

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**A QUERCETINA PROTEGE O FÍGADO NA LESÃO HEPÁTICA  
INDUZIDA POR TIOACETAMIDA (TAA) E SUAS COMPLICAÇÕES**

*Cíntia de David*

Porto Alegre – RS, 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**A QUERCETINA PROTEGE O FÍGADO NA LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR  
TIOACETAMIDA (TAA) E SUAS COMPLICAÇÕES**

*Cíntia de David*

Tese de Doutorado apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Fisiologia da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul

**Orientador(a):** Profa. Dra. Norma Possa  
Marroni

Porto Alegre – RS, 2011.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Hepatologia Experimental e Fisiologia do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Laboratório de Fisiologia e Biologia Molecular do Instituto de Biomedicina da Universidade de León – Espanha.

Subvenção do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), processo número 07-066, e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

## AGRADECIMENTOS

Aos meus super pais, pela dedicação, carinho, exemplo e incentivo constantes, que me dão forças para seguir sempre adiante.

Aos meus irmãos e cunhadas, pelo apoio e compreensão.

Ao meu namorado, Eduardo, simplesmente por tudo. Obrigada por cada palavra, cada gesto, e cada momento ao meu lado. Teu apoio é fundamental.

À minha sogra querida, D. Marta; à “Dinda”, Suzana, e ao cunhado Luiz Fernando, pelo carinho e incentivo.

À Profa. Dra. Norma Marroni, pela oportunidade de amadurecimento, pelos ensinamentos e incentivos ao longo deste doutorado.

Ao Prof. Dr. Cláudio Augusto Marroni, por sua contribuição neste trabalho.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Hepatologia Experimental – Fisiologia, pelo apoio e companheirismo.

Aos amigos e companheiros Rafael, Lidiane, Graziella e Sílvia, pela ajuda efetiva na realização deste trabalho; pelo apoio, carinho e amizade em todos os momentos.

Aos funcionários da Unidade de Experimentação Animal e Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo suporte para realização desta pesquisa.

À Dr<sup>a</sup> Luise Meurer, pela dedicação e competência.

À colega Greice Borghetti, pela contribuição na realização do experimento, pela troca de conhecimentos e pelo incentivo.

A toda equipe do Instituto de Biomedicina da Universidad de León, em especial à Dra. Maria Jesus Tuñon, à Irene, Beatriz, Suzana, Maria Jesus, Sara, Raquel, Javi.

Aos amigos de León: Carolina, Maiara, Taiana, Carlos, Irene, Alessandra e Cristiane, pelo apoio, incentivo, carinho e pelos momentos de alegria e em especial ao Félix pelo auxílio, pelos ensinamentos e ajuda que foram fundamentais.

À equipe do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, pela disposição e auxílio.

Às amigas Anna Paula Oliveira, Ana Carolina Ritter e Melissa Camassola, pela troca de experiências, pelo carinho, amizade e apoio ao longo da minha vida de pós-graduação.

Aos amigos do Laboratório de Células-Tronco e Terapia Celular da Ulbra, pelo apoio e amizade.

Às amigas Lília, Carolina, Nádia e Priscila, pelo apoio, pela amizade e pelos momentos de descontração.

## RESUMO

A ocorrência de lesão hepática induzida por drogas representa um problema de saúde crescente e um desafio para os médicos, órgãos reguladores e a indústria farmacêutica, não só devido à sua potencial gravidade, mas também porque muitas vezes é diagnosticada de forma imprecisa, e outras vezes não são declaradas. Estudos sobre o metabolismo de drogas, juntamente com avaliações patológicas e histológicas, fornecem conjuntos de dados importantes para ajudar a compreender mecanismos subjacentes à hepatotoxicidade da droga. Neste estudo avaliamos a participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e do estresse oxidativo, bem como o envolvimento da sinalização intracelular relacionada ao processo de apoptose, através da ativação de membros da família Bcl-2 (Bcl-2 e Bax) e da família das MAPKs (p-ERK1/2), na hepatotoxicidade induzida por tioacetamida (TAA). Ratos machos Wistar foram divididos em 4 grupos experimentais: CO (controle); CO + Q (controle + quercetina); TAA (tioacetamida) e TAA + Q (tioacetamida + quercetina). Nos grupos que receberam TAA, administraram-se duas doses de 350 mg/Kg de TAA em ratos, em intervalo de 8 horas e, 2 horas após a segunda dose, iniciou-se o tratamento com quercetina (50 mg/Kg). Os grupos tratados com quercetina receberam o flavonóide intraperitonealmente por 4 dias, quando os animais foram mortos para análises de enzimas séricas (AST e ALT) e análises morfológicas, bioquímicas e moleculares de amostras de fígado. Os grupos que receberam TAA mostraram um aumento significativo nas aminotransferases séricas acompanhado de alterações morfológicas, com presença de necrose perivenular em absorção, infiltrado inflamatório com linfócitos e macrófagos e eventuais células gigantes multinucleadas. Além disso, estes animais apresentaram aumento da lipoperoxidação e dos metabólitos de óxido nítrico (nitritos e nitratos) no fígado, com alterações na atividade das enzimas antioxidantes e na expressão das enzimas na apoptose das células hepáticas, Bax, Bcl-2 e pERK1/2. O tratamento com quercetina por 4 dias mostrou níveis séricos significativamente reduzidos de AST e ALT, e as alterações morfológicas foram amplamente prevenidas. A administração de quercetina mostrou também uma redução da lipoperoxidação hepática, bem como dos níveis de metabólitos de óxido nítrico. Também observou-se retorno no equilíbrio das defesas antioxidantes e aumento das enzimas antiapoptóticas em relação às pró-apoptóticas. Os resultados obtidos sugerem efeito protetor da quercetina em ratos com lesão hepática induzida por TAA.

## ABSTRACT

Drug-induced liver injury is an increasing health problem and a challenge for physicians, regulatory bodies and the pharmaceutical industry, not only because of its potential severity and elusive pathogenesis but also because it is often inaccurately diagnosed, commonly missed entirely and more often not reported. Drug metabolism studies, together with pathologic and histologic evaluation, provide critical data sets to help understand mechanisms underlying drug-related hepatotoxicity. We evaluated the involvement of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress, as well as the intracellular apoptosis via activation of the Bcl-2 (Bcl-2 and Bax) and MAPK (p-ERK 1/2) signaling pathway on the thioacetamide (TAA)-induced hepatotoxicity. Male Wistar rats were divided into four groups: CO (control), CO + Q (control + quercetin), TAA (thioacetamide) and TAA + Q (thioacetamide + quercetin). TAA group was administered intraperitoneally (i.p.) two doses of TAA (350 mg / kg) in the range of 8 hours, while TAA + Q group was administered i.p. quercetin (50 mg / kg), 2h after administration of thioacetamide (50 mg / kg). This group received flavonoid quercetin during 4 days, when animals were killed for analysis of serum enzymes (AST and ALT) and morphological, biochemical and molecular study of liver samples. The group receiving TAA showed a significant increase in serum aminotransferases accompanied by morphological changes, with extensive necrosis and inflammatory infiltration, mainly in the centrilobular region and portal tract. Moreover, these animals showed increased lipid peroxidation and nitric oxide metabolites (nitrites and nitrates) in the liver and changes in antioxidant enzyme activity, as well as expression of apoptotic enzymes in the liver cells (Bax, Bcl-2 and pERK1 / 2). After 4 days treatment with quercetin, rats showed significantly reduced AST and ALT serum levels, with the morphological changes largely prevented. The administration of quercetin also showed a reduction of lipid peroxidation and in the levels of nitric oxide metabolites. It was observed a balance between antioxidant defense systems and production of ROS and increased ratio of anti- versus pro-apoptotic enzymes. The results suggest a protective effect of quercetin in rats with TAA-induced liver disease.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Importantes espécies reativas no sistema biológico .....	35
Tabela 2 – Valores das enzimas de integridade hepática no soro dos diferentes grupos experimentais. ....	57
Tabela 3 – Valores das enzimas antioxidantes no fígado de animais dos diferentes grupos experimentais. ....	60

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização do fígado, esquema da circulação hepática e estrutura lobular. ....	17
Figura 2 – Estrutura tridimensional do lóbulo hepático, formado por células hepáticas (hepatócitos) agrupadas em torno de uma veia central .....	18
Figura 3 – Ácino hepático dividido em três zonas, com base na função metabólica. Zona 1 (periportal) localiza-se mais próxima do trato portal e recebe a maior parte do sangue oxigenado, enquanto a zona 3 (centrolobular) está mais distante, recebendo a menor quantidade de sangue oxigenado. A zona 2 é a zona intermediária. ....	23
Figura 4 - Complexidade da lesão hepática induzida por drogas .....	26
Figura 5 – Ilustração do modelo proposto para a Lesão Hepática Induzida por Drogas .....	29
Figura 6 – Metabolismo da Tioacetamida. ....	33
Figura 7- Metabolismo do NO e formação dos metabólitos NO <sub>2</sub> e NO <sub>3</sub> .....	38
Figura 8 – Ativação de vias de sinalização do estresse oxidativo. ....	40
Figura 9 - Estrutura básica dos flavonóides .....	43
Figura 10 – Estrutura da molécula de quercetina .....	44
Figura 11 – Esquema representativo do modelo experimental .....	50
Figura 12 – Histologia de cortes de fígado de animais do grupo controle (A), controle + quercetina (B), com lesão hepática por TAA (C) e TAA tratados com quercetina (D), evidenciando o espaço porta, em aumento original de 200X. ....	58
Figura 13 - Valores de TBARS em fígados de ratos após uso de TAA e quercetina. Resultados representados pela media ± desvio padrão. a Diferença significativa entre o grupo TAA e os grupos CO, Q e TAA+ Q, considerando $p \leq 0.05$ . b Diferença significativa entre o grupo TAA+ Q e os grupos CO, Q e TAA, considerando $p \leq 0.05$ . ....	59
Figura 14 – Quantificação dos níveis de nitritos e nitratos em fígado de animais com toxicidade hepática por TAA e tratados com quercetina. Resultados representados pela media ± desvio padrão. a Diferença significativa entre o grupo TAA e os grupos CO, Q e TAA+ Q, considerando $p \leq 0,05$ . ....	61

Figura 15 – Expressão das proteínas Bax e Bcl-2. Os Resultados representados pela media  $\pm$  desvio padrão. a Diferença significativa entre o grupo TAA e os grupos CO, Q e TAA+ Q, considerando  $p \leq 0.05$ . .....62

Figura 16– Expressão da proteína p-ERK1/2. Resultados representados pela media  $\pm$  desvio padrão. a Diferença significativa entre o grupo TAA e os grupos CO, Q e TAA+ Q, considerando  $p \leq 0,05$ . .....63

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu$	Micra
$\mu\text{g}$	Microgramas
$\mu\text{L}$	Microlitro
A	Alfa
U/mL	Unidades por mililitro
mg/mL	Miligrama por mililitro
mg/Kg	Miligrama por kilograma
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercúrio
Nm	Nanômetro
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
Bax	Proteína X associada à Bcl-2
Bcl-2	Linfoma de células B 2
Bid	Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2
$\text{Ca}^{+2}$	Íon cálcio
CAT	Catalase
células NK	células <i>natural killer</i> ou “exterminadoras naturais”
$\text{CCl}_4$	Tetracloroeto de Carbono
$\text{CHCl}_3$	Triclorometano
CO	Controle
$\text{Cu}^{2+}$	Íon cobre
$\text{CuSO}_4$	Sulfato de cobre
CuZnSOD	Sod cobre-zinco
P450s	Monooxigenases do citocromo P450
P4502E1	Monooxigenases do citocromo P450 do tipo 2E1
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECL	Eletroquimioluminescente
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK	Quinase Reguladora de Sinal Extracelular
ERK1/2	Quinase Reguladora de Sinal Extracelular tipo 1 e 2
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FMOs	Monooxigenases dependentes de flavina

Fe <sup>2+</sup>	Íon ferroso
Fe <sup>3+</sup>	Íon férrico
FeSOD	SOD ferro
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GAPDH	Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione reduzida
HE	Hematoxilina e eosina
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HO <sup>•</sup>	Radical Hidroxil
HOCl	Ácido hipocloroso
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IFN-γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina -1
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
JNK	Cínase do N-Terminal do c-Jun
KCl	Cloreto de Potássio
KDa	Kilodalton
LDBC	Ligadura de ducto biliar comum
LPS	Lipopolissacarideo
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MAOs	Monoamina oxidases
MCP-1	Proteína Quimiotática de monócitos 1
MDA	Malondialdeído
MnSOD	SOD manganês
NAC	N-acetilcisteína
NaCl	Cloreto de Sódio
NADP <sup>+</sup>	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida Adenina;
NADPH	Nicotinamida dinucleotídeo fosfato reduzido
NAPQI	N-acetil-p-benzoquinona
NaOH	Hidróxido de sódio
NFκB	Fator de Transcrição kappa B
nm	Nanômetro
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	Nitrito
NO <sub>3</sub>	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintetase
NOx	Metabólitos do Óxido Nítrico
O <sub>2</sub>	Oxigênio

O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	Radical superóxido
OH•	Radical hidroxil
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
P450	Monooxigenases do citocromo P450
p65	Subunidade p65 do NFκB
p38	Proteína p38 MAPK
PBS	Buffer fosfato
PM	Peso molecular
p-ERK	Quinase Reguladora de Sinal Extracelular fosforilada
Q	Quercetina
RAMs	Reações adversas a medicamentos
RL	Radical livre
rpm	Rotações por minuto
SNAC	S-nitros-N-acetilcisteína
SOD	Superóxido dismutase
TAA	Tioacetamida
TAA + Q	Tioacetamida + Quercetina
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias que reagem ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
ZnCl <sub>2</sub>	Clorato de Zinco

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
1.1 ESTRUTURA E LOCALIZAÇÃO DO FÍGADO .....	17
1.2 BIOTRANSFORMAÇÃO DE XENOBIÓTICOS .....	19
<b>1.2.1 Biotransformação de xenobióticos – Fase I</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2.2 Biotransformação de xenobióticos – Fase II</b> .....	<b>20</b>
1.3 LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR DROGAS .....	24
<b>1.3.1 Tipos de Lesão Hepática Induzida por Drogas</b> .....	<b>26</b>
<b>1.3.2 Vias Comuns de Lesão Hepática Induzida por Drogas</b> .....	<b>27</b>
<b>1.3.3 Mecanismos Gerais de Dano na Lesão Hepática Induzida por Drogas</b> .....	<b>28</b>
1.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA POR DROGAS .....	30
<b>1.4.1 Tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>)</b> .....	<b>30</b>
<b>1.4.2 Paracetamol</b> .....	<b>31</b>
<b>1.4.3 Tioacetamida</b> .....	<b>32</b>
1.5 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO .....	35
<b>1.5.1 Óxido Nítrico</b> .....	<b>37</b>
1.6 ESTRESSE OXIDATIVO E AGENTES TÓXICOS .....	39
1.7 DEFESAS ANTIOXIDANTES .....	41
<b>1.7.1 Flavonóides</b> .....	<b>42</b>
<b>1.7.2 Quercetina</b> .....	<b>43</b>
<b>2 OBJETIVOS DO ESTUDO</b> .....	<b>47</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	47
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>48</b>
3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA .....	48
3.2 FLAVONÓIDE QUERCETINA .....	48
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	48
<b>3.3.1 Animais</b> .....	<b>48</b>
<b>3.3.2 Grupos Experimentais</b> .....	<b>49</b>
<b>3.3.3 Procedimentos Experimentais</b> .....	<b>50</b>

3.3.3.1	Indução do Dano Hepático por Tioacetamida .....	50
3.3.3.2	Administração de Quercetina e do Veículo .....	50
3.3.3.3	Morte dos Animais e Obtenção das Amostras de Tecido e Sangue .....	51
3.3.3.4	Histologia.....	51
3.3.3.5	Preparação do Homogeneizado.....	52
3.3.3.6	Dosagem de Proteína.....	52
3.3.3.7	Detrminação das Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico.....	53
3.3.3.8	Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD).....	53
3.3.3.9	Atividade da Enzima Catalase (CAT) .....	54
3.3.3.10	Atividade da Enzima Glutathiona Peroxidase (GPx) .....	54
3.3.3.11	Avaliação dos Metabólitos do Óxido Nítrico (NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub> ) .....	55
3.3.3.12	Western Blot.....	56
3.3.3.13	Análise Estatística .....	56
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
4.1	EFEITOS DA TAA E DA QUERCETINA NAS ENZIMAS HEPÁTICAS .....	57
4.2	EFEITOS DA TAA E DA QUERCETINA NA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPÁTICAS.....	58
4.3	EFEITOS DA TAA E DA QUERCETINA NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA .....	59
4.4	EFEITOS DA TAA E DA QUERCETINA SOBRE AS ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	60
4.5	EFEITOS DA TAA E DA QUERCETINA SOBRE OS NÍVEIS DE NITRITOS E NITRATOS .....	61
4.6	EFEITOS DA TAA E DA QUERCETINA NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO PROCESSO DE APOPTOSE .....	62
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>74</b>
6.1	CONCLUSÃO GERAL .....	75
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>

## **APRESENTAÇÃO**

Esta tese compõe-se de um experimento que utiliza o modelo de toxicidade hepática, desenvolvido a partir de duas injeções intraperitoneais do hepatotóxico Tioacetamida. Avaliou-se o papel do flavonóide quercetina sobre o fígado dos animais com lesão hepática induzida por Tioacetamida com o objetivo de verificar seus efeitos sobre a toxicidade da droga.

## INTRODUÇÃO

O fígado desempenha muitas funções vitais. Ele é essencial na regulação do metabolismo, na síntese de proteínas e de outras moléculas, no armazenamento de proteínas e de ferro, na degradação dos hormônios e na inativação e excreção de drogas e de toxinas (BERNE et al., 2004).

Localizado como um filtro entre o sistema digestivo e o resto do organismo, o fígado recebe diariamente um fluxo de nutrientes e de substâncias potencialmente tóxicas, que chegam ao órgão pela circulação sanguínea. Além do sangue arterial, rico em oxigênio, que chega ao fígado pela artéria hepática, o fígado recebe a maior parte do seu sangue por uma segunda via: a veia porta. Através da veia porta, o sangue proveniente do intestino, baço e pâncreas chega ao fígado e, depois de passar pelos sinusóides hepáticos, escoam para as veias hepáticas e volta à circulação sistêmica pela veia cava (GUYTON; HALL, 1996).

O frequente envolvimento do fígado na toxicidade induzida por drogas se deve a sua localização anatômica (o fígado é a principal porta de entrada para as drogas ingeridas) e às suas funções fisiológicas e bioquímicas, em função da abundância de enzimas do metabolismo (OSTAPOWICZ et al., 2002; LEE, 2003a).

A lesão hepática grave induzida por drogas, levando à insuficiência hepática, transplante ou à morte é um evento raro. Na maior parte dos casos, o dano é imprevisível e sua patogênese ainda pouco compreendida. No entanto, representa um importante problema de saúde, pois, embora a incidência de lesão hepática induzida por drogas idiossincrásica com medicamentos aprovados e em doses terapêuticas seja relativamente baixa e estimada em 1 por 10.000 a 1 por 100.000 pacientes tratados, cada sétimo caso de insuficiência hepática aguda se deve a uma reação adversa ao medicamento; e a doença hepática induzida por drogas tornou-se a principal causa de transplante hepático super-urgente (DE ABAJO, et al., 2004; CHALASANI et al., 2008; BELL, CHALASANI, 2009).

A hepatotoxicidade induzida por drogas é também o mais comum evento adverso que interrompe o desenvolvimento de um novo medicamento ou leva à retirada de medicamentos autorizados do mercado. Devido à baixa incidência de doença hepática induzida por drogas, o potencial hepatotóxico de uma droga normalmente não é reconhecido durante os ensaios de pré-comercialização, e só se

manifesta depois de a droga ter sido comercializada e utilizada por muito mais pacientes do que os incluídos em ensaios clínicos (LASSER et al., 2002; TEMPLE, HIMMEL, 2002). Mais de 1000 medicamentos e produtos fitoterápicos têm sido associados com a hepatotoxicidade idiossincrásica (BJOUR et al., 2004; STICKEL et al., 2005).

A idiossincrasia refere-se a diferenças inter-individuais na resposta aos estímulos, devido a fatores genéticos e ambientais. Nem todos os pacientes tratados respondem a uma droga em particular e somente uma fração desenvolve efeitos adversos graves. “Idiossincrásico” não implica que seja independente da dose tampouco significa necessariamente raro, mas isso indica uma reação que pode não ser vista regularmente (STIRNIMANN et al., 2010).

Atualmente, estudos na área da genética e da toxicologia têm proporcionado nova compreensão da hepatotoxicidade das drogas. No entanto, as complexas interações das hepatotoxinas com os fatores de risco genéticos e ambientais responsáveis pelo aparecimento das lesões tóxicas ainda precisam ser elucidadas. A identificação de novos fatores de risco e uma melhor compreensão dos mecanismos patogénéticos certamente implicarão melhorias na assistência médica e na evolução farmacêutica no futuro próximo. Assim, a melhor compreensão dos mecanismos que contribuem para o dano hepático induzido por drogas pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias de tratamento.

