estudos sobre os efeitos dessa substância no tecido hepático lesado (GORDILLO-BASTIDAS et al., 2013; ARAUZ et al., 2014).

Quanto a encefalopatia hepática, as alterações microscópicas encefálicas que mais se destacam são o edema e a presença de Astrócitos de Alzheimer tipo 2 (HAZELL; BUTTERWORTH, 1999; HÄUSSINGER et al., 2000). Além disso, necrose laminar e aspecto esponjiforme podem ser encontradas nas camadas profundas do córtex cerebral, substância branca subcortical, núcleos basais e cerebelo (RESENDE; SPECIALI, 1984). Portanto, essas alterações foram utilizadas como parâmetros anatomopatológicos para avaliar o desenvolvimento de encefalopatia e, dessa forma, no estudo em questão, os animais cirróticos não tratados apresentaram todos os parâmetros característicos de encefalopatia de forma intensa, principalmente edema e astrócitos de Alzheimer tipo 2, sendo classificados como acentuados em 100% dos animais, dado que corrobora com o estudo utilizado como modelo de indução para a encefalopatia hepática (JOVER et al., 2006).

Em contrapartida, o resultado da análise histológica das lâminas de encéfalo do grupo cirrótico tratado com CFA foi satisfatório. Pôde-se perceber que com a

administração dessa substância, houve diminuição significativa do edema, do aspecto esponjiforme, da necrose laminar e dos astrócitos de Alzheimer tipo 2. Além disso, a presença de edema e de astrócitos de Alzheimer tipo 2 foram classificados como moderado/acentuados em apenas 20% dos animais, enquanto, no grupo LDBC + H₂O, 100% dos animais apresentaram estas características em grau moderado/acentuado.

Com relação ao TCA, para avaliação da atividade exploratória e comportamental dos animais, foram utilizados três parâmetros de contagens: quadrantes percorridos pelos animais, ato de ficar apoiado sobre as patas traseiras e ato de autolimpeza (WALSH; CUMMINS, 1976). Sendo assim, notabilizou-se que nos dias finais de experimento, os animais do grupo cirrótico não tratado estavam mais letárgicos, sonolentos, desorientados e apáticos se comparados ao grupo tratado, além disso, no momento de gavagem, esses animais não faziam oposição à administração do veículo (H₂O), diferente de qualquer outro grupo ou época do experimento. Essa diminuição do nível de consciência foi demonstrada e comprovada no momento da aplicação do TCA, pois os animais apresentaram diminuição de dois dos três parâmetros utilizados para avaliar a atividade exploratória. Esse estado de consciência caracteriza grau II ou III de encefalopatia hepática, segundo a escala de West-Haven (Tabela 1), o esperado para o modelo de encefalopatia escolhido (BUTTERWORTH et al., 2009; VILSTRUP et al., 2014).

O grupo cirrótico suplementado com CFA não apresentou sinais letárgicos ou apáticos, e a média dos três parâmetros avaliados no TCA foi semelhante ao observado em seus grupos controles, demonstrando, então, que a administração da CFA impediu que os animais apresentassem sinais clínicos característicos de grau II e III da classificação citada anteriormente (BITTENCOURT et al., 2011; VILSTRUP et al., 2014).

Com relação a CFA, sabe-se sobre seu efeito modulador na redução do estado de consciência, devido a estimulação do SNC, antagonizando os receptores de adenosina, e sobre seu efeito na diminuição da concentração sérica de amônia (NEHLIG, 1999; RIBEIRO; SEBASTIÃO, 2010; GARRIDO et al., 2016), por causar aumento na atividade de diversas enzimas do ciclo da ureia (FERRER, COSTELL; GRISOLÍA, 1982; JORDA et al., 1989), o qual utiliza a amônia como substrato, que, se em excesso, pode levar ao desenvolvimento de encefalopatia hepática (NELSON,

LEHNINGER; COX, 2008; VILSTRUP et al., 2014). Portanto, dessa forma, a partir do estudo em questão, sugere-se que o efeito da CFA como estimulante do SNC, associado a sua ação catalisadora no ciclo da ureia e a seu efeito hepatoprotetor, impediu a evolução da encefalopatia hepática induzida para graus mais graves, pois preveniu o aparecimento dos sinais clínicos característicos dos graus II e III da escala de West-Haven (VILSTRUP et al., 2014), além de atenuar o surgimento de alterações histológicas no encéfalo.