## 1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 ESTRUTURA E LOCALIZAÇÃO DO FÍGADO

O fígado é o maior órgão visceral do corpo e está principalmente localizado no quadrante abdominal superior direito e na região epigástrica, estendendo-se para o quadrante abdominal superior esquerdo (Figura 1). Anatomicamente, é dividido em lobos direito e esquerdo por fossas para a vesícula biliar e a veia cava inferior. O suprimento arterial para o fígado inclui a artéria hepática direita, a partir da artéria hepática própria (um ramo da artéria hepática comum a partir do tronco celíaco; e a artéria hepática esquerda, a partir da artéria hepática própria (um ramo da artéria hepática comum a partir do tronco celíaco) (MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010).

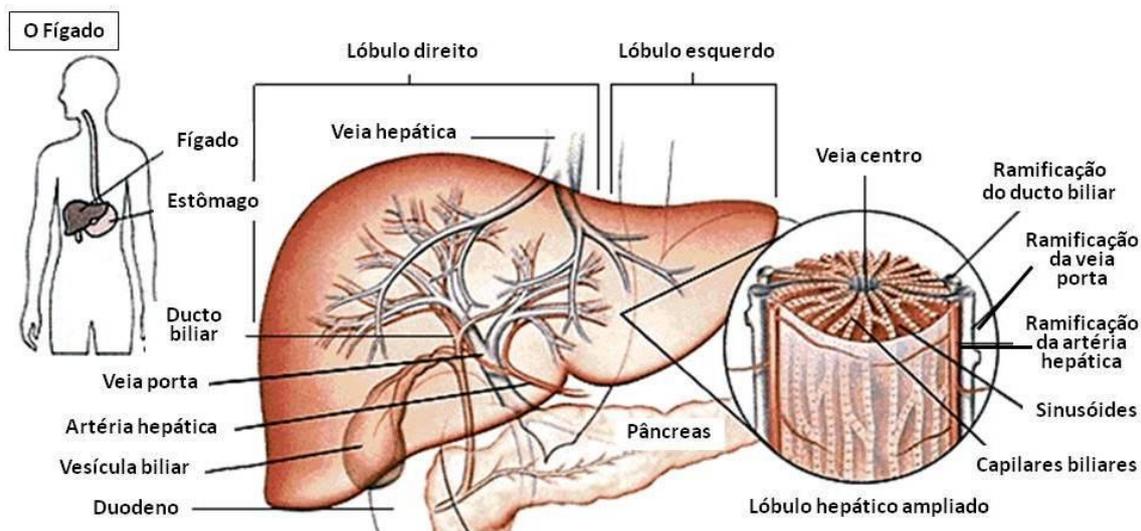


Figura 1 – Localização do fígado, esquema da circulação hepática e estrutura lobular.  
 Fonte: <http://library.thinkquest.org/28807/data/excr21.htm>; acesso em 1/dez/2010.

A drenagem venosa de baço, pâncreas, vesícula biliar e parte abdominal do trato gastrointestinal, com exceção da parte inferior do reto, ocorre através do sistema portal de veias, que distribui o sangue a partir dessas estruturas para o fígado. Depois que o sangue passa através dos sinusóides hepáticos, ele atravessa progressivamente as veias maiores, até entrar nas veias hepáticas, que retornam o

sangue venoso para a veia cava inferior imediatamente abaixo do diafragma (MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010).

O fígado é um órgão de imensa complexidade, essencial para a sobrevivência do homem. Nenhum outro órgão pode compensar a sua multiplicidade de funções. Vários tipos de células fenotipicamente distintas compõem o fígado (Figura 2). A célula hepática predominante é o hepatócito, uma célula epitelial responsável por regular o metabolismo intermediário, desintoxicar endo e xenobióticos, sintetizar proteínas e lipídeos, além de produzir e excretar a bile. O outro tipo de célula do fígado é o colangiócito, célula epitelial dos dutos biliares que modula o fluxo biliar (SIRICA et al., 2008).

Os hepatócitos encontram-se rodeados de capilares sinusóides e de vasos linfáticos. Isto faz com que o sangue flua livremente para as células e que os produtos celulares secretados no espaço perisinusoidal de Disse possam ser liberados de volta no sangue ou nos vasos linfáticos. As células de Kupffer são macrófagos fixos nas membranas dos sinusóides e podem ser encontradas em todo o fígado. À medida que o sangue vai atravessando o fígado, os eritrócitos envelhecidos ou danificados são fagocitados pelas células de Kupffer. Os hepatócitos metabolizam hormônios e drogas e removem o “lixo”, detoxificando o sangue. Os hepatócitos produzem também a bile e eletrólitos que drenam nos canaliculos biliares, os quais levam ao ducto biliar (MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010).

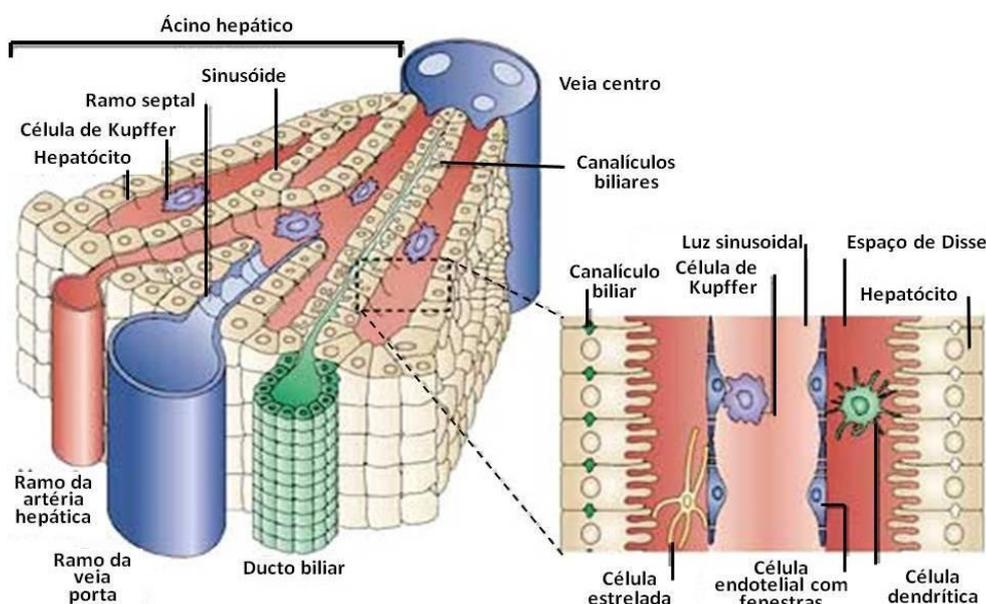


Figura 2 – Estrutura tridimensional do lóbulo hepático, formado por células hepáticas (hepatócitos) agrupadas em torno de uma veia central  
Fonte: Adams e Eksteen, 2006.

Em condições normais, o fígado contém aproximadamente 400 mL de sangue, o que representa cerca de 8% do volume total do sangue. Isso ilustra o aspecto de reserva de sangue do fígado. Dois fatores críticos para o funcionamento adequado do sistema são os fatos de a pressão sanguínea no fígado ser muito baixa, aproximadamente 1 mmHg, e de não haver obstrução do fluxo sanguíneo nos sinusóides hepáticos. Isso permite que o sangue flua livremente através do fígado e fora dele para dentro da veia porta (Figura 2). Se houver obstrução do fluxo no fígado (cirrose, hepatite, toxicidade) ou aumento da pressão venosa hepática (insuficiência cardíaca congestiva), o sangue retorna e a pressão sobe, causando hipertensão portal (MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010).

## 1.2 BIOTRANSFORMAÇÃO DE XENOBIÓTICOS

A principal função do fígado é a biotransformação de substâncias não-polares em compostos polares que podem ser facilmente excretados através da bile ou na urina. Nas reações de conjugação, a ligação da glutatona, glucuronato, ou sulfato a metabólitos tóxicos produz substâncias não-tóxicas que podem ser excretadas na urina ou bile. Estoques inadequados destas moléculas podem comprometer uma desintoxicação eficaz de metabólitos reativos (WILLIAMS et al., 2002).

O frequente envolvimento do fígado na toxicidade induzida por drogas se deve à sua localização anatômica (o fígado é a principal porta de entrada para as drogas ingeridas) e às suas funções fisiológicas e bioquímicas, em função da abundância de enzimas por ele metabolizadas (GRATTAGLIANO et al., 2009). Normalmente, o metabolismo das drogas ocorre em duas fases: Fase I e Fase II.

### 1.2.1 Biotransformação de xenobióticos – Fase I

A Fase I da biotransformação é a via oxidativa na qual o composto é oxidado a uma substância mais polar. As enzimas de fase I catalisam reações que geralmente resultam na introdução de um grupo funcional na molécula de substrato.

Enzimas envolvidas nas reações de fase I são: monooxigenases do citocromo P450 (ou somente P450), monooxigenases dependentes da flavina (FMOs), monoamina oxidases (MAOs), esterases, amidases, desidrogenases, isomerases e hidrolases (SCHROER et al., 2010).

As citocromo P450 monooxigenases desempenham o papel mais importante no metabolismo de drogas humano, uma vez que cerca de 75% do metabolismo da droga é mediado pelas enzimas do citocromo P450 (GUENGERICH, 2006). O termo citocromo P450 engloba um grupo de hemeoproteínas que, quando reduzidas e complexadas com monóxido de carbono, exibem um pico de absorção de luz em 450 nm (OMURA; SATO, 1964).

Em eucariotos, ocorrem várias isoformas do citocromo P450, que se apresentam ligadas à membrana mitocondrial ou, em sua maioria, ao retículo endoplasmático. O sistema enzimático P450 humano consiste em um grande número de enzimas diferentes que demonstram variação individual em sua atividade, e que são suscetíveis à indução e inibição por uma série de compostos. Isso resulta em interações medicamentosas diversas e em um maior risco de lesão hepática induzida por diferentes drogas (GOEPTAR et al., 1995).

Na fase I, portanto, há processos de oxidação, redução ou hidrólise. Em geral, os fármacos circulam ligados às proteínas e muitos são absorvidos apenas em parte, não atingindo integralmente a circulação sanguínea, sendo removidos principalmente em sua passagem inicial pelo fígado (FARRELL, 1994).

### **1.2.2 Biotransformação de xenobióticos – Fase II**

O processo acima referido é seguido pelas reações de Fase II que, em geral, são reações conjugativas e resultam na formação de compostos solúveis, que são mais rapidamente excretados (GRAHAM; PETERSON, 1999; WERCK-REICHHART; FEYEREISEN, 2001). Ocorre a conjugação dos metabólitos ou da própria substância com aminoácidos, sulfatos, grupos metílicos e com o ácido glicurônico. Alguns fármacos só utilizam essa fase sendo conjugados diretamente (PESSAYRE, 1995).

As reações de biotransformação geralmente seguem o processo de detoxificação, resultando em metabólitos inativos (WILLIAMS et al, 2002). No entanto, muitos intermediários das drogas gerados durante o metabolismo são altamente reativos e tóxicos, podendo causar hepatotoxicidade (PARK et al., 2005).

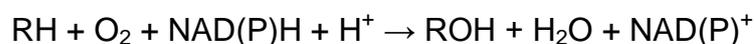
Vários fatores podem influenciar a resposta das células a um insulto tóxico, e a extensão do dano resulta da intervenção de fatores celulares intrínsecos e extrínsecos (PESSAYRE; LARREY, 1988). Fatores genéticos: cada enzima do sistema P450 tem um local de adesão ao substrato que lhe é específico, e a eficácia da metabolização das drogas é influenciada por variações genéticas. Isso justifica a variação metabólica individual, como ocorre com a isoniazida e os contraceptivos orais (ZIMMERMAN, 1999).

Interações medicamentosas: a atividade do P450 é alterada com o uso concomitante de drogas que competem entre si em uma mesma ligação enzimática, de modo que aqueles com menor afinidade têm metabolização mais lenta, aumentando a hepatotoxicidade. O uso crônico de etanol induz o P450 e aumenta os efeitos tóxicos do paracetamol (ZIMMERMAN, 1995). Doenças hepáticas e também sistêmicas podem alterar o metabolismo hepático de vários medicamentos (SHERLOCK; DOOLEY, 1996).

Basicamente, é o equilíbrio entre a bioativação, detoxificação e os mecanismos de defesa/reparo que determina se um composto irá provocar um efeito tóxico ou não (WILLIAMS et al., 2002).

O fígado é o órgão do organismo preparado para lidar com as toxinas e evitar ou minimizar os danos causados por intermediários reativos tóxicos. Apesar de muitas vias enzimáticas e não enzimáticas de bioativação estarem presentes no fígado, intermediários reativos podem escapar do processo de desintoxicação e dar início a reações em cadeia de radicais. A relação entre a bioativação e a ocorrência de lesão hepática não é simples. Estas espécies reativas podem, direta ou indiretamente, causar uma lesão tóxica na célula e iniciar uma reação imunológica mediada (LEE, 2003b; WALGREN et al., 2005).

A maior concentração de P450 é encontrada no fígado, embora altas concentrações também possam ser encontradas no intestino e em tecidos supra-renais. Nas células, as enzimas estão localizadas principalmente no retículo endoplasmático. As enzimas do citocromo P450 são proteínas ligadas à membrana, que catalisam uma variedade de reações, tais como hidroxilações, epoxidações, e oxidações (CHEFSON; AUCLAIR, 2006). A conversão de moléculas orgânicas por P450 é bastante complexa, mas uma reação de hidroxilação, que é o tipo de reação que ocorre com maior frequência com as P450, pode ser simplesmente representada pela equação a seguir (BERNHARDT, 2006):



O cofator NADPH fornece elétrons através de um mediador, que transfere os elétrons entre NADPH e a P450. Nos mamíferos, os elétrons são normalmente transferidos pela flavoproteína redutase do citocromo P450. Existem 57 diferentes isoenzimas P450 expressas em humanos, mas que não contribuem igualmente para o metabolismo das drogas. Cinco das P450 (1A2, 2C9, 2C19, 2D6 e 3A4) representam a porção principal do conteúdo total de P450 no fígado humano (GUENGERICH, 2003).

Na população humana, o nível de atividade de algumas P450 varia consideravelmente. Este fenômeno pode ser atribuído aos polimorfismos genéticos que foram descritos para algumas isoformas humanas (INGELMAN- SUNDBERG, 2004). Polimorfismos no P450 ou a sua indução/inibição justificam o aparecimento de reações adversas (KAWAMOTO et al., 1999).

Alterações nos níveis das enzimas P450 podem ter um grande impacto sobre o metabolismo de drogas. Estas enzimas são submetidas a múltiplos níveis de regulação e expressão, sendo a expressão das enzimas P450 dominante na zona 3, apenas em torno da veia centrolobular, que pode ser visualizada na figura 3 (SCHUETZ; BEACH, 1994; EGGER et al., 2007). Em geral, as inúmeras formas de P450 são expressas e induzidas principalmente nos hepatócitos localizados na região perivenosa (ou centrolobular) (Figura 3), que se encontra mais próxima às veias hepáticas terminais, recebendo sangue por último.

Uma característica fundamental do zoneamento metabólico é a sua flexibilidade: a distribuição de diversas enzimas varia em diferentes condições fisiológicas e patológicas, principalmente como um resultado da adaptação funcional dos hepatócitos às mudanças nas demandas metabólicas do organismo. Glicólise, síntese de glicogênio a partir de glicose, liponeogênese, cetogênese, formação de glutamina, e metabolismo de xenobióticos, incluindo reações de conjugação, são todos processos, preferencialmente localizados nos hepatócitos perivenosos (OINONEN; LINDROS, 1998).

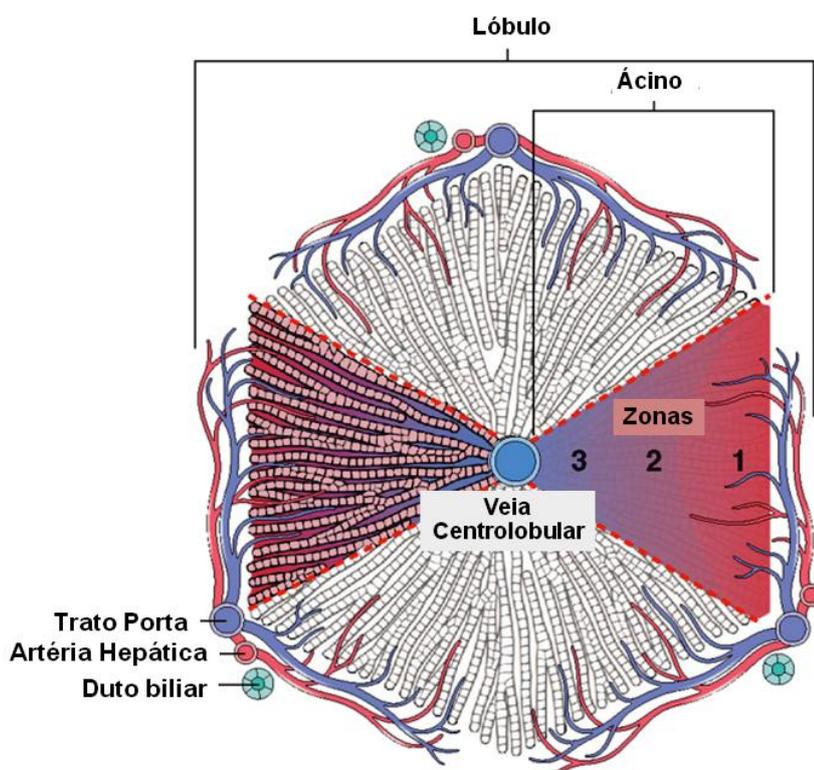


Figura 3 – Ácino hepático dividido em três zonas, com base na função metabólica. Zona 1 (periportal) localiza-se mais próxima do trato porta e recebe a maior parte do sangue oxigenado, enquanto a zona 3 (centrolobular) está mais distante, recebendo a menor quantidade de sangue oxigenado. A zona 2 é a zona intermediária. Adaptado de Kumar et al., 2009.

### 1.3 LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR DROGAS

A lesão hepática induzida por drogas é a principal causa de insuficiência hepática fulminante e transplantes nos países ocidentais (DELEVE, 2007). Trata-se de um importante problema de saúde humana. Um estudo recente no Reino Unido descobriu que as reações adversas a medicamentos (RAMs) são responsáveis por mais de 6% das internações hospitalares, e a taxa de mortalidade é de cerca de 2% (PIRMOHAMED et al., 2004). Os resultados de um estudo prospectivo de 5 anos indica que muitos suplementos dietéticos e drogas com diferentes alvos farmacológicos estão associados com RAMs idiossincrásicas, hepatotóxicas (CHALASANI et al., 2008).

Drogas e toxinas podem produzir dano hepático através de, pelo menos, quatro mecanismos gerais, que incluem:

- 1) A droga prejudica diretamente a integridade estrutural e funcional do fígado.
- 2) O metabolismo da droga produz um metabólito, normalmente uma espécie oxidante ou alquilante, que altera a estrutura e a função hepatocelular. Neste caso, a lesão ocorre quando os mecanismos celulares protetores já estejam esgotados.
- 3) Um metabólito da droga liga-se a proteínas hepáticas para produzir novos determinantes antigênicos que se tornam alvo de uma resposta imune específica.
- 4) A droga inicia uma resposta de hipersensibilidade específica (alergia à droga), na qual parte do fígado encontra-se com lesão.

Pode haver mais de um mecanismo pelos quais uma determinada droga produz lesão hepática. Por exemplo, metabólitos reativos de uma droga podem provocar uma lesão celular através de reações bioquímicas (mecanismo 2) e também formar novos determinantes antigênicos que iniciam uma lesão imune-mediada (mecanismo 3) (FARRELL, 1994).

A maioria dos fármacos ingeridos por via oral é lipossolúvel, necessitando de metabolização hepática, que os transforma em metabólitos hidrossolúveis, mediante ação das enzimas do citocromo P450. (FARRELL, 1994).

As RAMs podem ser classificadas como previsíveis ou idiossincrásicas. As reações previsíveis são dose-dependentes e ocorrem em um período de tempo relativamente coerente, sendo todos os indivíduos suscetíveis. Um exemplo típico é a hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol (LARSON et al., 2005; AMAR; SCHIFF, 2007). Em contraste, as RAMs idiossincrásicas ocorrem em uma minoria dos pacientes durante a terapia medicamentosa e não estão relacionadas à ação farmacológica da droga (SENIOR, 2008).

As RAMs idiossincrásicas são imprevisíveis, difíceis de diagnosticar, e ocorrem com doses que não causam toxicidade na maioria das pessoas. Elas geralmente exibem um tempo de latência variável após o início da terapia medicamentosa, e que não têm sido reproduzíveis em modelos animais (KAPLOWITZ, 2005; UETRECHT, 2007-2008). Conforme pode-se observar na Figura 4, as propriedades da droga, a variação genética e fatores ambientais contribuem para as RAMs idiossincrásicas (BOELSTERLI, 2003a).

Em muitos casos, a toxicidade é exercida através dos metabólitos da droga, e não pela droga em si, por isso a importância fundamental de analisar os fatores que afetam a formação de metabólitos. Diversos xenobióticos são substâncias lipofílicas, e sua transformação em componentes hidrofílicos pelo sistema citocromo P450 resulta na produção de metabólitos tóxicos (GRATTAGLIANO, 2009).

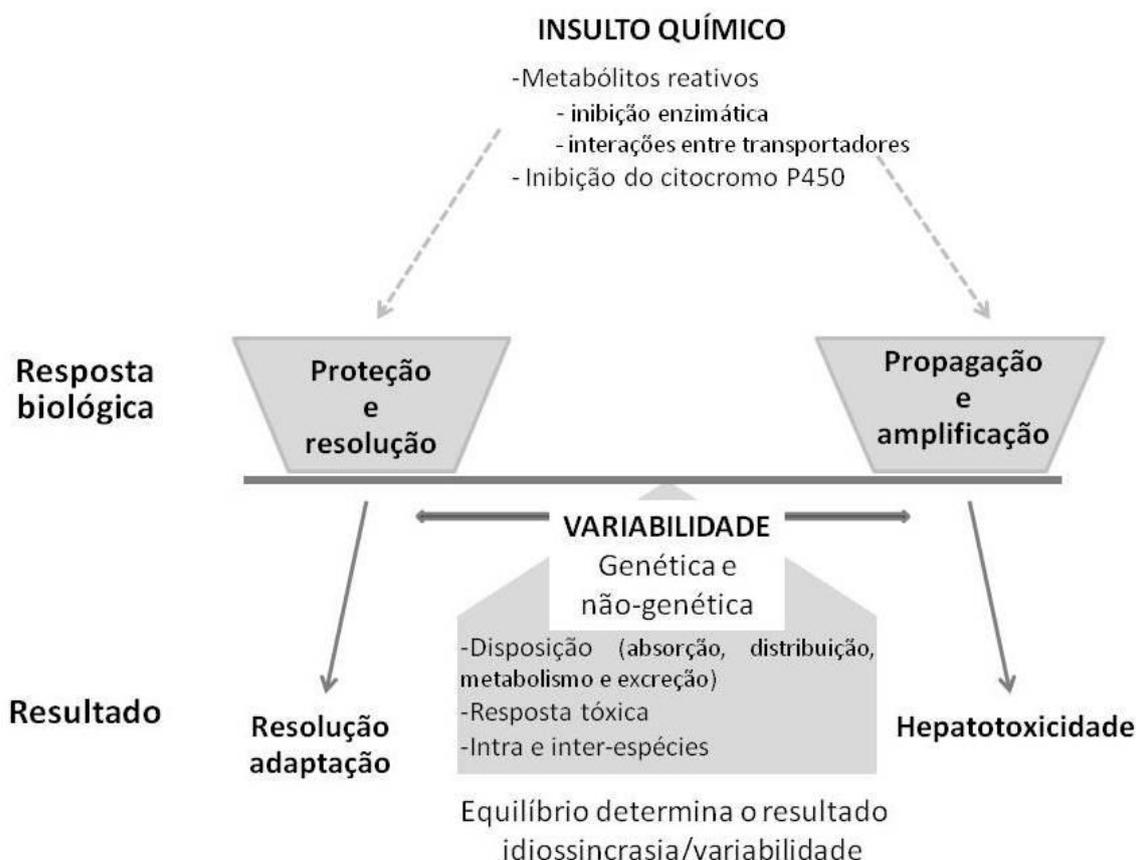


Figura 4 - Complexidade da lesão hepática induzida por drogas  
Fonte: Adaptado de Gree, 2010

Os progressivos avanços no conhecimento das rotas metabólicas e das enzimas responsáveis pela biotransformação de drogas têm contribuído para a compreensão de uma grande variabilidade no metabolismo existente em seres humanos. Diferenças fenotípicas e genotípicas na expressão das enzimas envolvidas no metabolismo de drogas são as principais causas dessa variabilidade (GÓMEZ-LECHÓN et al., 2007).

### 1.3.1 Tipos de Lesão Hepática Induzida por Drogas

A lesão hepática induzida por drogas abrange uma variedade de respostas, e inclui muitas das manifestações clínicas e patológicas que acompanham lesões no fígado em geral (KAWAMOTO et al., 1999).

Existem classificações clínicas, por exemplo, que diferenciam as lesões entre hepatocelulares, colestáticas ou mistas, usam critérios histológicos, de início agudo ou crônico ou ainda pela sua gravidade. Essas classificações tornam-se úteis na prática clínica, pois elas descrevem sinais clínicos típicos de lesão hepática induzida por medicamentos específicos e, além disso, podem contribuir com dicas úteis a respeito dos mecanismos envolvidos. No entanto, deve-se ter consciência de que essas classificações são descritivas e com base em critérios clínicos ou histopatológicos (RUSSMANN et al., 2009).

Um grande desafio para as classificações “mecanicistas” é o fato de que a lesão hepática induzida por drogas não é suficientemente caracterizada pela lesão inicial, mas sempre envolve vários mecanismos, os sistemas de regulação e fatores de risco, com interações complexas. Isto também explica porque para a maioria das hepatotoxinas não existem modelos experimentais disponíveis, o potencial de uma droga hepatotóxica muitas vezes não é reconhecido antes da comercialização, a exata contribuição de diferentes processos que conduzem a lesão hepática induzida por drogas em humanos são ainda desconhecidos, e tratamentos direcionados ainda não estão disponíveis, exceto para hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol (RUSSMANN et al., 2009).

### **1.3.2 Vias Comuns de Lesão Hepática Induzida por Drogas**

O fígado é um local de intensa atividade imunológica. A ativação das células de Kupffer e o recrutamento de macrófagos e células do sistema imune resultam em inflamação e lesão hepática causadas pela liberação de citocinas (BRUCHFELD et al., 2000). Esses eventos são fatores importantes na iniciação e manutenção da lesão hepática induzida por drogas (CAMPOS-FRANCO et al., 2004).

A droga em si, assim como seus metabólitos, podem ativar uma resposta imune no fígado: a molécula é processada por células apresentadoras de antígenos no tecido linfóide central de maneira direta, ou após o aparecimento dos haptenos ou novos antígenos na membrana dos hepatócitos (MALHI et al., 2010).

### 1.3.3 Mecanismos Gerais de Dano na Lesão Hepática Induzida por Drogas

Vários fatores podem influenciar a resposta das células a um insulto tóxico e a extensão do dano resulta da intervenção dos fatores intrínsecos e extrínsecos da célula. A combinação de idade, sexo, genética, hormônios, estado energético celular, doença hepática subjacente, fatores ambientais, e oferta de O<sub>2</sub> local, contribui fortemente para a expressão dos mediadores da morte celular (PESSAYRE; LARREY, 1988).

A apoptose e a necrose inicialmente podem seguir uma via metabólica comum. Quando a lesão afeta a manutenção de programas funcionais das células, os hepatócitos morrem preferencialmente por apoptose, limitando a extensão da lesão. O dano necrótico geralmente começa no citoplasma e, assim, envolve as mitocôndrias e o núcleo, determinando edema e perda da integridade da membrana plasmática. A apoptose determina a condensação citoplasmática e nuclear e a fragmentação sem perda da integridade da membrana (CARINI et al., 1999).

Mecanismos gerais de hepatotoxicidade, que podem ser observados na Figura 5, incluem formação de metabólitos reativos (2), depleção de antioxidantes (3) e alquilação de proteínas. A sinalização intracelular pode ativar membros da família Bcl-2 (Bax e Bid) que formam poros na parte mais externa da membrana mitocondrial. Esta condição favorece a liberação de proteínas intramembrana e promove a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA. Alternativamente, uma disfunção da mitocôndria, através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e formação de peroxinitrito, ativam a transição da permeabilidade da membrana e levam ao colapso do potencial de membrana, com diminuição da produção de energia e liberação de nucleases (JAESCHKE; BAJT, 2006).

Existem duas vias de sinalização que levam à apoptose: a via intrínseca e a extrínseca. A via intrínseca é caracterizada por uma disfunção mitocondrial. E vários estímulos, especialmente o estresse oxidativo, podem levar a danos da membrana mitocondrial interna, resultando na transição da permeabilidade mitocondrial, com liberação do citocromo c e ativação de caspases (DELHALLE et al., 2003).

A família de proteínas Bcl-2 desempenha um papel na regulação da via intrínseca. Dois membros do principal representante desta família são a Bax, pró-apoptótica e a Bcl-2, antiapoptótica. Bcl-2 atua para evitar a morte das células;

enquanto Bax, que forma hetero-dímeros com Bcl-2, parece acelerar o sinal de morte celular (GRATTAGLIANO et al., 2009).

Bcl-2 pode inibir a apoptose induzida pela ação de agentes oxidantes. A membrana mitocondrial externa, o retículo endoplasmático e o envelope nuclear são todos sítios envolvidos na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A localização do Bcl-2 a esses sítios levou à investigação sobre o envolvimento de EROs na morte celular programada. Bcl-2 pode proteger as células contra  $H_2O_2$  e hidroperóxido de t-butil ou menadiona, que geram radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Mesmo em concentrações baixas, estes oxidantes matam as células por um processo de apoptose. Bcl-2 inibe a peroxidação lipídica, um evento consequente ao dano oxidativo, frequentemente acompanhado de apoptose (Figura 5) (YANG; KORSMEYER, 1996).

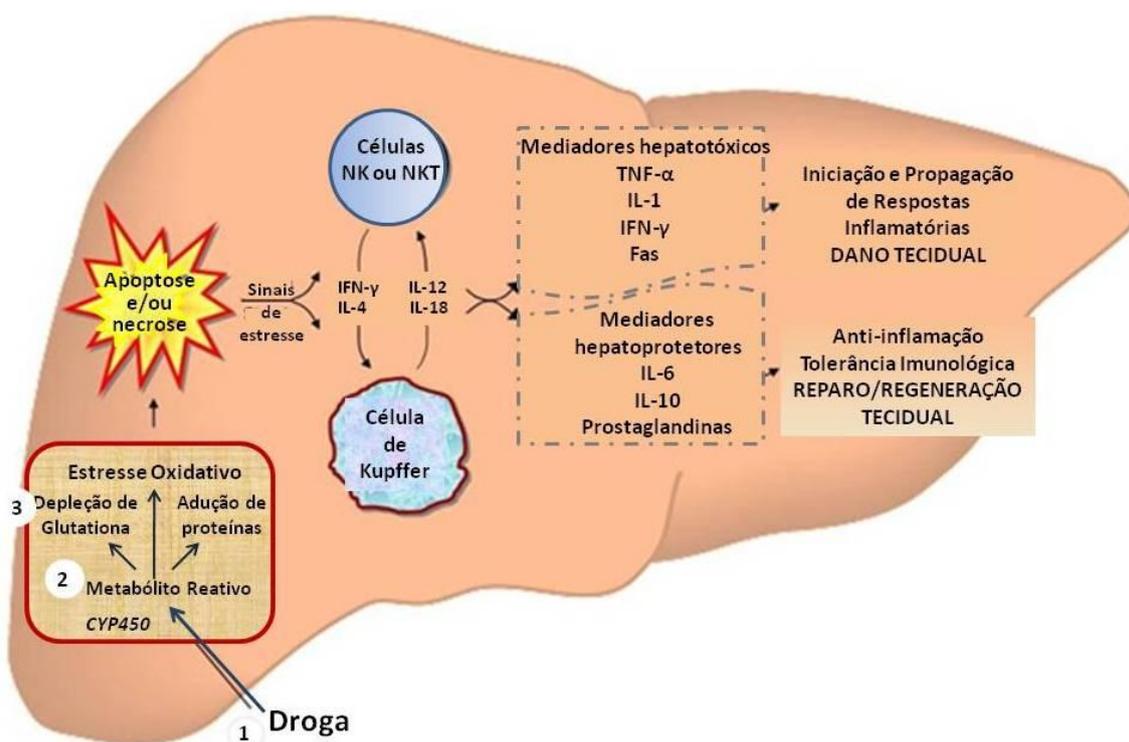


Figura 5 – Ilustração do modelo proposto para a Lesão Hepática Induzida por Drogas  
Fonte: Adaptado de Holt MP, 2006.

Um mecanismo envolvido nesse processo é o da família das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK), que desempenha um papel importante na transdução do sinal intracelular em resposta a estímulos extracelulares. As três subfamílias bem caracterizadas de MAPKs são a das quinases reguladas por sinais

extracelulares (ERKs), quinases c-Jun N terminal (JNKs), e p38 (KOBAYASHI et al., 2006).

Em geral, ERKs são ativadas por estímulos mitogênicos e proliferativos. Sob estímulo, essas quinases são ativadas pela fosforilação dupla de resíduos de treonina e tirosina (SCHNABL et al., 2001). A ERK possui funções citoprotetoras contra a apoptose, que é desencadeada por estresse oxidativo, TNF- $\alpha$ , NO e pelo uso de drogas pró-apoptóticas. Acredita-se que as MAPKs, incluindo a ERK, sejam biomoléculas redox-dependentes que modulam a proliferação celular, a sobrevivência e apoptose (CHANG; KARIN, 2001).

## 1.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA POR DROGAS

### 1.4.1 Tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>)

O tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) é conhecido há muito tempo como um modelo tóxico e tem sido o foco de muitos estudos toxicológicos *in vitro* e *in vivo*. O principal local de toxicidade e carcinogênese é o fígado. Sendo assim, o CCl<sub>4</sub> constantemente provoca toxicidade do fígado, resultando em degeneração gordurosa, necrose celular, fibrose e cirrose. Isso ocorre em várias espécies e através de múltiplas rotas de exposição (WEBER et al., 2003).

Existem consideráveis evidências *in vitro* e *in vivo* para o modo de ação pelo qual o CCl<sub>4</sub> produz efeitos tóxicos em animais (WEBER et al., 2003). Numerosos estudos mostram que o metabolismo do CCl<sub>4</sub> é necessário para a sua toxicidade. A etapa inicial do metabolismo do tetracloreto de carbono é a desalogenação redutiva pelo citocromo P450, principalmente P4502E1 (MARTINEZ et al., 1995).

Os produtos do metabolismo do CCl<sub>4</sub> pelo P4502E1 incluem os radicais triclorometil e triclorometil peróxidos. Estudos com varredores de radicais livres, como a N-acetilcisteína (NAC), e agentes de *spin-trapping*, como o N-terc-butil- $\alpha$ -(4-nitrofenil) nitrona demonstraram que estes compostos conferem um efeito protetor contra a toxicidade induzida por CCl<sub>4</sub> (STOYANOVSKY; CEDERBAUM, 1996;

BRENNAN; SCHIESTL, 1998; PAVANATO et al., 2003; AMALIA et al., 2007; PEREIRA-FILHO et al., 2008), indicando que a toxicidade do CCl<sub>4</sub> é produzida pelos radicais livres liberados através do metabolismo do CCl<sub>4</sub>.

#### **1.4.2 Paracetamol**

O paracetamol é um analgésico e antipirético amplamente utilizado e conhecido por ser eficaz e seguro quando consumido em doses terapêuticas (1-4 g/dia) (KAPLOWITZ, 2001; RUMACK, 2004). No entanto, uma lesão hepática grave resultando em insuficiência hepática pode ocorrer em alguns casos, após uma overdose aguda ou cumulativa (10-15 g) (KAPLOWITZ, 2001).

A overdose de paracetamol também é conhecida por causar lesões hepáticas em animais de laboratório com características semelhantes às encontradas nos pacientes. O modelo murino de hepatotoxicidade induzido por paracetamol representa o modelo mais utilizado para o estudo da patogênese de dano hepático induzido por drogas. O início da lesão hepática induzida por paracetamol resulta do metabolismo do paracetamol em um metabólito reativo, a imina N-acetil-p-benzoquinona (NAPQI) (NELSON, 1990).

Após doses normais, a NAPQI é desintoxicada pela conjugação, catalizada química e enzimaticamente, com o tripeptídeo glutathiona onipresente, e excretada como derivados de N-acetilcisteína na urina. Depois de overdoses, no entanto, a quantidade de metabólitos reativos é suficiente para esgotar a glutathiona hepática disponível, e a NAPQI então reage covalentemente com macromoléculas celulares, contribuindo para a modificação da proteína e a disfunção mitocondrial com depleção de ATP, culminando em necrose centrolobular ampla (KAPLOWITZ, 2001).

Além de orientar a disfunção celular hepática e a morte, a patogênese da hepatotoxicidade induzida por paracetamol também envolve a liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios que podem influenciar a susceptibilidade individual.

### 1.4.3 Tioacetamida

A tioacetamida (TAA) foi originalmente usada como fungicida para proteger laranjas contra a deterioração (CHILDS, 1946). Entretanto, em seguida foi reconhecida como uma potente hepatotóxica e agente carcinogênico em ratos (FITZHUGH; NELSON, 1948). Outros usos conhecidos da tioacetamida seriam como um solvente orgânico na indústria do couro, têxtil, e de papel, como um acelerador de vulcanização da borracha Buna e como um estabilizador de combustível de motores (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 2000). A partir daí, estudos revelaram que a exposição crônica a tioacetamida produziu cirrose em ratos (CHIELI; MALVADI, 1985).

Notáveis avanços em nossa compreensão dos mecanismos responsáveis pela lesão hepatotóxica surgiram a partir de estudos moleculares, celulares e funcionais em animais. É importante salientar que as lesões patológicas causadas por hepatotóxicos em modelos experimentais podem assemelhar-se às lesões de qualquer tipo conhecido de doença do fígado em humanos (BASKARANA et al., 2010).

O mecanismo de toxicidade da tioacetamida se deve à formação de tioacetamida-S-óxido. Dentro de um curto período após administração, a tioacetamida sofre extenso metabolismo no fígado em acetamida e tioacetamida-S-óxido pelo sistema oxidase de função mista (CHIELI; MALVADI, 1984). O composto tioacetamida-S-óxido é metabolizado, posteriormente, pelo citocromo P-450 monooxygenase a tioacetamida-S-dióxido (HUNTER et al., 1977; WANG et al., 2000), que exerce hepatotoxicidade pela ligação a macromoléculas, sendo responsável pela mudança na permeabilidade celular, aumento da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ , aumento do volume nuclear e alargamento dos nucléolos, além de inibir a atividade mitocondrial, levando à morte celular (AHMAD et al., 2002; HALPERT, 1982).

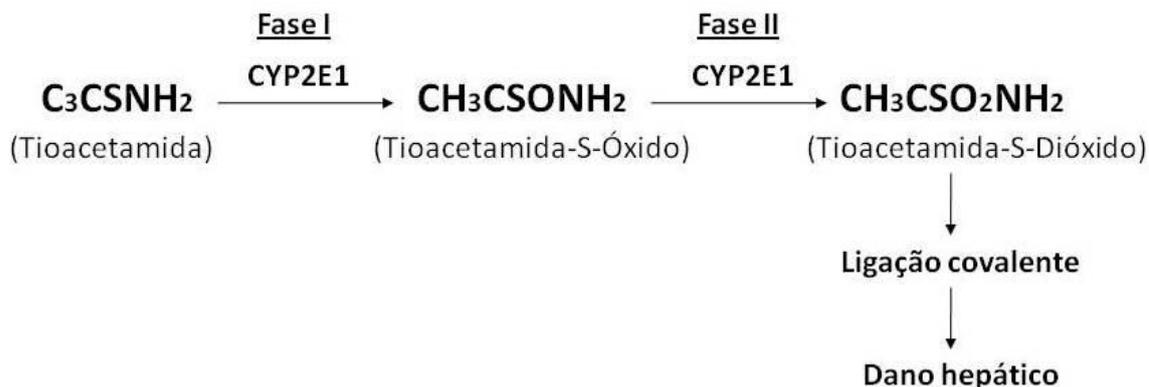


Figura 6 – Metabolismo da Tioacetamida.

Um dos mecanismos de dano é a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que leva ao estresse oxidativo, com aumento de danos ao DNA, proteínas e lipídios (WANG et al., 2000), causando necrose centrolobular e geração de mais EROs (PORTER; NEAL, 1978).

Estudos relataram que a exposição aguda à tioacetamida produziu necrose centrolobular em ratos (ZIMMERMAN, 1978). Enquanto isso, a administração crônica da hepatotoxina levou ao surgimento de hepatotoxicidade grave, caracterizada por necrose centrolobular acompanhada de vários graus de degeneração gordurosa contendo desde minúsculos até grandes vacúolos (gotas de gordura) (AHMAD et al., 2002).

O metabólito reativo obrigatório da TAA, tioacetamida-S-dióxido, liga-se covalentemente a proteínas com a formação de derivados da acetilimidolisina, responsável pela indução de efeitos hepatotóxicos da TAA (DYROFF; NEAL, 1981). TAA também pode formar acetamida através do mesmo intermediário reativo (REES et al., 1966).

Estudos têm mostrado, no entanto, que a acetamida não pode produzir lesões hepáticas como as relatadas para a TAA, mesmo quando administrada em doses muito maiores do que a TAA. Quando TAA é administrada, dois eventos metabólicos são necessários para produzir os metabólitos tóxicos, enquanto apenas um passo é necessário no caso da tioacetamida-S-óxido, o que justifica a maior toxicidade da tioacetamida-S-óxido em relação ao TAA (HUNTER et al., 1977).