7 CONCLUSÃO

A LDBC mostrou-se efetiva na indução de cirrose biliar secundária e, com a associação da ração hiperproteica, foi capaz de induzir encefalopatia hepática em vinte e oito dias.

E, devido a diminuição da lesão hepática, principalmente da formação de fibrose, observada em microscopia óptica, e dos níveis séricos das transaminases (ALT e AST), pode-se confirmar o efeito hepatoprotetor da CFA. Ademais, esta substância também atenuou o surgimento de lesões microscópicas no encéfalo, aumentou a atividade exploratória dos animais durante o TCA e preveniu o surgimento de sinais clínicos de encefalopatia hepática durante todo o experimento.

REFERÊNCIAS

ABDEL-AZIZ, G. et al. Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat. **The American journal of pathology**, v. 137, n. 6, p. 1333, 1990.

ABIC, Associação Brasileira da Indústria do Café. **Indicadores da Indústria de Café: Estatística**. 1. 2012. Disponível em: <<http://abic.com.br/estatisticas/indicadores-da-industria/>>. Acesso em: 10 ago. 2018.

ALDRIDGE, Dominic R.; TRANAH, Edward J.; SHAWCROSS, Debbie L. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: role of ammonia and systemic inflammation. **Journal of clinical and experimental hepatology**, v. 5, p. S7-S20, 2015.

ALS-NIELSEN, Bodil; GLUUD, Lise L.; GLUUD, Christian. Non-absorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: systematic review of randomised trials. **Bmj**, v. 328, n. 7447, p. 1046, 2004.

AMARAPURKAR D, DHAROD MV, CHANDNANI M, et al. Acute-on-chronic liver failure: a prospective study to determine the clinical profile, outcome, and factors predicting mortality. **Indian J Gastroenterol Off J Indian Soc Gastroenterol**, 2015; 34(3):216–24.

ANDERSEN, Lene Frost et al. Consumption of coffee is associated with reduced risk of death attributed to inflammatory and cardiovascular diseases in the Iowa Women's Health Study—. **The American journal of clinical nutrition**, v. 83, n. 5, p. 1039-1046, 2006.

ARAUZ, Jonathan et al. Caffeine prevents experimental liver fibrosis by blocking the expression of TGF- β . **European journal of gastroenterology & hepatology**, v. 26, n. 2, p. 164-173, 2014.

AUGELLO D.E. In: Silva P. **Farmacologia**. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 428-9.

BAJAJ, Jasmohan S. Minimal hepatic encephalopathy matters in daily life. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 14, n. 23, p. 3609, 2008.

BITTENCOURT, Paulo Lisboa et al. Encefalopatia hepática: relatório da 1^o reunião monotemática da Sociedade Brasileira de Hepatologia. **GED. Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva**, p. 10-34, 2011.

BLACHIER, Martin et al. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. **Journal of hepatology**, v. 58, n. 3, p. 593-608, 2013.

BLACK, Christopher D.; WADDELL, Dwight E.; GONGLACH, Alexander R. Caffeine's ergogenic effects on cycling: Neuromuscular and perceptual factors. **Med Sci Sports Exerc**, v. 47, n. 6, p. 1145-58, 2015.

BONA, Silvia et al. Effect of antioxidant treatment on fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. **ISRN gastroenterology**, v. 2012, 2012.

BUTTERWORTH, Roger F. et al. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. **Liver International**, v. 29, n. 6, p. 783-788, 2009.

CAMARGO, M. C. R. et al. Teor de cafeína em cafés brasileiros. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 18, n. 4, p. 421-4, 1998.

CHILD, C.G.; TURCOTTE, J.G. Surgery and portal hypertension. In: **The liver and portal hypertension**. Philadelphia: Saunders, 1964. p. 50-64.

CLEMMESSEN, Jens Otto et al. Cerebral herniation in patients with acute E liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. **Hepatology**, v. 29, n. 3, p. 648-653, 1999.

COBBOLD, J. F. L.; MORIN, S.; TAYLOR-ROBINSON, S. D. Transient elastography for the assessment of chronic liver disease: ready for the clinic?. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 13, n. 36, p. 4791, 2007.

CONLEE, ROBERT K. Amphetamine, caffeine and cocaine. **Perspectives in exercise science and sports medicine**, v. 4, p. 285-328, 1991.