Estudos *in vivo* e *in vitro* indicaram que a segunda etapa (tioacetamida-S-óxido → tioacetamida-S-dióxido) da bioativação da TAA é menos eficiente que a primeira (TAA → tioacetamida-S-óxido) (CHILAKAPATI et al., 2007).

Quando uma dose baixa de TAA (50 mg/kg) é administrada em ratos machos *Sprague Dawley*, os níveis de ALT plasmática máxima são atingidas em 36 horas (RAMAIAH, EHENDALE, 2001; CHILAKAPATI et al., 2005). Quando a mesma dose de tioacetamida-S-óxido é administrada, os níveis de ALT plasmática máxima são alcançados 24 horas antes.

A lesão hepática causada pela tioacetamida-S-óxido não mostrou aumento proporcional à dose nos momentos iniciais. Isto foi demonstrado através dos valores das enzimas plasmáticas ALT e AST e histopatologicamente. A administração de uma dose letal de tioacetamida-S-óxido (200 mg/kg) levou a uma boa progressão da lesão após 36 horas, quando o composto foi totalmente eliminado do corpo ( $t_{1/2} \sim 105$  min) (CHILAKAPATI et al., 2007).

Entre muitos hepatotóxicos, TAA e tioacetamida-S-óxido são conhecidos por serem únicos, no sentido que, mesmo após a administração de uma dose letal, a morte ocorre entre 3,5 e 7 dias para TAA e entre 36 e 96 horas para tioacetamida-S-óxido. Vários autores observaram que, com uma dose letal de  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$ , paracetamol, a morte ocorreu entre 12 e 48 horas (ANAND et al, 2003; MEHENDALE, KLINGENSMITH, 1988; RAO et al, 1997; SHANKAR et al, 2003; SAWANT et al, 2006a).

Por isso, com estes modelos hepatotóxicos ( $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$  e paracetamol), o tempo decorrido entre elevações significativas das enzimas que marcam a lesão hepática e a insuficiência hepática, levando à morte dos animais, é muito curto. Ao contrário destes, nos modelos com TAA e tioacetamida-S-óxido há um longo intervalo de tempo entre elevações significativas das enzimas que marcam a lesão hepática, a insuficiência hepática, e a morte dos animais (MANGIPUDY et al, 1995; CHILAKAPATI et al, 2005; SAWANT et al, 2006b).

Embora a razão exata para esta diferença não seja conhecida, a descoberta do envolvimento de "proteínas de morte" na progressão da lesão indica que a evolução da lesão ocorre devido a fatores independentes dos tóxicos. Este intervalo de tempo adicional com a TAA e a tioacetamida-S-óxido é vantajoso para as investigações relacionadas com o mecanismo inicial da lesão e progressão da lesão

após o tóxico já não estar mais presente, por causa da grande “janela” para estudos de evolução temporal do avanço e do declínio da lesão (CHILAKAPATI, 2007).

## 1.5 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO

O termo radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativo(a), que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1990).

Em geral, a excessiva formação endógena de radicais livres pode ser oriunda da (i) ativação aumentada de fagócitos; (ii) interrupção dos processos normais de transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial; (iii) aumento da concentração de íons metálicos de transição por escape do grupamento heme de proteínas em locais de lesão ou doenças metabólicas, e (iv) por níveis diminuídos das defesas antioxidantes (GUTTERIDGE, 1999; DROGE, 2002; HALLIWELL, OKTYABRSKY, SMIRNOVA, 2007).

**Tabela 1-** Importantes espécies reativas no sistema biológico

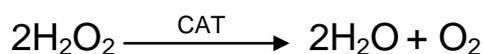
Radicais Livres	Não-radicais
<b>Espécies Reativas de Oxigênio</b>	
Superóxido, $O_2^{\cdot -}$	Peróxido de hidrogênio, $H_2O_2$
Hidroxila, $OH^{\cdot}$	Oxigênio singlet, $^1O_2$
Peroxila, $RO_2^{\cdot}$	Peróxidos orgânicos, ROOH
Alcoxila, $RO^{\cdot}$	
Carbonato, $CO_3^{\cdot -}$	
<b>Espécies Reativas de Cloro</b>	
	Ácido hipocloroso, HOCl
	Gás cloro, $Cl_2$
Cloro atômico, $Cl^{\cdot}$	Nitro-cloro-benzeno, $NO_2Cl$
<b>Espécies Reativas de Nitrogênio</b>	
	Ácido nitroso, $HNO_2$
	Cátion nitrosila, $NO^+$
	Ânion nitrosila, $NO^-$
	Tetraóxido dinitrogênio, $N_2O_4$
	Trióxido dinitrogênio, $N_2O_3$
	Peroxinitrito, $ONOO^-$
Óxido nítrico, NO	Ácido Peroxinitroso, ONOOH
Dióxido de nitrogênio, $NO_2^{\cdot}$	Alquil Peroxinitrito, ROONO

Fonte: adaptado de Halliwell, 2006.

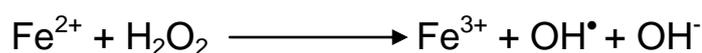
A tabela 1 apresenta espécies reativas importantes para o sistema biológico. As principais EROs conhecidas são: ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxil ( $HO^{\bullet}$ ).  $O_2^{\bullet-}$  é convertido em  $H_2O_2$  espontaneamente e essa reação pode ser catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), ocorrendo a conseqüente formação de peróxido de hidrogênio, sendo este menos reativo e podendo ser degradado por outras enzimas (HITCHON; EI-GABALAWY, 2004).



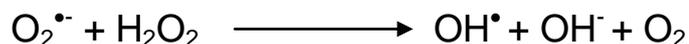
Outra enzima importante é a CAT. O peróxido de hidrogênio, formado na dismutação do ânion superóxido, é transformado em água e oxigênio por ação dessa enzima. Esta, por sua vez, tem uma ação muito específica, já que atua em reações com peróxidos de hidrogênio, metila e etila (CHANCE; BOVERIS, 1979).



Os íons  $Fe^{2+}$  podem participar da reação de Fenton, gerando radicais hidroxila altamente reativos. Assim, sob condições de estresse,  $O_2^{\bullet-}$  facilita a formação de  $OH^{\bullet}$  a partir de  $H_2O_2$ , tornando o  $Fe^{2+}$  disponível para a reação de Fenton.



A reação do radical superóxido com o peróxido de hidrogênio forma o radical hidroxila através da reação de Haber-Weiss.



Adicionalmente, o  $O_2^{\bullet-}$  pode reagir com NO formando o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), uma espécie reativa de nitrogênio (ERN). A adição de  $ONOO^-$  às células, tecidos e fluidos corporais, leva à rápida protonação, podendo resultar em depleção de grupos -SH e outros antioxidantes (DROGE, 2002; HALLIWEL, GUTTERIDGE, 2007). Neste sentido,  $ONOO^-$  tem sido considerado um importante marcador do estresse nitrosativo em doenças humanas (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor do pró-oxidante, levando ao dano potencial (HALLIWEL, GUTTERIDGE, 1999). O mecanismo redox tem mostrado influência na sinalização intracelular, e as células parecem ser muito sensíveis à perda destes sistemas de regulação e controle. Estes dois conceitos têm sido recentemente incorporados a uma nova definição do estresse oxidativo como "um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a um desarranjo da sinalização e do controle redox e/ou a um dano molecular" (FORMAN et al., 2004; ROEHRS et al., 2004).

### 1.5.1 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa de nitrogênio importante no estado redox dos hepatócitos. É uma molécula pequena, hidrofóbica, livremente difusível e com uma meia-vida de segundos (ou menos). Ele é produzido pela óxido nítrico sintase (NOS), que está presente em três formas: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS), e a NOS induzível (iNOS) (DIESEN; KUO, 2010).

A principal via metabólica do NO envolve sua oxidação rápida a óxidos de nitrogênio superiores nitrito ( $\text{NO}_2$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3$ ), conforme ilustra a figura 7. Até recentemente, esses ânions inorgânicos eram considerados produtos finais inertes do metabolismo do NO. Embora seja verdade que a bioatividade do NO termina logo após a oxidação a nitrato e nitrito, linhas de pesquisas recentes sugerem que existe um caminho inverso em que os nitratos e nitritos são reduzidos gradualmente a NO bioativos novamente (LUNDBERG; WEITZBERG, 2009).



Figura 7- Metabolismo do NO e formação dos metabólitos NO<sub>2</sub> e NO<sub>3</sub>  
 Fonte: Vascular Medicine Institute, <http://www.vmi.pitt.edu/index.html>.

O NO interage com vários alvos moleculares incluindo tióis, metais de transição (como ferro), oxigênio e outros radicais livres. Ele facilmente se liga ao heme, afetando assim a ativação ou inibição de diversas proteínas. Especificamente, o NO ativa a guanilato ciclase, o que resulta em aumento da síntese de GMPc, afetando, assim, a ativação ou inibição de outras moléculas (STAMLER, 1994).

Em resposta ao dano tecidual e inflamação induzidos por uma variedade de xenobióticos, incluindo paracetamol, tetracloreto de carbono, o etanol, galactosamina e endotoxina, o fígado produz grandes quantidades de óxido nítrico. Na verdade, quase todos os tipos de células do fígado, incluindo hepatócitos, células de Kupffer, células estreladas e células endoteliais têm a capacidade de gerar óxido nítrico. Dessa forma, essas células, assim como leucócitos infiltrados, podem indiretamente aumentar a lesão tecidual. Em muitos modelos de lesão hepática, NO e seus produtos de oxidação, como peroxinitrito contribuem para o processo de lesão danificando diretamente o tecido ou iniciando reações imunológicas adicionais que resultam em danos. Em alguns modelos, os doadores de óxido nítrico ou peroxinitrito podem imitar as ações citotóxicas das toxinas no fígado (LASKIN et al., 2001).

O NO é um mediador chave liberado pelos macrófagos ativados que tem sido implicado no processo de toxicidade. Vários estudos mostraram que grandes quantidades deste intermediário altamente reativo de nitrogênio são produzidas durante lesão tecidual associada à inflamação (LASKIN, 1994; LYONS, 1995; BUKARA, BAUTISTA, 2000). De fato, em muitos desses sistemas, a modulação da

produção de óxido nítrico pode alterar a lesão tecidual. O agente indutor da lesão, o seu tecido-alvo, e concentrações locais de intermediários reativos de oxigênio são importantes determinantes se a produção de óxido nítrico desempenha um papel protetor ou patológico na lesão tecidual (LASKIN et al., 2001).

EROs estão envolvidas na regulação da apoptose e na regeneração dos hepatócitos (FIORUCCI et al., 2001). A apoptose pode ser induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou superóxido de fontes exógenas, como ocorre em monócitos e neutrófilos presentes na lesão hepática (JAESCHKE H, 2000), ou de EROs/ERNs produzidas intracelularmente, como ocorre a partir de ácidos biliares, isquemia, ou hepatotoxinas (HUG et al., 1997). Muitas destas drogas são metabolizadas pela isoforma P450E1 do citocromo P450, o que resulta em aumento do estresse oxidativo e apoptose (CANBAY, 2003).

Apesar de estudos mostrarem que o NO desempenha um papel importante na apoptose, os mecanismos exatos ainda não são claros. A proliferação celular hepática pode ser suprimida pelo NO, e este efeito é impedido por adição de inibidores da NOS (LASKIN et al., 1994; LASKIN et al., 1995). Grandes quantidades de óxido nítrico podem conduzir a danos teciduais, e as células respondem expressando proteínas ou oxidantes e antioxidantes para a proteção contra os danos dos radicais livres.

## 1.6 ESTRESSE OXIDATIVO E AGENTES TÓXICOS

Os compostos tóxicos ambientais são uma fonte potencial de EROs. Em fumantes, tem-se observado uma grande redução dos antioxidantes circulantes (DIETRICH et al., 2003; BLOOMER, 2007). Além disso, a exposição ocupacional a metais, benzina, poeira de cimento, tetracloreto de carbono e vários outros agentes está associada a uma maior peroxidação lipídica, com aumento da oxidação do DNA e diminuição dos níveis de vitamina E e C (PAVANATO et al., 2003; KIM et al., 2004; ROSSNER et al., 2008; YOSHIOKA et al., 2008).

Evidências sugerem que uma maior ingestão de múltiplos nutrientes, incluindo ácido fólico, potássio, glucosinolatos, sulfetos dialil, e flavonóides, reduz consideravelmente o risco de doença cardiovascular associados à exposição ao ar

poluente (HUNG et al., 2004; AUCHINCLOSS et al., 2008). O dano induzido por EROs em ácidos nucléicos, proteínas, carboidratos e lipídios altera a função destas macromoléculas nas células, tecidos e órgãos (SIES, 1999).

Estes distúrbios provocam respostas celulares adaptativas que aumentam as defesas antioxidantes e mecanismos de reparo (por exemplo, reparo do DNA). Um dano oxidativo grave às macromoléculas leva à morte celular. Muitos poluentes ambientais envolvem vias de sinalização que são ativadas em resposta ao estresse oxidativo. As mesmas sequências de eventos também estão associadas com a etiologia e à patologia inicial de muitas doenças crônicas (HENNIG et al., 2007).

A poluição do ar, radiação ionizante, luz UV, metais pesados, metalóides, pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, entre outros, induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) em tecidos-alvo, envolvendo as vias de sinalização que são ativadas em resposta ao estresse oxidativo. Enzimas antioxidantes como SOD, CAT e a ação das vitaminas E e C neutralizam as EROs e ERNs, conforme ilustrado na figura 8 (LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009).

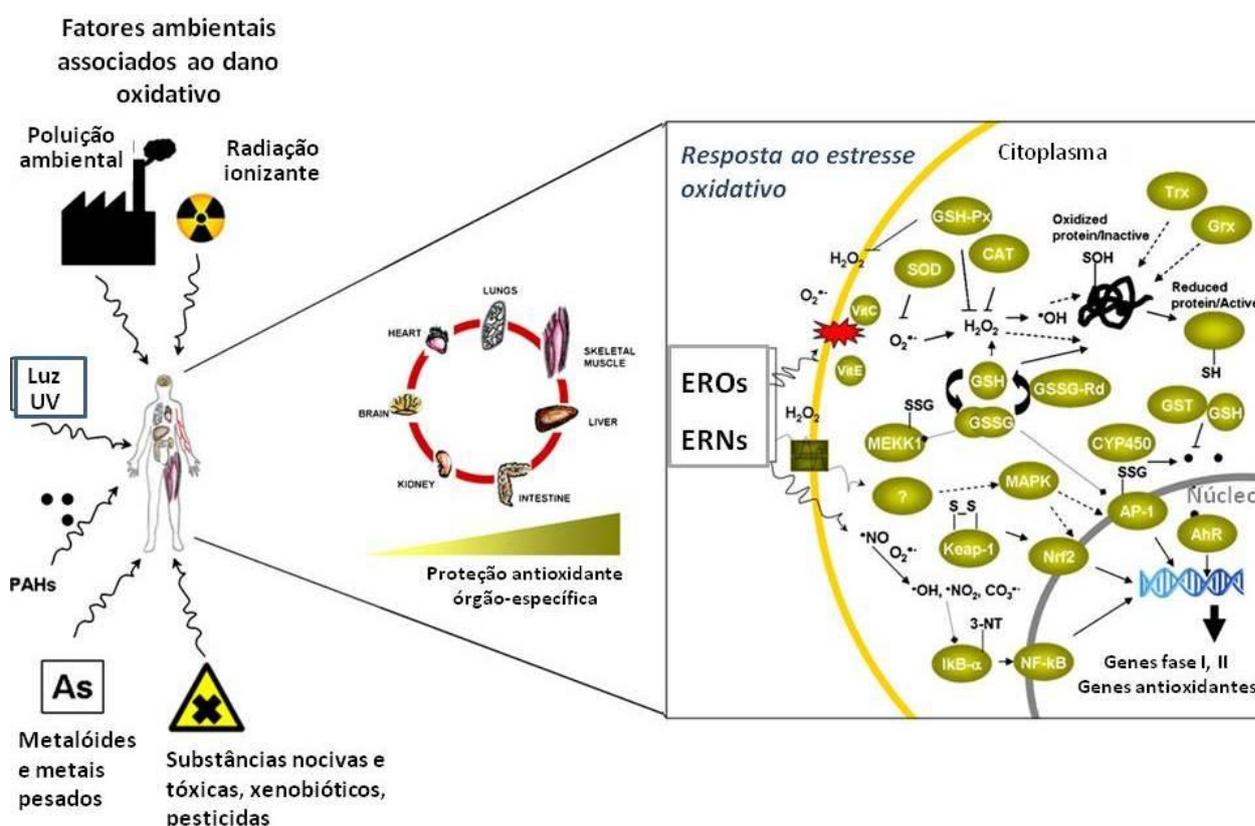


Figura 8 – Ativação de vias de sinalização do estresse oxidativo. Fonte: Adaptado de Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2009.

## 1.7 DEFESAS ANTIOXIDANTES

O desequilíbrio no estado redox tem efeitos potencialmente deletérios sobre a biologia celular. Por isso, existem vários mecanismos antioxidantes, endógenos e exógenos, envolvidos na proteção de células (BLAIR, 2006; SONEJA et al., 2005).

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, quando presentes em baixas concentrações – comparadas àquelas de um substrato oxidável – atrasam significativamente ou impedem a oxidação daquele substrato (o termo oxidável inclui macromoléculas tais como proteínas, lipídios, carboidratos e DNA). A função desses compostos é manter os níveis intracelulares de espécies ativas de oxigênio em baixas concentrações e, para isso, atuam prevenindo a formação dessas espécies ou combatendo-as uma vez que tenham sido formadas (REPETTO; LLESUY, 2002).

Para garantir sua integridade estrutural e funcional, as células hepáticas têm um sistema antioxidante constituído por enzimas como as catalases, superóxido dismutase e principalmente a glutationa-peroxidase, que se conjuga espontaneamente com os metabólitos reativos, convertendo-os em produtos atóxicos, impedindo sua ligação às macromoléculas, que levariam à morte celular (LARREY, 1989).

Quando seus níveis séricos estão baixos, como na desnutrição e no alcoolismo crônico, medicamentos utilizados em doses terapêuticas podem se tornar hepatotóxicos. Substâncias exógenas, como as vitaminas E, A e C, também atuam contra as hepatotoxinas formadas. Desse modo, a depuração sistêmica dos medicamentos está intimamente relacionada com a competência do sistema metabolizador de fármacos, o fluxo sanguíneo hepático e os níveis de albumina sérica. A morte celular acontece em virtude de mecanismos variados, por ação tóxica direta, imunomediada, idiossincrásica, e por toxicidade mitocondrial (LUDWIG, 1975).

Existem micronutrientes na dieta que também contribuem para o sistema de defesa antioxidante. Neles estão incluídos o  $\beta$ -caroteno, vitamina C e vitamina E (a família da vitamina E abrange tanto tocoferóis como tocotrienóis, sendo o  $\alpha$ -tocoferol a forma predominante e mais ativa). Moléculas solúveis em água, como a vitamina C, são potentes agentes “varredores” de radicais na fase aquosa do citoplasma,

enquanto as formas lipossolúveis, como a vitamina E e o  $\beta$ -caroteno, agem como antioxidantes em ambientes lipídicos. O selênio, zinco, cobre e manganês são também elementos importantes, pois atuam como cofatores de enzimas antioxidantes. O selênio é considerado particularmente importante na proteção do ambiente lipídico contra o dano oxidativo, pois serve como um co-fator para a enzima GPx (LAUTERBURG et al., 1984; DENEKE, FANBURG, 1989; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

O antioxidante celular mais abundante é o tripeptídeo GSH. A GSH é sintetizada em duas etapas. Primeiro,  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase forma uma ligação  $\gamma$ -peptídeo entre o ácido glutâmico e a cisteína, então a GSH sintetase acrescenta glicina. GSH previne a oxidação de grupos de proteínas tióis, ou diretamente através de reações com espécies reativas, ou indiretamente através das glutathione transferases (LAUTERBURG et al., 1984; DENEKE, FANBURG, 1989).

### 1.7.1 Flavonóides

Flavonóides são compostos polifenólicos, constituídos de um grupo de metabólitos secundários dos vegetais, que se originam mediante uma via biossintética mista (RICE-EVANS et al., 1996). São compostos que contêm grupos hidroxila fenólicos que lhes conferem uma ação antioxidante com importante potencial terapêutico (Figura 9) e são encontrados na maçã, laranja, pêra, uva, melão, cereja, brócoli, batata, cebola, tomate, feijão, assim como também na cerveja, no chá, no vinho tinto e nos sucos de limão e laranja, os quais fazem parte da dieta humana de forma habitual (PLUMB et al., 1999).

Uma das propriedades mais estudadas dos flavonóides é a sua proteção contra o estresse oxidativo (RICE-EVANS, 2001; POLOVKA, 2003). Os flavonóides são “varredores” ideais de radicais peroxil, devido ao seu favorável potencial de redução em relação aos radicais alquila e peroxila e, portanto, em princípio, eles são inibidores eficazes da peroxidação lipídica (POLOVKA, 2003).

Outra propriedade importante de uma molécula de flavonóide é a capacidade de doar hidrogênio (elétrons), que age “varrendo” espécies reativas de radicais livres, e está principalmente associada com a presença de um grupo catecol no anel

benzênico (anel benzênico diidroxilado). Uma característica estrutural essencial, que é parcialmente responsável pelas propriedades antioxidantes dos flavonóides, envolve a presença de uma insaturação (ligação dupla) entre as posições 2 e 3, um grupo carbonila na posição 4 e um grupo hidroxila na posição 3 do anel C. Além disso, a presença de grupos funcionais envolvendo os dois grupos hidroxila do anel B e o grupo 5-hidroxila do anel-A, contribui com a capacidade dos flavonóides de quelar metais e, assim, evita a quebra catalítica do peróxido de hidrogênio (reação de Fenton).

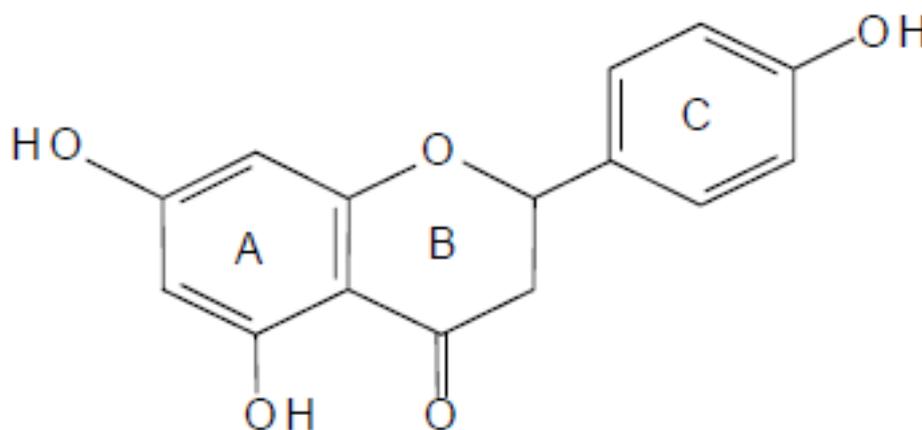


Figura 9 - Estrutura básica dos flavonóides  
Fonte: Rice-Evans e Miller, 1996.

### 1.7.2 Quercetina

A quercetina é classificada como um flavonol típico, sendo um dos flavonóides mais abundantes na dieta humana, cuja denominação científica é 2-(3,4-diidroxifenil)3,5,7-triidroxil-4H-1-benzo-piran-4-ona, também denominado 3,3',4',5,7-pentahidroflavona pela Organização Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), podendo ser encontrada em muitas frutas e legumes, bem como no azeite, no vinho tinto e em chás (NIJVELDT et al., 2001).

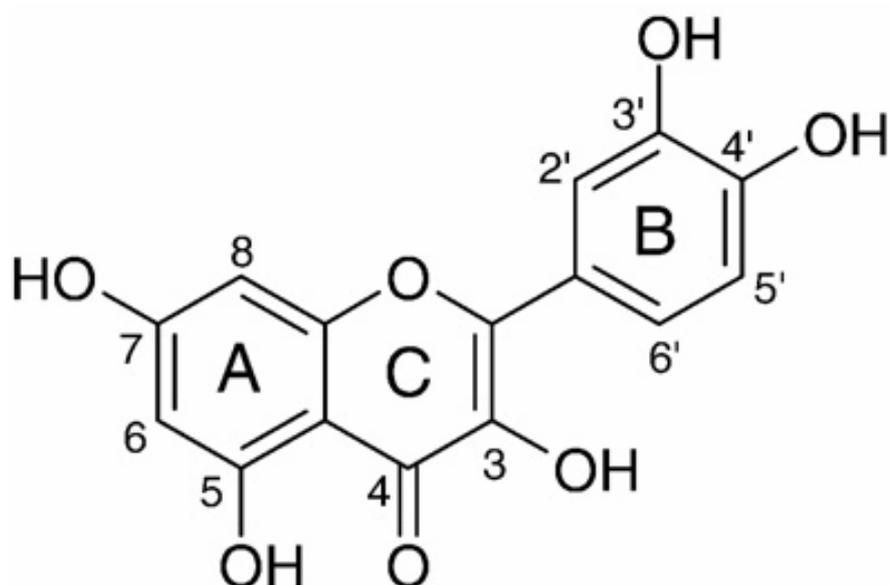


Figura 10 – Estrutura da molécula de quercetina  
 Fonte: Verma, 2010.

A quercetina pode varrer radicais livres e reduzir o efeito oxidativo e citotóxico de lipoproteínas de baixa densidade (NEGRE-SALVAGYRE; SALVAGYRE, 1992). O consumo elevado de alimentos ricos em flavonóides, portanto, também tem sido associado a uma reduzida incidência de cânceres em vários locais (ADLERCREUTZ, 1995).

A quercetina tem várias propriedades biológicas, farmacológicas e medicinais, entre elas os efeitos anti-inflamatórios, anti-alérgicos, antivirais, antitrombóticos, antimutagênicos, antineoplásicos e citoprotetores (FORMICA; REGELSON, 1995). Diversos estudos epidemiológicos e dietéticos sugerem que a quercetina desempenha um papel útil na prevenção de neurodegeneração, especialmente no declínio motor, cognitivo e de humor relacionados à idade e protege contra o estresse oxidativo, bem como o dano cerebral isquêmico (SCHROETER et al., 2002).

A quercetina inibe o crescimento e morte celular em uma variedade de células cancerosas, incluindo células de glioma (ONG et al., 2004, BRAGANHOL et al., 2006). No entanto, o exato mecanismo molecular de ação da quercetina ainda não está bem compreendido. A quercetina pode exercer efeito protetor contra a morte celular associada à geração de EROs.

A tendência inerente ao flavonóide de inibir reações mediadas por radicais livres depende de sua estrutura química. Múltiplos grupos hidroxila conferem à molécula considerável poder antioxidante e capacidade quelante. A dupla ligação e a função carbonila na polimerização da estrutura nuclear aumenta a atividade, proporcionando um radical flavonóide mais estável através da conjugação e da deslocalização de elétrons (BEECHER, 2003). A quercetina possui a capacidade de formar compostos semiquinona e quinino por submeter à oxidação um ou dois elétrons, respectivamente. Nesta forma ela é capaz de quelar íons metálicos e formar cinco anéis quelantes (HEIM et al., 2002).

Sua propriedade anti-radicaís é direcionada à “varredura” de  $\text{OH}^{\bullet}$  e ânion superóxido, espécies altamente reativas envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica. Por outro lado, a quercetina, como um composto fenólico, pode atuar como um agente quelante de metais e, na verdade, ela pertence a uma classe especial de ligantes, que é capaz de sofrer oxidação tanto de um como de dois elétrons, formando compostos semiquinona e quinona respectivamente (KUNTIC et al., 1998; HEDDA, SUSANNE, 2001; AMANDA, MARCELO, 2002).

A quercetina contém inúmeras ligações duplas (insaturadas) e grupos hidroxila que podem doar elétrons através de ressonância para estabilizar os radicais livres (MACHLIN; BENDICH, 1987). As propriedades de “varredura” de radicais associadas à estrutura da quercetina lhe proporcionam a capacidade de defesa contra o estresse oxidativo e, auxiliando na redução de doenças cardíacas, prevenção do câncer e retardando os processos de envelhecimento em células responsáveis por doenças degenerativas (HOLLMAN; KATAN, 1997).

A quercetina interfere reagindo com os radicais formados no processo de peroxidação lipídica (HOLLMAN, KATAN, 1997; KAHL, HILDEBRANDT, 1986). Além de interromper a propagação da peroxidação lipídica, ela também aumenta os níveis de glutathione (GSH) que pode converter o peróxido de hidrogênio a oxigênio e água, impedindo a formação de radicais livres (ANSARI, 2008).

Três grupos estruturais ajudam na capacidade da quercetina de manter a sua estabilidade e atuar como um antioxidante quando reage com os radicais livres: o grupos o-diidroxila do anel B, o grupo 4-oxo em conjugação com a 2,3 alceno, e os grupos 3- e 5-hidroxila (HOLLMAN; KATAN, 1997). O grupos funcionais podem doar elétrons para os anéis, que aumentam o número de formas de ressonância

disponíveis para além daquelas criadas pela estrutura do anel benzênico (MARIANI, 2008).

Estima-se que diariamente a dieta ocidental contém, em média, 25 mg de flavonóides, dentre os quais a quercetina é o principal componente, sendo consumida em torno de 16 mg/dia, uma quantidade que pode ser farmacologicamente significativa para os fluidos e tecidos corporais (DUTHIE; DOBSON, 1999).

Vários antioxidantes e flavonóides têm sido referidos recentemente como eficazes para diminuir a fibrose em modelos animais de cirrose biliar secundária à ligadura de ducto biliar comum (LDBC), de cirrose por álcool ou por administração de tetracloreto de carbono (PAVANATO et al., 2003, TIEPPO et al., 2009). Foi demonstrado o efeito protetor de polifenóis contra hepatotoxicidade induzida por endotoxinas. Além disso, observou-se que a administração de polifenóis diminuiu a ativação do NFkB induzida por endotoxina e a produção de TNF (DRYDEN et al., 2006).

Tendo em vista essas considerações, avaliaremos nesse trabalho a lesão hepática induzida por TAA em ratos e a ação da quercetina, analisando-se, também, o papel desta no processo de apoptose das células hepáticas.

## 2 OBJETIVOS DO ESTUDO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do flavonóide quercetina sobre o estresse oxidativo em ratos com hepatotoxicidade induzida pela ação da tioacetamida.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Induzir dano hepático em ratos através da TAA e avaliar a ação da quercetina.
- 2) Avaliar o nível das enzimas séricas aminotransferases aspartato (AST) e alanina (ALT) para avaliar o dano na integridade hepática.
- 3) Avaliar a presença de alterações anatomopatológicas do tecido hepático através da histologia por hematoxilina/eosina.
- 4) Avaliar os níveis de lipoperoxidação no tecido hepático através das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quantificar a atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx).
- 5) Avaliar os metabólitos do óxido nítrico (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>) no tecido hepático dos animais através do reagente de Griess.
- 6) Avaliar a presença de apoptose por intermédio da determinação da expressão das proteínas Bcl-2, Bax e p-ERK no tecido hepático através da técnica de Western Blot.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Este estudo tem caráter experimental quantitativo comparativo, no qual será induzida a toxicidade do fígado através da administração de TAA intraperitoneal.

#### 3.2 FLAVONÓIDE QUERCETINA

A quercetina ( $C_{15}H_{10}O_7$ ) (CAS Número de Registro [117-39-5] utilizada no estudo foi proveniente da Sigma Chemical Co., St. Louis, USA. Trabalhos experimentais realizados pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando quercetina, verificaram que a melhor resposta obtida com quercetina ocorreu com a dose de 150  $\mu\text{mol/Kg}$  de peso corporal, que corresponde a 50 mg/Kg de peso corporal utilizado neste estudo (Peres et al., 2000; Pavanato et al., 2003; Moreira et al., 2004; Tieppo et al., 2005).

#### 3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

##### 3.3.1 Animais

Foram utilizados sete ratos machos Wistar para cada grupo experimental, peso médio de 250 gramas, provenientes do biotério da FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde) de Porto Alegre. Os animais foram mantidos, durante o experimento, na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em caixas plásticas com 3 a 4 ratos em cada uma, de 47x34x18cm, forradas com maravalha, em ciclo de doze

horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas) e temperatura de  $22 \pm 2$  °C. A água e a ração Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil) foram fornecidos livremente.

O número de animais utilizados no estudo foi baseado em cálculo amostral, o qual referia que para detectar uma diferença entre as médias das variáveis em estudo de 1,5 de desvio-padrão (magnitude de grande efeito), considerando  $\alpha=0,05$  e poder de confiança de 90%, são necessários, no mínimo, sete animais por grupo.

Os procedimentos com os animais foram realizados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, de acordo com as normas preconizadas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sendo este projeto aprovado sob o número 07-066 (GOLDIN; RAYMUNDO, 1997).

### 3.3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- Grupo 1 - *Controle* (CO)- Grupo controle submetido à administração de veículo (NaCl 0,9%) por via intraperitoneal;
- Grupo 2 - *Quercetina* (Q)- Grupo controle submetido à administração de Veículo (NaCl 0,9%) e tratado com quercetina por via intraperitoneal;
- Grupo 3 – *Tioacetamida* (TAA) - Grupo submetido à administração de TAA (2 doses de 350mg/Kg) e tratado com veículo (NaCl 0,9%) por via intraperitoneal;
- Grupo 4 - *Tioacetamida + Quercetina* (TAA+Q) – Grupo submetido à administração de TAA (2 doses de 350mg/Kg) e tratado com quercetina (4 doses de 50mg/Kg) por via intraperitoneal.

### 3.3.3 Procedimentos Experimentais

#### 3.3.3.1 Indução do Dano Hepático por Tioacetamida

Os grupos de TAA foram injetados com duas doses ip. (intraperitoneal) de TAA (350 mg/Kg), com intervalo de oito horas.

No 4º dia, após a primeira injeção de TAA, os ratos foram anestesiados com Cloridrato de cetamina (100 mg/Kg) e Cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) e mortos por exsanguinação. Os tecidos foram coletados e armazenados a -80°C (AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2007a; b).

#### 3.3.3.2 Administração da Quercetina e do Veículo

A quercetina foi administrada em uma dose diária de 50 mg/Kg, intraperitoneal. O tratamento foi iniciado duas horas após a segunda dose de TAA, e os animais receberam quatro doses de quercetina ip. em intervalos de 24 horas. Os animais dos grupos *Controle* e *Quercetina* receberam o veículo (NaCl 0,9%) no volume de 0,6mL por via intraperitoneal ao invés de TAA. Os animais dos grupos *Controle* e *TAA* receberam veículo no mesmo volume por via i.p. ao invés de quercetina.

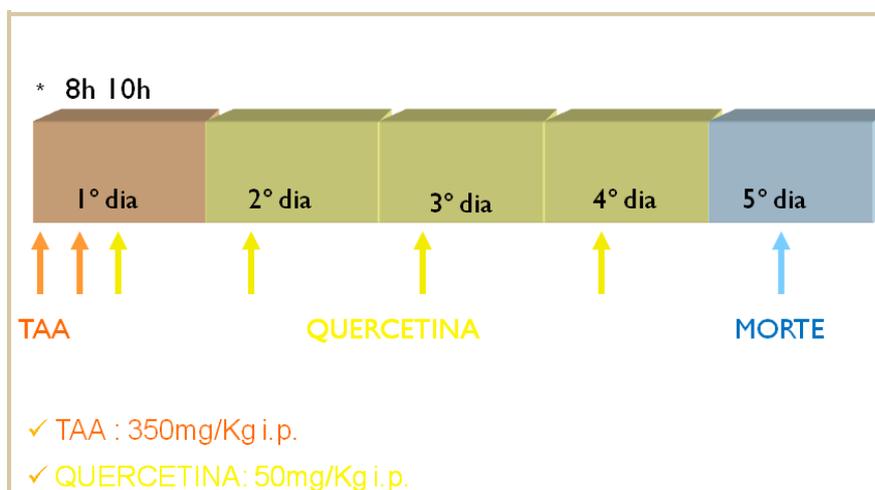


Figura 11 – Esquema representativo do modelo experimental

### 3.3.3.3 *Obtenção das Amostras de Tecido e Sangue e Morte dos Animais*

Transcorridos os cinco dias do desenvolvimento do modelo, os animais foram novamente pesados e anestesiados com uma mistura de Cloridrato de Xilazina 2% 50mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Cetamina 100mg/Kg de peso corporal intraperitonealmente.

Primeiramente, foi coletado sangue pela técnica da punção de plexo veno retro-orbital com tubo capilar de vidro (HALPERN; PACAUD, 1951). Esse material foi utilizado para avaliar integridade hepática por meio das análises das enzimas séricas aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT).

Posteriormente, realizaram-se tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida da intervenção cirúrgica, que iniciou com laparotomia ventral média, exposição do fígado e retirada do órgão.

Dando continuidade, o fígado foi retirado e armazenado em seções. Um pequeno fragmento do fígado foi imerso em solução de formaldeído 10% durante 48 horas para posterior análise histológica; outro fragmento do fígado foi congelado a -80°C, para posteriores análises de lipoperoxidação, enzimas antioxidantes, avaliação de nitritos e nitratos e Western Blot. Os animais sofreram eutanásia por exanguinação sob anestesia profunda (AVMA, 2007).

### 3.3.3.4 *Avaliação das Transaminases Séricas*

Para a determinação da AST (aspartato-aminotransferase EC 2.6.1.1) e da ALT (alanina-aminotransferase EC 2.6.1.2) no plasma, foi utilizado o método enzimático comercial (Boehringer Mannheim, Alemanha). Assim, a atividade enzimática da AST e ALT foi obtida através da medição cinética a 567 nm.

### 3.3.3.5 Histologia

A amostra de tecido hepático para análise histológica permaneceu durante 24 horas em formaldeído 10% e, posteriormente, a amostra foi embebida em parafina. Na etapa seguinte, os blocos de parafina foram fixados ao Micrótomato (Leitz®1512) no qual se realizavam cortes com três micra (3 $\mu$ ). Na fase de coloração, as lâminas foram mergulhadas nos corantes hematoxilina-eosina durante cinco minutos cada uma, intermediadas por um banho de água corrente.

Na fase de desidratação, as estruturas passaram por três recipientes com álcool absoluto e por dois de xilol. Colocou-se a lamínula sobre a lâmina utilizando-se Bálsamo do Canadá ou Entellan, finalizando, assim, o processo de preparação. As lâminas foram analisadas por um patologista do Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que desconhecia os grupos experimentais.

### 3.3.3.6 Preparação do Homogeneizado

Para homogeneizar o fígado, foram adicionados 9 mL de tampão fosfato (KCL 140 mM, fosfato 20 mM; pH 7,4) por grama de tecido. A homogeneização foi realizada em um aparelho Ultra-Turrax (IKA-WERK) durante quarenta segundos, à temperatura de 0 a 4°C. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado em uma centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) durante dez minutos a 3000 rpm (1110 x g). O precipitado foi desprezado, e o sobrenadante retirado e congelado em freezer, à temperatura de - 80°C, para posteriores dosagens.

### 3.3.3.7 Dosagem de Proteína

A concentração de proteínas no homogeneizado de fígado foi determinada, utilizando como padrão uma solução de albumina bovina 1mg/mL (utilizaram-se

volumes de 50, 100 e 150  $\mu\text{L}$ ). Colocou-se uma alíquota do homogeneizado (20 $\mu\text{L}$ ) em 780  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2,0 mL do reativo C que foi preparado com 50 mL de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,5 mL do reativo B1 ( $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1%) e 0,5 mL do reativo B2 (tartarato de sódio e potássio 2%).

Após a adição do reativo C, aguardaram-se dez minutos e colocou-se 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteu diluído na proporção 1:3 em água destilada. Após trinta minutos, realizou-se a medida em espectrofotômetro a 625 nm (LOWRY; ROSEBROUGH et al., 1951).

### 3.3.3.8 *Determinação das Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico*

Foi determinada a lipoperoxidação do fígado através do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A técnica de TBARS consiste no aquecimento do material homogeneizado na presença de ácido tiobarbitúrico e consequente formação de um produto de coloração rósea, medido em espectrofotômetro a 535nm. O aparecimento de coloração ocorre devido à presença do malondialdeído e de outras substâncias provenientes da peroxidação lipídica no material biológico.

Foram colocados em tubo de ensaio, nesta ordem de adição, 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%, 0,25 mL de água destilada, 0,75 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 0,25 mL do homogeneizado. O TBA reagiu com produtos da lipoperoxidação formando uma base de Schiff, e o TCA teve função de desnaturar as proteínas presentes, além de acidificar o meio de reação.

A seguir, agitaram-se os tubos, os quais foram aquecidos à temperatura de 100° C durante quinze minutos. Posteriormente, os tubos foram resfriados, e acrescentou-se 1,5 mL de álcool n-butílico, para extrair o pigmento formado. Os tubos foram colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos e centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (1110 x g). Por último, o produto corado foi retirado e realizada a leitura em espectrofotômetro (CARY 3E – UV – Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 535nm. A concentração de TBA-RS foi expressa em nmoles/mg de proteína (BUEGE; AUST, 1978).

### 3.3.3.9 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade dessa enzima é definida por sua capacidade para inibir um sistema de detecção que reage com o  $O_2^{\bullet-}$ . A técnica de medida da SOD foi baseada na inibição dessa reação. Para isso, utilizou-se adrenalina que, no meio alcalino, transformou-se em adrenocromo, produzindo  $O_2^{\bullet-}$  que é o substrato da enzima.

Antes de realizar a determinação com o homogeneizado, fez-se a medida do meio de reação (glicina-NaOH 50 mM, pH 9,6) com 50  $\mu$ L de adrenalina (60 mM, pH 2,0). Essa mistura foi agitada e lida a 480 nm. Posteriormente, adicionaram-se diferentes volumes do homogeneizado e mediu-se a inibição da reação. A atividade enzimática foi expressa em unidades SOD/g de tecido (quantidade de SOD que inibe em 50% a velocidade de redução da adrenalina) (MISRA; FRIDOVICH, 1972).