CÓRDOBA, Juan et al. The development of low-grade cerebral edema in cirrhosis is supported by the evolution of 1H-magnetic resonance abnormalities after liver transplantation. **Journal of hepatology**, v. 35, n. 5, p. 598-604, 2001.

D'ALBUQUERQUE, L. C.; GAMA-RODRIGUES, J.; SILVA, A. O. Hipertensão portal– Aspectos fisiopatológicos. **Hepatologia clínica e cirúrgica. 1º Edição. São Paulo. Sarvier**, p. 627-37, 1986.

D'AMICO, Gennaro; GARCIA-TSAO, Guadalupe; PAGLIARO, Luigi. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. **Journal of hepatology**, v. 44, n. 1, p. 217-231, 2006.

DE CARVALHO, Juliana R. et al. Burden of Chronic Viral Hepatitis and Liver Cirrhosis in Brazil-the Brazilian Global Burden of Disease Study. **Annals of hepatology**, v. 16, n. 6, p. 893-900, 2018.

DE MARIA, Carlos AB; MOREIRA, Ricardo FA. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 99, 2007.

DÍAZ-REVAL, M. Irene et al. Tramadol and caffeine produce synergistic interactions on antinociception measured in a formalin model. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 97, n. 2, p. 357-362, 2010.

DOOLEY, Steven; TEN DIJKE, Peter. TGF- β in progression of liver disease. **Cell and tissue research**, v. 347, n. 1, p. 245-256, 2012.

DRANOFF, Jonathan A. et al. How does coffee prevent liver fibrosis? Biological plausibility for recent epidemiological observations. **Hepatology**, v. 60, n. 2, p. 464-467, 2014.

FAINT, Victoria. The pathophysiology of hepatic encephalopathy. **Nursing in critical care**, v. 11, n. 2, p. 69-74, 2006.

FALLON, M. B. et al. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 272, n. 4, p. G779-G784, 1997.

FERENCI, Peter et al. Hepatic encephalopathy—definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. **Hepatology**, v. 35, n. 3, p. 716-721, 2002.

FERREIRA, L.G.; ANASTÁCIO, L.R.; LIMA, A.S.; CORREIA, M.I.T.D. Desnutrição e inadequação alimentar de pacientes aguardando transplante hepático. **Rev Assoc Med Bras**. 2009. 55(4): 389-93.

FERRER, Isabel; COSTELL, Mercedes; GRISOLÍA, Santiago. Lesch-Nyhan syndrome-like behavior in rats from caffeine ingestion. **FEBS letters**, v. 141, n. 2, p. 275-278, 1982.

FREEDMAN, Neal D. et al. Coffee intake is associated with lower rates of liver disease progression in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 50, n. 5, p. 1360-1369, 2009.

FRENCH METAVIR COOPERATIVE STUDY GROUP; BEDOSSA, P. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 20, n. 1, p. 15-20, 1994.

FRIEDMAN, Scott L. Liver fibrosis—from bench to bedside. **Journal of hepatology**, v. 38, p. 38-53, 2003.

FRIEDMAN, Scott L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Gastroenterology**, v. 134, n. 6, p. 1655-1669, 2008.

GARRIDO, Maria et al. Vigilance and wake EEG architecture in simulated hyperammonaemia: a pilot study on the effects of L-Ornithine-L-Aspartate (LOLA) and caffeine. **Metabolic brain disease**, v. 31, n. 4, p. 965-974, 2016.

GIANNOUSIS, Ioannis P. et al. The burden and recent epidemiological changes of the main chronic liver diseases in a Greek referral tertiary centre. **European journal of gastroenterology & hepatology**, v. 22, n. 2, p. 172-179, 2010.

GINÉS, Pere et al. Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. **Hepatology**, v. 7, n. 1, p. 122-128, 1987.

GINÈS, Pere et al. Experimental models of cirrhosis and ascites. **Ascites and renal dysfunction in liver disease**, p. 215, 2005.

GONCALVES, Patricia Lofego et al. Etiology of liver cirrhosis in Brazil: chronic alcoholism and hepatitis viruses in liver cirrhosis diagnosed in the state of Espfrito Santo. **Clinics**, v. 68, n. 3, p. 291-295, 2013.

GONZALEZ-GALLEGO, J.; ESTELLER, A. El hígado. Fisiopatología de las hepatopatías. In: ESTELLER, A.; CORDERO, M. **Fundamentos de fisiopatología**. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana, 1998.