### 3.3.3.10 Atividade da Enzima Catalase (CAT)

A enzima catalase catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade enzimática e obedece a uma cinética de pseudoprimeira ordem com respeito ao peróxido de hidrogênio. O ensaio consiste em medir a diminuição da absorção a 240 nm (longitude de onda pela qual absorve o peróxido de hidrogênio).

A medida espectrofotométrica consiste em colocar na cubeta o meio de reação (solução reguladora de fosfato 50 mM) com distintas alíquotas da amostra. Depois, faz-se um gráfico com uma linha de base. Em seguida, adiciona-se 20  $\mu$ L de  $H_2O_2$  300 mM. A concentração foi expressa em pmol/g de tecido (AEBI, 1984).

### 3.3.3.11 Atividade da Enzima Glutationa Peroxidase (GPx)

A enzima catalisa a redução do  $H_2O_2$ , utilizando o GSH como um doador de hidrogênio. A atividade da GPx pode ser avaliada medindo a velocidade de consumo de NADPH em um sistema que contenha GSH. A técnica consiste em determinar a atividade da enzima espectrofotometricamente, medindo-se a velocidade de oxidação de NADPH em uma mistura de reação.

Em uma cubeta, são colocados 500  $\mu$ L de solução reguladora de fosfatos de potássio (100 mM, pH 7,0), 100 $\mu$ L de  $H_2O$  bidestilada, 50  $\mu$ L de Azida Sódica 20mM, com 50  $\mu$ L de glutatona reduzida (GSH) 40mM, 50 $\mu$ L de glutatona redutase (GR) e 50  $\mu$ L NADPH. Essa mistura é incubada durante 3 minutos, e logo após se adiciona 100  $\mu$ L de amostra diluída e 100  $\mu$ L de  $H_2O_2$ . As amostras são lidas a 340 nm. A atividade foi expressa em nmol/min/mg de proteína (FLOHE; GUNZLER 1984).

### 3.3.3.12 Avaliação dos Metabólitos do Óxido Nítrico ( $NO_2/NO_3$ )

O NO é substância extremamente lábil, com meia-vida de apenas alguns segundos em sistemas biológicos. Dessa forma, a medida pode ser feita de forma indireta pela medida de nitritos e nitratos. Este método consiste na transformação de nitratos e nitritos por meio do nitrato redutase. Para isso, utiliza-se, posteriormente, o reativo de Griess.

Para realizar a técnica foram necessários 500  $\mu$ L de amostra, 100  $\mu$ L NADPH (0,2 mM), 70  $\mu$ L tampão Tris 1M, pH 7,5, 230  $\mu$ L de uma mistura formada por 6P (50 mM) e glicose 6-fosfato desidrogenase (100 U/mL), 100  $\mu$ L de nitrato redutase (10/mL). Essa mistura foi incubada à temperatura ambiente durante trinta minutos.

Posteriormente, utilizaram-se 750  $\mu$ L dessa mistura e adicionaram-se 750  $\mu$ L do reativo de Griess, incubando-a novamente à temperatura ambiente, durante dez minutos. A leitura foi realizada a 550 nm e feita uma curva padrão para a determinação de nitritos e nitratos (GRANGER; ANSTEY *et al.*, 1999).

### 3.3.3.13 Western Blot

Foi usada a técnica de Western Blot para determinar a expressão das proteínas **Bcl-2**, **Bax** e **pERK**. Os homogenizados de fígado foram preparados em 0.25 mM sacarose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, e 1% de inibidor de protease (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). O homogeneizado foi incubado durante trinta minutos, a 4°C, e centrifugado a 13.000 xg durante trinta minutos, a 4°C, retirando o sobrenadante e alicotando a amostra. As proteínas (25-50 µg) foram separadas por gel de poliacrilamida 10-12% e transferidas eletricamente para membranas de difluorido de polivinilideno (Millipore, Bedford, MA, USA).

Posteriormente as membranas foram colocadas na solução de bloqueio Tris/salina-tamponada/Tween-20 (TBST - 5% de leite em pó desnatado em tampão fosfato salina-Tris contendo 0,05% Tween 20) durante 30 minutos, a 37° C. As membranas ficaram incubadas durante toda a noite a 4°C com anticorpos policlonais Bax (1:200 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Bcl-2 (1:800 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), fosfo-ERK1/2 (1:200 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e β-actina (1:1000 Sigma, St Louis, MO, USA), usada para normalizar a intensidade das bandas entre as amostras.

Depois disso, as membranas foram lavadas com PBS-T e incubadas durante uma hora em temperatura ambiente com um anticorpo anti-imunoglobulina de coelho, unido a HRP (DAKO, Glostrup, Dinamarca). As proteínas foram detectadas mediante quimiluminescência, utilizando o kit comercial ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) e a densidade das bandas específicas foi quantificada com um densitômetro de imagen (Scion Image, Maryland, MA, USA).

### 3.3.3.14 Análise Estatística

Os dados foram calculados e analisados utilizando ANOVA. *Post hoc* de múltiplas comparações foi executado com teste de *Duncan*. Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa estatístico SPSS versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EFEITOS DA TAA E DA QUERCETINA NAS ENZIMAS HEPÁTICAS

Tabela 2 – Valores das enzimas de integridade hepática no soro dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	CO	Q	TAA	TAA+Q
AST (U/L)	177,9 ± 29,2	189,8±66,5	497,8±123,5 <sup>a</sup>	198,9±41,8
ALT (U/L)	42± 4,4	36,8±9,8	271,4±87,3 <sup>a</sup>	37,3±7,9

Resultados representados pela média ± desvio padrão.

a Diferença significativa entre o grupo TAA e os grupos CO, Q e TAA+ Q, considerando  $p \leq 0,05$ .

A administração de TAA levou a um aumento significativo nos níveis das aminotransferases séricas, comparado aos ratos não tratados (Tabela 2). Este aumento foi significativamente atenuado nos ratos tratados com quercetina por 4 dias ( $p \leq 0,05$ ).

## 4.2 HISTOLOGIA DO TECIDO HEPÁTICO NOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

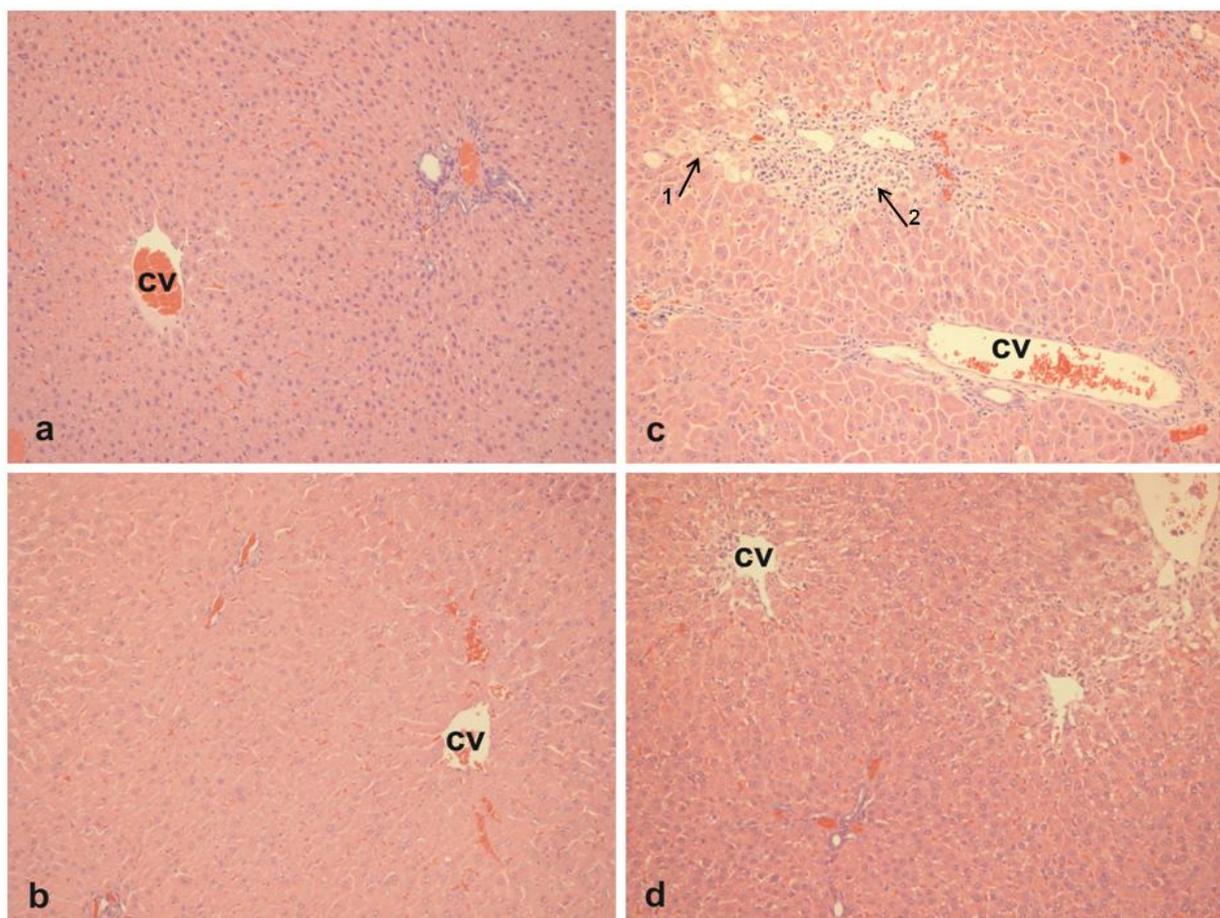


Figura 12 – Histologia de cortes de fígado de animais do grupo controle (a), controle + quercetina (b), com lesão hepática por TAA (c) e TAA tratados com quercetina (d), evidenciando o espaço porta, em aumento original de 200X. Seta 1: necrose em absorção; seta 2: infiltrado inflamatório

A análise histopatológica foi realizada em amostras de fígado, podendo-se fazer uma comparação entre os grupos através do aumento original de 200X. As amostras de fígado do grupo controle (Figura 12a) apresentaram hepatócitos normais, com citoplasma e núcleo bem preservados, assim como o grupo controle que recebeu apenas quercetina (Figura 12b). Os animais que receberam TAA (Figura 12c), no entanto, evidenciaram a presença de necrose perivenular em absorção, ou necrose residual e infiltrado inflamatório com linfócitos e macrófagos. As alterações foram mínimas em ratos tratados com quercetina após lesão hepática induzida por TAA (Figura 12d). Este grupo apresentou apenas pequena quantidade de infiltrado inflamatório.

## 4.3 VALORES DE TBARS NOS DIVERSOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

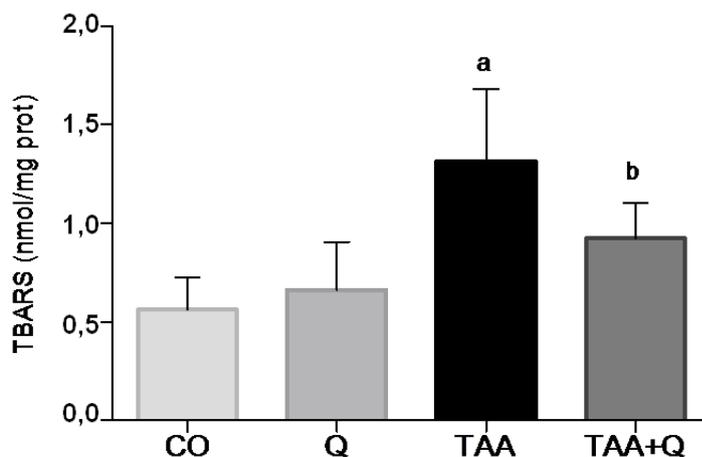


Figura13 – Valores de TBARS em fígados de ratos após uso de TAA e quercetina. Resultados representados pela média  $\pm$  desvio padrão. a Diferença significativa entre o grupo TAA e os grupos CO, Q e TAA+ Q, considerando  $p \leq 0,05$ . b Diferença significativa entre o grupo TAA+ Q e os grupos CO, Q e TAA, considerando  $p \leq 0,05$ .

Os níveis de TBARS foram significativamente aumentados nos ratos que receberam somente TAA, se comparados aos ratos controles. O tratamento com quercetina reduziu significativamente os níveis de TBARS no fígado quando comparados ao grupo TAA, mas não re-estabeleceu os níveis de TBARS iguais aos dos controles ( $p \leq 0,05$ ; Figura 13).

## 4.4 EFEITOS DA TAA E DA QUERCETINA SOBRE AS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Tabela 3 – Valores das enzimas antioxidantes no fígado de animais dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	CO	Q	TAA	TAA+Q
SOD(U/g)	6,32±1,89	6,19±2,21	21,70±7,31 <sup>a</sup>	10,67±5,00
CAT (pmol/g)	10,86±2,20	9,11±3,06	4,41±1,74 <sup>a</sup>	18,40±3,71 <sup>b</sup>
GPx(nmol/min/mgPROT)	0,011 ±0,004	0,013±0,003	0,144±0,039 <sup>a</sup>	0,093±0,020 <sup>b</sup>

Resultados representados pela media ± desvio padrão.

a Diferença significativa entre o grupo TAA e os grupos CO, Q e TAA+ Q, considerando  $p \leq 0,05$ .

b Diferença significativa entre o grupo TAA+ Q e os grupos CO, Q e TAA, considerando  $p \leq 0,05$ .

Nossos resultados revelaram que a atividade da SOD no fígado sofreu um aumento significativo no grupo que recebeu TAA ( $p \leq 0,05$ ). No entanto, no grupo que recebeu TAA e posterior tratamento com quercetina, a atividade da SOD hepática reduziu significativamente em comparação com o grupo TAA, retornando aos níveis de atividade enzimática próximos dos animais controle.

Por outro lado, a atividade da catalase foi reduzida significativamente no grupo TAA ( $p \leq 0,05$ ), enquanto o tratamento com quercetina após TAA elevou de maneira significativa a atividade da catalase comparada ao grupo controle.

Um aumento significativo da atividade da GPx nos homogeneizados de fígado foi observado nos ratos administrados com TAA ( $p \leq 0,05$  Tabela 3). No grupo tratado com quercetina após a administração de TAA, a atividade da GPx diminuiu significativamente em comparação com o grupo TAA ( $p \leq 0,05$ ), mas não chegando aos níveis do grupo controle.

#### 4.5 EFEITOS DA TAA E DA QUERCETINA SOBRE OS NÍVEIS DE NITRITOS E NITRATOS

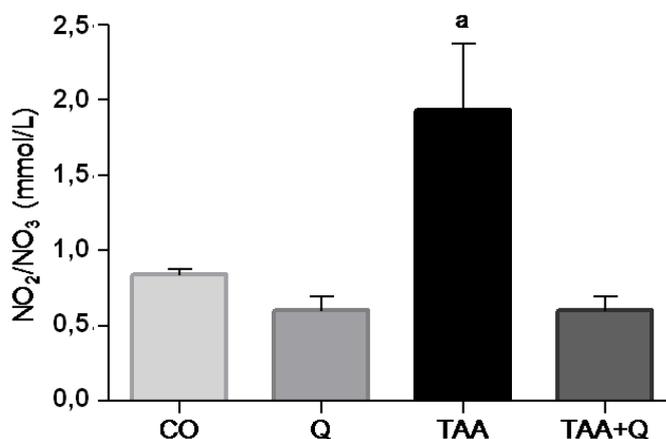


Figura 14 – Quantificação dos níveis de nitritos e nitratos em fígado de animais com toxicidade hepática por TAA e tratados com quercetina. Resultados representados pela média  $\pm$  desvio padrão. a Diferença significativa entre o grupo TAA e os grupos CO, Q e TAA+ Q, considerando  $p \leq 0,05$ .

A figura 14 mostra que os níveis de nitritos/nitratos no homogeneizados de fígados foram significativamente mais elevados no grupo administrado com TAA ( $p \leq 0,05$ ). O tratamento com quercetina levou a uma redução significativa nos níveis de nitritos/nitratos em relação aos animais que receberam a TAA ( $p \leq 0,05$ ), re-estabelecendo aos níveis similares aos animais do grupo controle.

#### 4.6 EFEITOS DA TAA E DA QUERCETINA NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO PROCESSO DE APOPTOSE

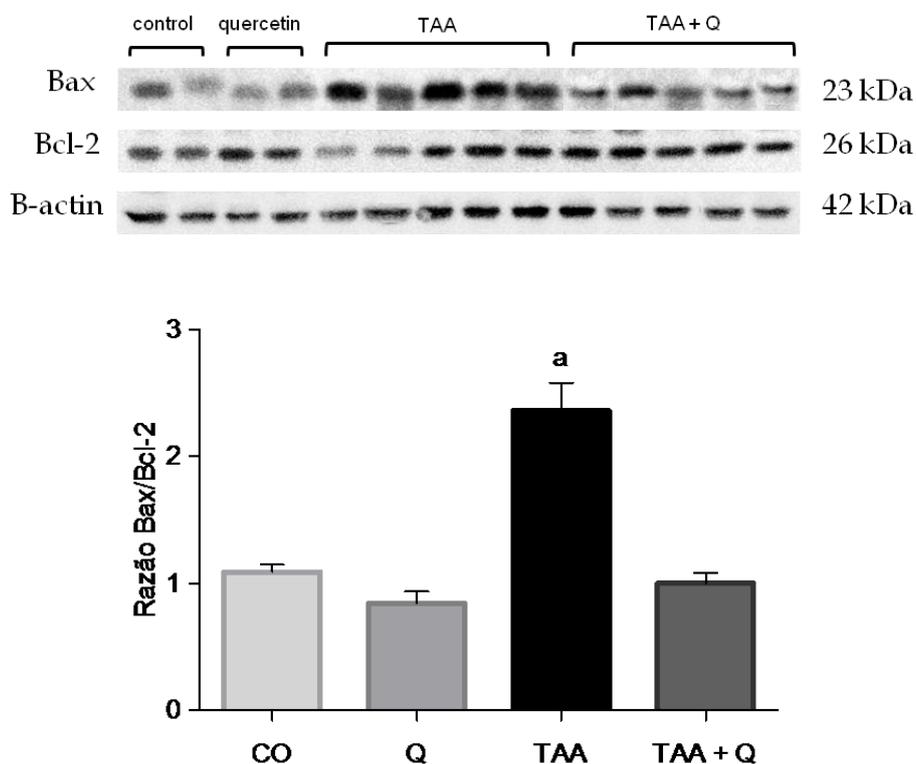


Figura 15 – Expressão das proteínas Bax e Bcl-2. Resultados representados pela média  $\pm$  desvio padrão. a Diferença significativa entre o grupo TAA e os grupos CO, Q e TAA+ Q, considerando  $p \leq 0,05$ .

A Figura 15 mostra a representação quantitativa da expressão das proteínas Bax e Bcl-2 em animais com e sem tratamento com quercetina. A análise densitométrica revelou que a razão entre as proteínas pro- e antiapoptótica (Bax/Bcl-2) foi significativamente aumentada nos animais com toxicidade hepática pela TAA ( $p \leq 0,05$ ). O tratamento com quercetina, por outro lado, preveniu significativamente essas mudanças, resultando em uma razão Bax/Bcl-2 significativamente inferior quando comparados aos animais com TAA (Figura 15).

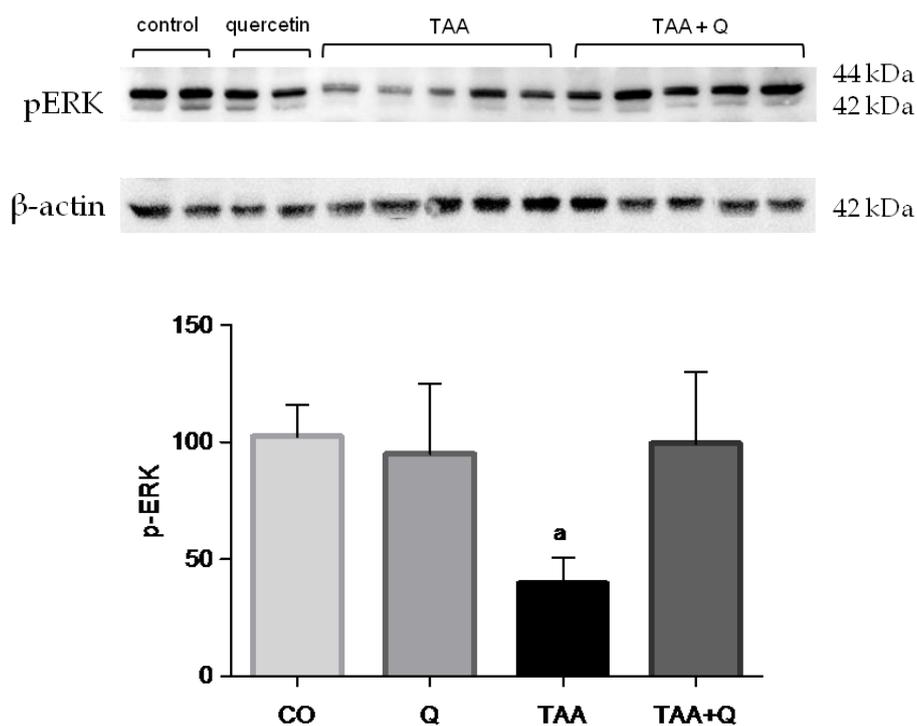


Figura 16– Expressão da proteína p-ERK1/2. Resultados representados pela média  $\pm$  desvio padrão. a Diferença significativa entre o grupo TAA e os grupos CO, Q e TAA+ Q, considerando  $p \leq 0,05$ .

A expressão da p-ERK1/2 mostrou-se significativamente diminuída nos ratos tratados com TAA em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ ). O tratamento com quercetina manteve a expressão da p-ERK1/2 no nível dos animais dos grupos controle (Figura 16).

## 5 DISCUSSÃO

A lesão hepática induzida por drogas é um problema clínico importante e até o momento sem solução. Ela surge através de complexos mecanismos de várias etapas, que são iniciadas pelo dano químico às células do fígado, desencadeando respostas biológicas, que podem ser protetoras ou resultar em toxicidade (KAPLOWITZ, 2005).

A biotransformação de químicos tóxicos e de carcinógenos é mediada por enzimas celulares, incluindo o citocromo P450 (P450). P450 é uma enzima que contém o grupo heme e que catalisa a oxidação de uma grande variedade de compostos endógenos e exógenos, incluindo medicamentos, substâncias cancerígenas e outros produtos químicos xenobióticos (GUENGERICH, 2003).

Vários estudos revelaram que o tratamento de camundongos e ratos com tioacetamida (TAA) induziu danos celulares no fígado, fibrose e/ou cirrose, associada ao aumento do estresse oxidativo e ativação das células estreladas hepáticas (PORTER et al., 1979; MULLER et al., 1988; SANZ et al., 1995; LI et al., 2002; KANG et al., 2005a).

Em estudo realizado em camundongos com genótipos nulos de P450E1, observou-se a falta de hepatotoxicidade nesses camundongos após administração de TAA, em claro contraste com os camundongos do tipo selvagem, em que o aumento do estresse oxidativo mediado pela P450E1 é essencial para que o dano ocorra (KANG et al., 2008). Sabe-se que distúrbios na produção de oxidante e antioxidante em favor do oxidante levam a danos celulares, os quais são denominados danos oxidativos ou estresse oxidativo (AITKEN, 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2009).

Apesar de alguns importantes progressos terem sido feitos na investigação da patogênese das toxicidades do fígado, os tratamentos atuais para essas doenças ainda não são satisfatórios. Recentemente, foi relatado que os fitoterápicos exercem um papel significativo na terapia dos distúrbios hepáticos (ARTEEL, 2003; COBALLASE-URRUTIA et al., 2010).

Um grande número de fitoquímicos e extratos preparados a partir de plantas medicinais populares com comprovadas propriedades hepatoprotetoras poderia ser uma alternativa no tratamento de doenças hepáticas resultantes do uso de agentes

tóxicos, que são muitas vezes relacionadas ao estresse oxidativo (WILLIAMS et al., 2004; NOVO; PAROLA, 2008; CONDE DE LA ROSA et al, 2008).

A quercetina, um composto flavonóide, é encontrada em diversas plantas e alimentos e possui amplas propriedades biofarmacológicas (DUTHIE; DOBSON, 1999; DENG et al., 2005; SASAKI et al., 2007). A quercetina demonstra seu poder antioxidante “varrendo” os radicais livres e inibindo a oxidação de diversas moléculas (WILLIAMS et al., 2004; AVIRAM; FUHRMAN, 2002), e tem mostrado efeitos benéficos em estudos experimentais de hepatopatias (DIAS et al., 2005; AMALIA et al., 2007; TIEPPO et al., 2009).

O consumo elevado de álcool, a exposição a xenobióticos e a drogas terapêuticas, além de outros fatores, podem determinar doenças hepatotóxicas. Na presente investigação, os animais expostos à TAA apresentaram aumento nas enzimas hepáticas ALT e AST, em relação aos animais do grupo controle, o que não foi observado nos animais que receberam tratamento com quercetina (Tabela 2).

Ahmad et al. (2002) mostraram que a administração crônica de TAA em ratos levou a um aumento significativo nos níveis séricos de ALT e AST. Pawa & Ali, 2006, utilizando ratas fêmeas, observaram um aumento importante nos níveis séricos das enzimas hepáticas em modelo de Insuficiência Hepática Fulminante. Outro estudo revelou um aumento significativo nos valores das enzimas ALT e AST um dia após a administração de uma única dose de TAA 300mg/Kg. Estes valores retornaram aos níveis dos controles no terceiro dia após indução do dano (IDE et al., 2003).

As lesões hepáticas induzidas por TAA são evidenciadas por necrose de hepatócitos e infiltração celular, num processo complexo, caracterizado pela ativação simultânea de múltiplas vias que culminam na perda da integridade da membrana celular, causando a perda de constituintes celulares (TREY, 1970), alterações morfológicas evidenciadas em diversos estudos realizados com a administração de TAA em ratos (KANG et al., 2008; MEHMETCÇIK et al., 2008; BASKARANA et al. 2010).

No presente trabalho, os dados histopatológicos apontam para o efeito preventivo da quercetina contra a toxicidade induzida pela TAA. Ao avaliarmos a hepatotoxicidade por TAA utilizando coloração por HE, observamos alterações histopatológicas graves, com a presença de necrose hepática perivenular em absorção, infiltração de células inflamatórias e eventuais células gigantes multinucleadas (Figura 12C). Estes resultados encontram-se de acordo com outros

estudos realizados por diferentes autores (PAWA; ALI, 1999; KANG et al., 2008; MEHMETÇIK et al., 2008; BASKARANA et al., 2010), levando em consideração o fato de que a administração da TAA é realizada de maneira diferente em cada estudo. A dose, a quantidade de injeções e o tempo entre cada administração são diferentes nos diversos estudos avaliados utilizando a TAA para induzir a toxicidade do fígado, não havendo um protocolo padrão até o momento (IDE et al., 2003; RAHMAN & HODGSON, 2003; MEHMETÇIK et al., 2008).

O tratamento com quercetina parece prevenir de forma significativa a toxicidade da TAA, como se pode observar na histologia que mostra o espaço porta normal (Figura 12D), as células hepáticas com o citoplasma bem-preservedo, com núcleo e nucléolo proeminentes e a presença mínima infiltrado inflamatório. A histologia dos cortes de fígados de animais controle apresentaram células hepáticas normais com citoplasma bem conservado e núcleo proeminente (Figura 12A).

Em todos os tipos de danos ao fígado há evidências consistentes do aumento do estresse oxidativo e/ou da redução significativa das defesas antioxidantes (LOGUERCIO; FEDERICO, 2003). O estresse oxidativo e a inflamação contribuem para a patogênese do dano hepático agudo induzido por álcool, CCl<sub>4</sub>, tioacetamida e por endotoxinas (LOGUERCIO; FEDERICO, 2003; OKUYAMA et al., 2003; PAVANATO et al., 2003; RITTER et al., 2004; WANG et al., 2004, AMÁLIA et al., 2007).

Neste estudo, houve um aumento da peroxidação lipídica nos fígados dos ratos que receberam TAA, demonstrado pelos valores de TBA-RS (Figura 14). A peroxidação da membrana celular leva à desorganização molecular dos lipídeos, resultando em aumento da permeabilidade da membrana e extravasamento das enzimas celulares na circulação (MASON et al., 1997). O aumento da peroxidação lipídica está associado com a indução de P450E1 em lesões hepáticas experimentais (LECLERCQ et al. 2000), a sobrecarga oxidativa aumenta a peroxidação lipídica na toxicidade induzida por TAA (KANG et al., 2005b).

Isso indica que as lesões hepáticas produzidas por TAA são resultado do estresse oxidativo, que surge em resposta ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, que são conhecidas por atacar várias moléculas biológicas, incluindo lipídios, e causando peroxidação lipídica.

Estes resultados são coerentes com a literatura (BRUCK et al., 1999), que mostra o papel das EROs na hepatotoxicidade induzida por TAA. A quercetina

provavelmente agiu restringindo a produção de EROs e/ou eliminando-as do organismo, uma vez que, dentro da família dos flavonóides, a quercetina é o mais potente *scavenger* de EROs (CUSHNIE; LAMB, 2005), e ERNs como o óxido nítrico ( $\text{NO}^*$ ) (HAENEN; BAST, 1999) e o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (HEIJNEN et al, 2001).

Essa capacidade antioxidante da quercetina é atribuída à presença de dois locais específicos da molécula, que possuem características específicas que possibilitam as interações moleculares. Tais regiões, que são denominadas farmacóforos, possuem a configuração ideal para a eliminação de radicais livres, ou seja, o grupo catecol no anel B e o grupo OH na posição 3 do anel AC (HEIJNEN et al., 2002).

Os resultados do estudo de Rosa et al. (2010) demonstram que o estresse oxidativo observado tem relação com o dano causado pelo tetracloreto de carbono e que o uso de melatonina minimizou esses danos atuando como antioxidante (ROSA et al., 2010). Em outro estudo a N-acetilcisteína, com conhecido poder antioxidante, demonstrou oferecer proteção contra a fibrose hepática e o estresse oxidativo em fígados de ratos cirróticos (PEREIRA-FILHO et al., 2008). Além disso, a quercetina aumentou a estabilidade genômica em ratos com cirrose hepática, sugerindo efeitos benéficos, provavelmente por suas propriedades antioxidantes (TIEPPO et al., 2007).

Como o estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre a geração das espécies reativas de oxigênio (e/ou nitrogênio) e a capacidade de defesa corporal, tanto endógena quanto exógena, e sendo o sistema de defesa antioxidante enzimático um dos componentes mais ativos deste complexo, foram avaliados os níveis das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) nos fígados dos ratos deste estudo em apreço (Tabela 3).

A SOD é uma enzima essencial na desintoxicação de radicais  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O aumento da atividade da superóxido dismutase se dá provavelmente em decorrência da dismutação do íon superóxido que está elevado quando do estresse oxidativo. Esse aumento de SOD conseqüentemente pode resultar na formação acentuada de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Isto, combinado com a diminuição na atividade da catalase, pode levar a um aumento no acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nos tecidos e, assim, induzir o estresse oxidativo. As peroxidases são enzimas que utilizam uma variedade de redutores celulares para inativar peróxidos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2009).

O presente estudo indicou uma elevação significativa na atividade da SOD e GPx, mas níveis diminuídos de catalase nos animais intoxicados por TAA (Tabela 3). Da mesma maneira, um estudo de Goel et al. (2005), que avaliou a toxicidade hepática induzida por Clorpirifós, um inseticida organofosforado muito utilizado na agricultura, também demonstrou resultados semelhantes aos nossos (GOEL et al., 2005).

Por outro lado, alguns estudos mostram que a atividade das enzimas SOD, catalase e glutathione peroxidase na hepatotoxicidade induzida por drogas é reduzida (ALI et al., 2008; BASKARAN et al., 2010). Essa aparente contradição pode ser devida a diversos fatores, entre os quais a especificidade do tecido, variações na gravidade ou duração da doença, ou outras condições experimentais (ESSANI et al., 1996).

O principal problema da elevada formação de  $H_2O_2$  é que ele atravessa facilmente as membranas celulares e, ao receber mais um elétron, normalmente proveniente do ferro ou do cobre, origina o radical hidroxil. Este último é, entre as EROs conhecidas, uma das mais reativas, pois necessita somente de mais um elétron para se estabilizar, e a consequência disto é a oxidação dos fosfolipídios de membranas celulares e subcelulares, do DNA, e das proteínas (DURAN; CADENAS, 1987).

As enzimas antioxidantes SOD, GPx e catalase limitam os efeitos de moléculas oxidantes dos tecidos e atuam na defesa contra a lesão celular oxidativa por serem “varredores” de radicais livres. No nosso estudo, o aumento significativo da atividade da SOD e da GPx hepática, após a administração de TAA (Tabela 3), mostrou uma ativação do mecanismo de compensação através do efeito da droga sobre as células progenitoras. A extensão desse efeito é dependente da magnitude do estresse oxidativo e, conseqüentemente, da dose do agente estressor (PRAKASAM et al., 2001).

Estes resultados podem ser uma resposta ao dano oxidativo no tecido hepático ocasionado pela ação tóxica da TAA às células hepáticas, provocando aumento da lipoperoxidação, como demonstrado pelos níveis elevados de TBARS e, dessa forma, levando ao aumento da atividade da enzima SOD, que exerce um importante papel no balanço redox celular, na tentativa de dismutar radicais livres e proteger tecidos contra possíveis danos oxidativos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; FILIPPIN et al., 2008).

O tratamento com quercetina conseguiu impedir que os níveis de atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx sofressem uma elevação tão grande. Entretanto, a diminuição da atividade da catalase nos animais que receberam TAA pode causar o acúmulo de  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  ou seu produto de decomposição. A perda de atividade da catalase resulta na intolerância ao oxigênio e desencadeia uma série de reações prejudiciais, tais como oxidação do DNA e de proteínas e a morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2009). Os animais tratados com o antioxidante quercetina tiveram um aumento na atividade da enzima catalase.

Spolarics et al., 1997 e Lukaszewicz & Moniuszko, 2004 sugerem, em seus estudos, que a GPx é responsável pela desintoxicação do peróxido de hidrogênio, quando este está presente em baixa concentração. Enquanto isso, a catalase desempenha o seu papel quando a via da GPx atinge a saturação com o substrato (SPOLARICS; WU, 1997; ŁUKASZEWICZ-HUSSAIN; MONIUSZKO-JAKONIUK, 2004).

O NO e seus produtos de oxidação estão implicados na toxicidade de uma variedade de xenobióticos. De igual forma, o mesmo ocorre na hepatite viral (LIU et al., 1992) e na lesão hepática pós-isquêmica (UHLMANN et al., 2000). Em muitos desses casos, o NO afeta os tecidos e contribui à formação de lesão hepática, enquanto em outros modelos ele protege contra a toxicidade do fígado (HARBRECHT et al., 1992; KIM et al., 2000).

Em qualquer situação, suas ações podem ser devido à sua capacidade de agir como oxidante ou como antioxidante. A maioria dos tipos de células do fígado produzem NO, sendo necessárias, no entanto, mais pesquisas para definir o papel de cada uma dessas células no processo de lesão hepática induzida por xenobióticos e os mecanismos pelos quais o NO regula a necrose e a apoptose (LASKIN et al., 2001).

Nesta investigação optamos por um ensaio baseado no reagente de Griess (GRANGER et al., 1999), que é específico para nitritos. O aumento dos níveis de nitritos ( $NO_2^-$ ) e nitratos ( $NO_3^-$ ) observado nos fígados dos animais com dano devido à ação da TAA (Figura 15) está de acordo com estudos prévios de outros autores, que investigaram lesão hepática por isquemia/reperfusão e por fibrose (ISOBE et al., 2000; VERCELINO et al., 2008; SHAKER et al., 2010). Em doenças inflamatórias sistêmicas como sepse e gastroenterite grave, os níveis de nitritos e nitratos

mostram-se também elevados devido à considerável indução da iNOS (CRAWFORD et al., 2004).

Os dados do estudo de Shaker et al. (2010) mostram um aumento do estresse oxidativo decorrente da administração de TAA por 12 semanas, o que está relacionado com a elevação do malondialdeído (MDA) hepático e dos metabólitos do NO, entre outras alterações (SHAKER et al., 2010), situação observada em nossa investigação. Outros autores sugerem fortemente a importância do NO na patogênese da hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol, evidenciado pelo aumento dos nitritos/nitratos totais no fígado dos animais (LASKIN et al., 1995;. GARDNER et al., 1998;. GARDNER et al., 2002). A hepatotoxicidade induzida pela D-galactosamina em ratos também demonstrou elevação nos níveis totais de nitratos/nitritos (TAYE et al., 2009).

Alguns estudos relatam observações que reforçam o conceito de que a iNOS desempenha um papel importante na fisiopatologia da lesão hepática induzida pela tioacetamida, assim como já foi demonstrado por outras toxinas (HWANG et al., 1999; GARDNER et al., 1998; RAHMAN; HODGSON, 2003). Pavanato et al. (2003) demonstraram um aumento significativo na expressão da iNOS em fígados de animais com cirrose induzida por CCl<sub>4</sub> (PAVANATO et al., 2003).

O uso diário de quercetina na dose de 50 mg/Kg preveniu o aumento significativo dos níveis de nitritos e nitratos induzidos pela TAA (Figura 14). Esse resultado pode ser explicado pela atividade inibitória da quercetina contra a produção de óxido nítrico, de TNF- $\alpha$ , de NF- $\kappa$ B e de outros fatores envolvidos na sinalização do processo inflamatório (KAWADA et al. 1998; CHEN et al. 2005; DIAS et al., 2005; COMALADA et al. 2006). Recentemente, foi relatado que a quercetina inibe a produção de NO induzida por lipopolissacarídeos (LPS) em células murinas de microglia BV2 (LEE et al., 2007).

Foi relatado por Martínez-Flórez et al. (2005) que o estímulo de hepatócitos com IL-1 causou um aumento significativo dos nitritos em meio de cultura. Este aumento foi significativamente prevenido pela adição simultânea de quercetina a 100  $\mu$ mol/L (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2005).

Uma proteína que parece ser importante na proteção contra o NO é a Bcl-2, membro de uma família de proteínas reguladoras de apoptose. Alguns membros dessa família (Bcl-2, Bcl-xL) são conhecidos por suprimir a apoptose, enquanto outros (Bax, Bak) promovem apoptose. A dimerização dos membros pró e anti-

apoptóticos dessa família pode regular a sobrevivência da célula (GRAD et al., 2000).

A intervenção da apoptose pela quercetina foi relatada em diversos tipos celulares (ISHIKAWA; KITAMURA, 2000). A quercetina inibe apoptose induzida por  $H_2O_2$  das células mesangiais, fibroblastos, e células epiteliais. Em geral, ela facilita a apoptose das células tumorais, mas não em células normais através da supressão de uma molécula endógena citoprotetora, proteínas de choque térmico (Hsp70) (HOSOKAWA et al., 1990).

O conteúdo de proteína citosólica para as moléculas de Bax e Bcl-2, envolvidas no processo de apoptose das células, foi avaliado em nossa pesquisa pela técnica de Western blot. Nossos resultados, representados na Figura 15, confirmam que a expressão de Bax foi significativamente aumentada e a expressão de Bcl-2 reduziu essencialmente 4 dias após a toxicidade hepática induzida pela TAA.

Bor-Ru Lin et al (2009) mostraram que a razão Bax/Bcl-2 elevada por lesão hepática por D-Galactosamina levou à produção de  $O_2^*$ , a translocação de Bax para a mitocôndria, a liberação do citocromo c para o citoplasma, ativação de CPP32 e aumentou os fragmentos da PARP, dando início à apoptose. Podemos dizer, portanto, que o aumento EROs, confirmado pelo aumento da peroxidação lipídica expressa pelo TBARS (figura 13) e o consequente aumento da razão Bax/Bcl-2 revelado pelo Western Blot (Figura 15), induziram a morte celular por apoptose em fígado de ratos submetidos à ação da TAA.

Um estudo da isquemia/reperfusão em rins de ratos mostrou um aumento de EROs, elevando a razão Bax/Bcl-2, com a ativação da caspase 3, levando à apoptose e autofagia tubular renal (CHIEN et al., 2007). Sendo assim, quando Bcl-2 é superexpressa, como foi o caso do grupo sob ação da TAA, ela se liga à Bax formando um heterodímero e bloqueia a morte da célula. Quando a ligação é interrompida, a função protetora de Bcl-2 também é eliminada, o que sugere que Bcl-2 deve-se ligar a Bax para exercer seu efeito (YANG; KORSMEYER, 1996).

O tratamento com quercetina realizado em nossos experimentos preveniu essas alterações, resultando em uma razão Bax/Bcl-2 significativamente inferior quando comparado ao grupo TAA, que não recebeu tratamento com quercetina (Figura 15).

Bournival et al. (2009) demonstraram que a quercetina poderia reduzir a apoptose de células neuronais PC12 induzida por neurotoxina, diminuindo a razão Bax/Bcl-2, inibindo a translocação nuclear do fator indutor de apoptose (FIA) e a liberação do citocromo *c* citosólico, dando suporte ao papel neuroprotetor deste polifenol mediado por complexos processos intracelulares (BOURNIVAL et al., 2009). Estudos anteriores mostraram que os flavonóides, incluindo a quercetina, têm a capacidade de inibir a ativação da ERK (REINERS et al., 1998), assim como a S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) inibiu a expressão da ERK fosforilada em modelo de cirrose por ligadura de ducto biliar comum (VERCELINO et al., 2010). Outras investigações anteriores mostraram a peroxidação lipídica induzida pela H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em associação com a morte celular, em que a quercetina inibiu o processo (KUHLMANN et al., 1998).

No presente estudo, a p-ERK1/2 apresentou-se diminuída 4 dias após a indução de toxicidade hepática pela TAA, como mostra a figura 16. Estes resultados indicam que a ativação da p-ERK1/2 poderia ocorrer mais cedo, e que o sinal de apoptose e necrose induzidas por uma dose elevada de tioacetamida, pode bloquear a resposta celular aos fatores de crescimento e sobrevivência que agem pela rota da ERK.