GORDILLO-BASTIDAS, Daniela et al. Nrf2 and Snail-1 in the prevention of experimental liver fibrosis by caffeine. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 19, n. 47, p. 9020, 2013.

GUILHERMITTI, Ana Carolina. Comportamento de filhotes de rato (*Rattus norvegicus*) em um campo aberto na presença e na ausência de animais adultos. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. p. 56. 2011

HABIBI ASL, Bohloul; ABDELALIPUR, Reza; SHAHIDI, Mehrdad. Effects of Caffeine on Morphine Tolerance and Analgesia in Mice. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 99-106, 2011.

HÄUSSINGER, D.; SCHLIESS, F. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. **Gut**, v. 57, n. 8, p. 1156-1165, 2008.

HÄUSSINGER, Dieter et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema?. **Journal of hepatology**, v. 32, n. 6, p. 1035-1038, 2000.

HÄUSSINGER, Dieter. Hepatocyte heterogeneity in glutamine and ammonia metabolism and the role of an intercellular glutamine cycle during ureogenesis in perfused rat liver. **European Journal of Biochemistry**, v. 133, n. 2, p. 269-275, 1983.

HAZELL, Alan S.; BUTTERWORTH, Roger F. Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms. **Proceedings of the society for experimental biology and medicine**, v. 222, n. 2, p. 99-112, 1999.

HERRINE, Steven K. **Jaundice**. 1. 2018. Disponível em: <<https://www.msdmanuals.com/professional/hepatic-and-biliary-disorders/approach-to-the-patient-with-liver-disease/jaundice>>. Acesso em: 04 set. 2018.

HIRODE, Grishma; VITTINGHOFF, Eric; WONG, Robert J. Increasing Burden of Hepatic Encephalopathy Among Hospitalized Adults: An Analysis of the 2010–2014 National Inpatient Sample. **Digestive diseases and sciences**, p. 1-10, 2019.

HUXLEY, Rachel et al. Coffee, decaffeinated coffee, and tea consumption in relation to incident type 2 diabetes mellitus: a systematic review with meta-analysis. **Archives of internal medicine**, v. 169, n. 22, p. 2053-2063, 2009.

IIDA, V.H.; SILVA, T.J.A.; SILVA, A.S.F.; SILVA, L.F.F.; ALVES, V.A.F. **Cirrose hepática: aspectos morfológicos relacionados às suas possíveis complicações. Um estudo centrado em necropsias.** J Bras Patol Med Lab. Fevereiro 2005. v. 41, n. 1, p. 29-36.

JAMES, Jack E. Critical review of dietary caffeine and blood pressure: a relationship that should be taken more seriously. **Psychosomatic medicine**, v. 66, n. 1, p. 63-71, 2004.

JORDA, A. et al. Effect of caffeine on urea biosynthesis and some related processes, ketone bodies, ATP and liver amino acids. **Biochemical pharmacology**, v. 38, n. 16, p. 2727-2732, 1989.

JOVER, Rodrigo et al. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: a model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. **Hepatology**, v. 43, n. 6, p. 1257-1266, 2006.

KAMATH, P.S.; WIESNER, R.H.; MALINCHOC, M.; KREMERS, W.; THERNEAU, T.M.; KOSBERG, C.L.; D'AMICO; DICKSON, E.R.; KIM, W.R. **A model to predict survival in patients with endstage liver disease.** Hepatology. 2001. 33:464-70.

KARIN, Daniel et al. The characteristics of activated portal fibroblasts/myofibroblasts in liver fibrosis. **Differentiation**, v. 92, n. 3, p. 84-92, 2016.

KHUNGAR, Vandana; POORDAD, Fred. Hepatic encephalopathy. **Clinics in liver disease**, v. 16, n. 2, p. 301-320, 2012.

KLATSKY, Arthur L. et al. Coffee, cirrhosis, and transaminase enzymes. **Archives of internal medicine**, v. 166, n. 11, p. 1190-1195, 2006.

KOUNTOURAS, Jannis; BILLING, Barbara H.; SCHEUER, Peter J. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. **British journal of experimental pathology**, v. 65, n. 3, p. 305, 1984.

KUMAR, Vinay; ASTER, Jon C.; ABBAS, Abbas. **Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças.** Elsevier Brasil, 2015.

LA VECCHIA, Carlo. Coffee, liver enzymes, cirrhosis and liver cancer. **Journal of hepatology**, v. 42, n. 4, p. 444-446, 2005.

LAI, Gabriel Y. et al. The association of coffee intake with liver cancer incidence and chronic liver disease mortality in male smokers. **British journal of cancer**, v. 109, n. 5, p. 1344, 2013.

LEE, William M.; STRAVITZ, R. Todd; LARSON, Anne M. Introduction to the revised American Association for the Study of Liver Diseases Position Paper on acute liver failure 2011. **Hepatology**, v. 55, n. 3, p. 965-967, 2012.

LOZANO, Ricardo Pardo et al. Caféina: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. **Adicciones**, v. 19, n. 3, p. 225-238, 2007.

MAJETHIA, N. K.; PATIL, M. V.; KALGUTKAR, A. D. A Histo-Pathological Study of Liver in 118 Cases of Cirrhosis. **J Liver**, v. 5, n. 193, p. 2167-0889.1000193, 2016.

MALINCHOC, M.; KAMATH, P.S.; GORDON, F.D.; PEINE, C.J.; RANK, J.; TER BORG, P.C. **A model to predict survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts**. *Hepatology*. 2000. 31:864-71.

MEIJER A and HENSGENS Mesj, Ureagenesis. In: **Metabolic Compartmentation** (Ed. Sies H), pp. 259-286. Academic Press, New York, 1982.

MINCIS, Moysés. **Gastroenterologia & Hepatologia: diagnóstico e tratamento**. 3. ed. São Paulo: Lemos Editorial, 2002. 1033 p.

MODI, Apurva A. et al. Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. **Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 201-209, 2010.

MORAES, Julio de. Gastroenterologia I. In: **Gastroenterologia I**. Sarvier, 1987.

MORIWAKI, Hisataka et al. Hepatic encephalopathy as a complication of liver cirrhosis: an Asian perspective. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 25, n. 5, p. 858-863, 2010.

MURIEL, Pablo; ARAUZ, Jonathan. Coffee and liver diseases. **Fitoterapia**, v. 81, n. 5, p. 297-305, 2010.

MURRAY, Christopher JL et al. The state of US health, 1990-2010: burden of diseases, injuries, and risk factors. **Jama**, v. 310, n. 6, p. 591-606, 2013.

MUZZILLO, D.A.; CORTEZ-PINTO, H. Cirrose Hepática. In: COELHO, J.C.U. **Aparelho Digestivo – Clínica e Cirúrgica / Júlio Coelho**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. v.2, cap. 123, p. 1537-1547.

NADER, Lysandro A.; DE MATTOS, Angelo A.; BASTOS, Gisele AN. Burden of liver disease in Brazil. **Liver International**, v. 34, n. 6, p. 844-849, 2014.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH et al. Guide for the care and use of laboratory animals. **NIH Publication.**, p. 85-123, 1985.

NAWROT, Peter et al. Effects of caffeine on human health. **Food Additives & Contaminants**, v. 20, n. 1, p. 1-30, 2003.

NEHLIG, Astrid. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 4, p. 563-576, 1999.

NELSON, David L.; LEHNINGER, Albert L.; COX, Michael M. **Lehninger principles of biochemistry**. Macmillan, 2008.

OLIVEIRA, Roberta Lorena Bahia de et al. Encefalopatia hepática. **GED gastroenterol. endosc. dig**, v. 26, n. 2, p. 41-54, 2007.

ORELLANA, Myriam et al. Bile duct ligation and oxidative stress in the rat: effects in liver and kidney. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 126, n. 2, p. 105-111, 2000.

PALUSKA, Scott A. et al. Caffeine and exercise. **Curr Sports Med Rep**, v. 2, n. 4, p. 213-219, 2003.

PAN, Weihong; KASTIN, Abba J. The Blood-Brain Barrier Regulatory Roles in Wakefulness and Sleep. **The Neuroscientist**, p. 1073858416639005, 2016.

PAROLA, Maurizio et al. On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 351-359, 1996.

PASTOR, Ana et al. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. **Journal of Hepatology**, v. 27, n. 2, p. 363-370, 1997.

PERES, William et al. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. **Journal of hepatology**, v. 33, n. 5, p. 742-750, 2000.

POFFO, M.R.; SAKAE, T.M.; MOTA, A.; SOUZA, A.R. **Perfil epidemiológico e fatores prognósticos de mortalidade intra-hospitalar de pacientes cirróticos internados no Hospital Nossa Senhora da Conceição**. Arquivos Catarinenses de Medicina. 2009. v. 38, n. 3.

PUGH, R.N.H.; MURRAY-LYON, I.M.; DAWSON, J.L.; PIETRONI, M.C.; WILLIAMS, R. **Transection of the esophagus in bleeding oesophageal varices**. Br J Surg. 1973. 60:648-52.

RAKOSKI, Mina O. et al. Burden of cirrhosis on older Americans and their families: analysis of the health and retirement study. **Hepatology**, v. 55, n. 1, p. 184-191, 2012.

RESENDE, Luiz Antonio de Lima; SPECIALI, José Geraldo. Hepatic encephalopathy: a study of 50 cases. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 42, n. 4, p. 322-329, 1984.

REZAEI, Arezou et al. The effects of N-acetylcysteine on the expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in hepatic fibrosis in bile duct ligated rats. **Hepatology Research**, v. 38, n. 12, p. 1252-1263, 2008.

RIBEIRO, Joaquim A.; SEBASTIAO, Ana M. Caffeine and adenosine. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. s1, p. S3-S15, 2010.

ROCHA DE OLIVEIRA, Cléia et al. Efecto de La quercetina sobre La lesión hepática inducida por bifenilos policlorados en ratas. **Nutrición Hospitalaria**, v. 29, n. 5, p. 1141-1148, 2014.

ROSEN, C.B.; PIMENTEL, S.K. Anatomia e Fisiologia do Fígado. In: COELHO, J.C.U. **Aparelho Digestivo – Clínica e Cirúrgica / Júlio Coelho**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. v.2, cap. 109, p. 1371-1379.

RUBIN, Emanuel et al. **Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1625 p. Tradução de: Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine.

RUHL, Constance E.; EVERHART, James E. Coffee and caffeine consumption reduce the risk of elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. **Gastroenterology**, v. 128, n. 1, p. 24-32, 2005.

SHAH, N. Jon et al. Quantitative cerebral water content mapping in hepatic encephalopathy. **Neuroimage**, v. 41, n. 3, p. 706-717, 2008.

SHERLOCK, Sheila; DOOLEY, James. **Diseases of the liver and biliary system**. John Wiley & Sons, 2008.

SHIM, Sung Gon et al. Caffeine attenuates liver fibrosis via defective adhesion of hepatic stellate cells in cirrhotic model. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 28, n. 12, p. 1877-1884, 2013.

SHIN, Jang-Woo et al. Experimental evidence for the protective effects of coffee against liver fibrosis in SD rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 3, p. 450-455, 2010.

SKAGEN, Catherine; LUCEY, Michael; SAID, Adnan. Liver transplantation: an update 2009. **Current opinion in gastroenterology**, v. 25, n. 3, p. 202-208, 2009.

SMITH, Andrew. Effects of caffeine on human behavior. **Food and chemical toxicology**, v. 40, n. 9, p. 1243-1255, 2002.

SPRIET, Lawrence L. Caffeine and performance. **International journal of sport nutrition**, v. 5, n. s1, p. S84-S99, 1995.

TAG, Carmen G. et al. Bile duct ligation in mice: induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 96, 2015.

THAMPANITCHAWONG, Pornpen; PIRATVISUTH, Teerha. Liver biopsy: complications and risk factors. **World journal of gastroenterology**, v. 5, n. 4, p. 301, 1999.

VAQUERO, Javier et al. Pathogenesis of hepatic encephalopathy in acute liver failure. In: **Seminars in liver disease**. Copyright© 2003 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662, 2003. p. 259-270.

VILSTRUP, Hendrik et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. **Hepatology**, v. 60, n. 2, p. 715-735, 2014.

WALSH, Roger N.; CUMMINS, Robert A. The open-field test: a critical review. **Psychological bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482, 1976.

WONG, Robert J. et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. **Gastroenterology**, v. 148, n. 3, p. 547-555, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. MANAGEMENT OF SUBSTANCE ABUSE UNIT. **Global status report on alcohol and health, 2014**. World Health Organization, 2014.

YAARI, Arie et al. Bromosulfophthalein disposition in chronically bile duct obstructed rats. **Journal of hepatology**, v. 15, n. 1, p. 67-72, 1992.

YOKOTA, Shinichiro et al. Partial Bile Duct Ligation in the Mouse: A Controlled Model of Localized Obstructive Cholestasis. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 133, 2018.