Em acordo com nossos resultados, estão outros resultados encontrados em modelos de dano hepático. A ERK1/2 fosforilada aumentou significativamente de maneira transitória logo após lesões hepáticas (KISHIOKA et al., 2007; KITAMURA et al., 2010; GARCÍA-LASTRA et al., 2010). Em um modelo murino de isquemia por 45 min e reperfusão, a ERK2 fosforilada aumentou significativamente de maneira transitória 1,5 horas após a reperfusão em ambas as regiões isquêmica e não-isquêmica (KOBAYASHI et al., 2006).

No presente estudo, o tratamento com o flavonóide quercetina manteve os níveis da p-ERK1/2 semelhantes aos controles, evidenciando um provável efeito protetor do antioxidante, evitando a morte das células hepáticas por apoptose (Figura 16).

Assim, os resultados do nosso estudo mostram que o tratamento com quercetina durante 4 dias; após, a administração da TAA reduziu o dano hepático provocado pelo hepatotóxico, mostrado pela redução dos níveis das enzimas hepáticas ALT e AST (Tabela 2). Além disso, os resultados mostraram que a quercetina tem um efeito protetor sobre o estresse oxidativo, como percebido pelo

decréscimo significativo da peroxidação lipídica, bem como no “status” das enzimas antioxidantes e pela morfologia normal do fígado.

Em resumo, demonstramos que a apoptose dos hepatócitos foi significativamente maior em lesões hepáticas induzidas pela TAA. Nossos resultados indicam que o aumento do estresse oxidativo e sua ativação p-ERK1/2 associados, bem como um desequilíbrio de proteínas pró e anti-apoptótica na família Bcl-2, contribuíram para alta de apoptose dos hepatócitos que podem desempenhar um papel significativo na patogênese da TAA a lesão do fígado. Estes resultados sugerem que a quercetina, por sua inibição do estresse oxidativo e/ou intervenção direta sobre as vias de apoptose, poderia ser uma droga com potencial terapêutico para a toxicidade hepática.

## 6 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos nos experimentos, conclui-se que:

- 1) A indução do dano tóxico ao fígado pela TAA foi efetiva. A quercetina mostrou efeito benéfico na redução do dano causado pela TAA.
- 2) As enzimas séricas AST e ALT tiveram um aumento significativo nos animais do grupo TAA. O grupo TAA + Q mostrou redução significativa, com valores semelhantes aos dos grupos controle e Q.
- 3) A TAA produziu alterações histopatológicas significativas, com a presença de necrose perivenular em absorção, infiltrado inflamatório com linfócitos e macrófagos e eventuais células gigantes multinucleadas. O tratamento com quercetina preveniu o surgimento dessas alterações, consequentemente impedindo o dano tóxico ao fígado.
- 4) O grupo TAA apresentou aumento da lipoperoxidação no tecido hepático, avaliado por TBARS. Com o tratamento, a lipoperoxidação foi reduzida no grupo TAA + Q. Houve aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx nos animais do grupo TAA, onde a CAT apresentou redução. A quercetina reduziu a atividade das enzimas SOD e GPx, enquanto aumentou os níveis da CAT.
- 5) Houve aumento dos nitratos totais no fígado dos animais do grupo TAA e diminuição no grupo tratado com quercetina.
- 6) A quercetina aumentou a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e diminuiu a expressão da enzima pró-apoptótica Bax, revelando uma razão entre pro e antiapoptose (Bax/Bcl-2) reduzida, contrariando os resultados do grupo TAA. A TAA inibiu a expressão da enzima p-ERK1/2 e a

quercetina restabeleceu os níveis de expressão da enzima no tecido hepático no modelo de lesão hepática induzida por TAA.

## 6.1 CONCLUSÃO GERAL

O flavonóide quercetina utilizado neste experimento apresentou propriedades antioxidantes eficazes na redução do estresse oxidativo provocado pela TAA na indução da lesão hepática. A quercetina mostrou-se eficaz na prevenção da lesão tóxica que a TAA produz, melhorando a função hepática e inibindo o processo de apoptose e necrose no fígado. Estes resultados sugerem que a quercetina pode ser uma droga com potencial terapêutico para o tratamento de lesões hepatotóxicas.

## 7 PERSPECTIVAS

Há um interesse crescente, tanto da indústria farmacêutica como dos grandes laboratórios de investigação científica, nos mecanismos fisiopatológicos da hepatotoxicidade de drogas, por tratar-se de um importante problema de saúde pública. Além disso, os compostos flavonóides têm demonstrado efeitos protetores em diversas doenças estudadas experimentalmente.

A partir dos resultados obtidos, verificamos que a quercetina apresenta efeitos benéficos na redução dos danos provocados pela toxicidade hepática induzida por TAA. Essas evidências nos abrem perspectivas de investigar de forma mais aprofundada os efeitos da quercetina em diferentes doses e diferentes tempos de tratamento sobre ativação e sinalização de processos moleculares no fígado de ratos com hepatotoxicidade.

Nossas perspectivas focam a continuidade do estudo ampliando as investigações relacionadas aos mecanismos que envolvem o estresse oxidativo, a ativação e sinalização de rotas que levam à morte das células por apoptose e a transcrição de proteínas inflamatórias, como a COX-2, no fígado de ratos com hepatotoxicidade. Do mesmo modo, pretende-se avançar os estudos sobre os efeitos protetores da quercetina neste modelo, uma vez que ela se mostrou eficaz no tratamento da toxicidade hepática.

## REFERÊNCIAS

Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *J Biol Chem* 2000; 275: 37524–37532.

Adams DH, Eksteen B. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2006; 6, 244-25.

Adlercreutz H. Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ Hlth Perspect* 1995; 103:103-12.

Ahmad A, Pillai KK, Najmi AK, Pal SN et al. Evaluation of hepatoprotective potential of jigrine post-treatment against thioacetamide; induced hepatic damage. *J Ethnopharmacol.* 2002; 79: 35–41.

Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Devel, S.L,* 1995; 7: p. 659-668.

Aliciguzel Y et al. Activities of xantine oxidoreductase and antioxidant enzymes in different tissues of diabetic rats. *J Lab Clin Med* 2003; 142: p. 172-7.

Allen JC. Hamilton, Rancidity in foods. London: Appl Sci, 1983.

Alonso M, Melani M, Jaitovich A, Converso DP, Carreras MC, Medina JH, Poderoso JJ. Mitochondrial extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) are modulated during brain development. *J Neurochem* 2004; 89: 248–256.

Amalia PM, Possa MN, Augusto MC, Francisca LS. Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. *Dig Dis Sci* 2007;52(10):2616-21.

Amanda CG, Marcelo HG. Time resolved fluorescence spectroscopy of quercetin and morin complexes with Al<sup>3+</sup>. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2002; 58:83-9.

Amar PJ, Schiff ER. Acetaminophen safety and hepatotoxicity—where do we go from here? *Expert Opin Drug Saf* 2007; 6: 341–355.

Anand SS, Soni MG, Vaidya VS, Mehendale HM. Extent and timeliness of tissue repair determines the dose-related hepatotoxicity of chloroform. *Int J Toxicol* 2003; 22: 25–33.

Ansari MA. Protective effect of quercetin in primary neurons against A $\beta$  (1-42): relevance to Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 2008; 23:23-32.

Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Cytochromes P450 and metabolism xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(5–6):737–747.

Arteel GE. Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease. *Gastroenterol* 2003;124:778–90.

Auchincloss AH, Roux AV, Dvonch JT, Brown PL et al. Associations between recent exposure to ambient fine particulate matter and blood pressure in the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Environ Health Perspect* 2008; 116: 486–491.

Aviram M, Fuhrman B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 957:146–61.

AVMA Guidelines on Euthanasia – Formely Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *Am Vet Med Assoc* 2007.

Aydin S, Aral I, Kilic N, Bakan I, Aydin S, Erman F. The level of antioxidant enzymes, plasma vitamins C and E in cement plant workers. *Clin Chim Acta* 2004; 341: 193–198.

Bahri AK, Chiang CS, Timbrell JA. Acetylhydrazine hepatotoxicity. *Tox appl Pharmac* 1981; 60:561-569.

Baskarana Y, Periyasamyb V, Venkatramana AC. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicol* 2010; 268: 204–212

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424–C1437.

Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The J Nutr* 2003; 133:3248-54.

Bell LN, Chalasani N. Epidemiology of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Semin Liver Dis* 2009;29:337-47.

Berg J, Tymoczko J, Stryer L. *Biochemistry*. 6 ed. WH Freeman & Co, 2006.

Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. *Fisiologia*. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

Bernhardt R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J Biotechnol* 2006; 124:128-145.

Bha NR, Zhang P, Lee JC et al. Extracellular signalregulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxinstimulated primary glial cultures. *J Neurosci* 1998; 18: 1633-41.

Biour M, Ben Salem C, Chazouilleres O, Grange JD, Serfaty L, Poupon R. [Drug-induced liver injury; fourteenth updated edition of the bibliographic database of liver injuries and related drugs]. *Gastroenterol Clin Biol* 2004;28:720-59.

Black M, Mitchell JR, Zimmerman HJ, Ishak EGR. Isoniazid-associated hepatitis in 114 patients. *Gastroenterol* 1975; 69:289-302.

Blair IA. Endogenous glutathione adducts. *Curr Drug Metab.* 2006; 7(8): p. 853-72.

Bloomer RJ. Decreased blood antioxidant capacity and increased lipid peroxidation in young cigarette smokers compared to non smokers: impact of dietary intake, *Nutr J* 2007; 6: 39.

Boelsterli UA. Disease-related determinants of susceptibility to drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2003a; 6: 81-91.

Bournival J, Quessy P, Martinoli MG. Protective effects of resveratrol and quercetin against MPP+ -induced oxidative stress act by modulating markers of apoptotic death in dopaminergic neurons. *Cell Mol Neurobiol.* Dec 2009; 29(8):1169-80.

Bradham CA, Stachlewitz RF, Gao W, Qian T et al. Reperfusion after liver transplantation in rats differentially activates the mitogen-activated protein kinases. *Hepatology* 1997; 25:1128–35.

Bradham CA, Stachlewitz RF, Gao W, Qian T, Jayadev S, Jenkins G et al. Reperfusion after liver transplantation in rats differentially activates the mitogen-activated protein kinases. *Hepatology* 1997; 25:1128–35.

Braganhol E, Zamin LL, Canedo AD, Horn F et al. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anticancer Drugs* 2006; 17:663-71.

Brennan RJ, Schiestl RH. Chloroform and carbon tetrachloride induce intrachromosomal recombination and oxidative free radicals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 1998;397:271–278.

Bruchfeld J, Bruchfeld J, Aderaye G, Palme IB et al. Sputum concentration improves diagnosis of tuberculosis in a setting with a high prevalence of HIV. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94:677–680.

Bruck, Aeed H, Shirin H, Matas Z, Zaidel L, Avni Y, Halpern Z. The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure, *J Hepatology* 1999; 31: 27–38.

Bukara M, Bautista AP. Acute alcohol intoxication and gadolinium chloride attenuate endotoxin-induced release of CC chemokines in the rat. *Alcohol* 2000; 20: 193–203.

Campos-Franco JA, Gonzalez-Quintela, Alende-Sixto MR. Isoniazid induced hyperacute liver failure in a young patient receiving carbamazepine. *Eur J Intern Med* 2004; 15:396–397.

Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H et al. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression, *Hepatology* 2003; 38: 1188.

Carini R, Autelli R, Bellomo G, Albano E. Alterations of cell volume regulation in the development of hepatocyte necrosis. *Exp Cell Res* 1999; 248: 280-293.

Carreras MC, Poderoso JJ. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C1569–C1580.

Chalasanani N, Fontana RJ, Bonkovsky HL, Watkins PB et al. Causes, clinical features, and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United States. *Gastroenterol* 2008; 135:1924–34.

Chance B, Sies H, and Boveris A, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979. 59(3): p. 527-605.

Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 2001; 410: 37–40.

Chefson A, Auclair K. Progress towards the easier use of P450 enzymes. *Mol Biosyst* 2006; 2:462–469.

Chen JC, Ho FM, Lee Chao PD, Chen CP, Jeng KCG, Hsu HB, Lee ST, Wu WT, Lin WW. Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of I $\kappa$ B kinase, nuclear factor- $\kappa$ B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *Eur J Pharmacol* 2005; 521, 9–20,.

Chia, Hsu CY, Chen HL. Oxidative damage of workers in secondary metal recovery plants affected by smoking status and joining the smelting work, *Ind Health* 2008; 46: 174–182.

Chieli E, Malvadi G. Role of Cyt P-450 dependent and FAA containing mono oxygenases in the bioactivation of thioacetamide, thiobezamide and their sulfoxides. *Biochem Pharmacol* 1985; 34, 395–396.

Chieli E, Malvaldi G. Role of the microsomal FAD-containing monooxygenase in the liver toxicity of thioacetamide S-oxide. *Toxicol* 1984; 31, 41–52.

Chien CT, Shyue SK, Lai MK: Bcl-xL augmentation potentially reduces ischemia/reperfusion induced proximal and distal tubular apoptosis and autophagy. *Transplantation* 2007; 84:1183.

Chilakapati J, Korrapati MC, Hill RA. Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide. *Toxicol* 2007; 230 105–116

Chilakapati J, Shankar K, Korrapati Mc. Saturation Toxicokinetics Of Thioacetamide: Role In Initiation Of Liver Injury. *Drug Metab Dispos* 2005; 33 (12).

Childs JFL. Controlling orange decay. *Indian J Chem* 1946; 38, 82.

Chitturi S, George J. Hepatotoxicity of commonly used drugs: nonsteroidal anti-inflammatory drugs, antihypertensives, antidiabetic agents, anticonvulsants, lipid-lowering agents, psychotropic drugs. *Semin Liver Dis* 2002; 22: 169-183.

Choi YJ, Kang JS, Park JH, Lee YJ, Choi JS, Kang YH. Polyphenolic flavonoids differ in their antiapoptotic efficacy in hydrogen peroxide-treated human vascular endothelial cells. *J Nutr* 2003; 133(4):985-91.

Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N et al. Hepatoprotective effect of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl<sub>4</sub>-induced toxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2010.

Comalada M, Ballester I, Bailon E, Sierra S, Xaus J, Galvez J, de Medina FS, Zarzuelo A. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol* 2006; 72, 1010–1021.

Conde de la Rosa L, Moshage H, Nieto N. Hepatocyte oxidant stress and alcoholic liver disease, *Rev Esp Enferm Dig* 2008; 100, pp. 156–163.

Coskum O et al. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects STZ-induced oxidative stress and B-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res* 2005; 51: p. 117-23.

Cotelle AC. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic Biol Med* 1996; 21(91): p. 35-43.

Crawford, Chacko BK, Pruitt HM, Pikhova B, Hogg N, Patel RP. Transduction of NO-bioactivity by the red blood cell in sepsis: novel mechanisms of vasodilation during acute inflammatory disease, *Blood* 2004; 104: 1375–1382.

Curek GD, Cort A, Yucel G. Effect of astaxanthin on hepatocellular injury following ischemia/reperfusion. *Toxicol* 2010; 267: 147-153.

Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26: 343–356.

Czaja MJ, Li H, Wang Y. Oxidant-induced hepatocyte injury from menadione is regulated by ERK and AP-1 signaling. *Hepatology* 2003; 37:1405–1413

De Abajo FJ, Montero D, Madurga M, Garcia Rodriguez LA. Acute and clinically relevant drug-induced liver injury: a population based case-control study. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 58:71–80.

DeLeve LD. Hepatic microvasculature in liver injury. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 390–400.

Delhalle S, Duvoix A, Schnekenburger M, Morceau F, Dicato M, Diederich M. An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. *Ann NY Acad Sci* 2003; 1010:1–8.

Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione, *Am. J. Physiol.* 1989; 257: L163–L173.

Deng YR, Ding L, Wu SX, Wang HQ. Studies on chemical constituents in herb of *Lamium maculatum* var. *kansuense* (II). *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2005;30:272–4.

Dias AS Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, González-Gallego J. Quercetin Decreases oxidative stress, NF- $\kappa$ B activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr* 2005; 135(10): p. 2299-304.

Diesen DL, Kuo PC. Nitric oxide and redox regulation in the liver: Part I. General considerations and redox biology in hepatitis. *J Surg Res* 2010; 162(1):95-109.

Dietrich M, Block G, Norkus EP, Hudes M et al. Smoking and exposure to environmental tobacco smoke decrease some plasma antioxidants and increase gamma-tocopherol in vivo after adjustment for dietary antioxidant intakes, *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 160–166.

Dorland's, *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*. 25.ed. Filadéfia: W. B. Saunders, 1974

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82(1): p. 47-95.

Drotman RB, Lawhorn GT. Serum enzymes are indicators of chemical induced liver damage. *Drug Chem Toxicol* 1978; 1, 163–171.

Dryden GW, Song M, McClain C. Polyphenols and gastrointestinal diseases. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22, 165-70.

Duran, Cadenas E. The role of singlet oxygen and triplet carbonyls in biological systems, *Rev Chem Intern* 1987;8: 147–187.

Duthie SJ, Dobson VL. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur J Nutr* 1999; 38: 28-34.

Dyroff MC, Neal RA. Identification of the major protein adduct formed in rat liver after thioacetamide administration. *Cancer Res* 1981; 41, 3430\_/3435.

Egger SS, Rätz Bravo AE, Hess L, Schlienger RG, Krähenbühl S. Age-related differences in the prevalence of potential drug-drug interactions in ambulatory dyslipidaemic patients treated with statins. *Drugs Aging* 2007; 24: 429-440.

Essani N, McGuire G, Manning A. Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B in hepatocytes, Kupffer cells and endothelial cells in vivo. *J Immunol* 1996; 156: p. 2956-63.

Farber E. Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. *Mod Pathol* 1994; 7: 605-609

Farrell GC. Drug-induced liver disease. Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone, 1994.

Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2008;152(3):415-22.

Fiorucci S, Mencarelli A, Palazzetti B et al. An NO derivative of ursodeoxycholic acid protects against Fas-mediated liver injury by inhibiting caspase activity, *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98, p. 2652.

Fitzhugh OG, Nelson AA. Liver tumours in rats fed thiourea or thioacetamide. *Science* 1948; 108, 626–628.

Flora Filho R, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev Ass Med Brasil* 2000; 46(3):265-71.

Forman HJ, Fukuto JM, Torres M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 287(2): p. C246-56.

Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 1995; 33:1061-80.

Frodovich I. oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol*. 1998; 201: 1203-09

Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: an organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 2008; 47: 729–736.

García-Lastra R, San-Miguel B, Crespo I, Jorquera F, Alvarez M, González-Gallego J, Tuñón MJ. Signaling pathways involved in liver injury and regeneration in rabbit hemorrhagic disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure. *Vet Res* 2010; 41(1):2.

Gardner AM, Johnson GJ. Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor  $\alpha$ -mediated apoptosis requires Ras and the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1996; 271:14560–14566.

Gardner CR, Heck DE, Yang CS et al. Role of nitric oxide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *Hepatology* 1998; 27:748–754.

Gardner CR, Heck DE, Yang CS, Thomas PE et al. Role of nitric oxide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *Hepatology* 1998; 27, 748–754.

Gardner CR, Laskin JD, Dambach DM, Sacco M et al. Reduced hepatotoxicity of acetaminophen in mice lacking inducible nitric oxide synthase: potential role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 184, 27–36.

Goel A, Dani V, Dhawan DK. Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. *Chem Biol Interact* 2005; 20,156(2-3):131-40.

Goeptar AR, Scheerens H, Vermeulen NPE. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol* 1995; 25(1): 25-65.

Goillot E, Raingeaud J, Ranger A, Tepper RI, Davis RJ, Har-low E, Sanchez I: Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3302–3307.

Goldfarb S. Sex hormones and hepatic neoplasia. *Cancer Res.* 1976; 36:2584-2588.

Gómez-Lechón MJ, Castell JV, Donato MT. Hepatocytes--the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: in vitro variability as a reflection of in vivo. *Chem Biol Interact.* 2007; 20:168(1):30-50.

Gordon MH. Dietary antioxidants in disease prevention. *Natural Products Report* 1996; 4: 265-72.

Gottlieb RA. Cytochrome P450: major player in reperfusion injury, *Arch Biochem Biophys* 2003; 420: 262–267.

Grad JM, Zeng XR, Boise LH. Regulation of BclxL: a little bit of this and a little bit of STAT. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 543–549.

Graham SE, Peterson JA. How similar are P450s and what can their differences teach us, *Arch Biochem Biophys* 1999; 369: pp. 24–29.

Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol* 1999; 301:49–61

Grattagliano I, Bonfrate L, Diogo CV, Wang HH et al. Biochemical mechanisms in drug-induced liver injury: certainties and doubts. *World J Gastroenterol* 2009; 15(39):4865-76.

Gross ER, Nithipatikom K, Hsu AK, Peart JN, et al. Cytochrome P450 omega-hydroxylase inhibition reduces infarct size during reperfusion via the sarcolemmal KATP channel, *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37: 1245–1249.

Guengerich FP. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J* 2006; 8:E101–E111.

Guengerich FP. Cytochromes P450, drugs, and diseases, *Mol Interv* 2003; 3:194–204.

Gunawan BK, Kaplowitz N. Mechanisms of drug-induced liver disease, *Clin Liver Dis* 2007; 11: 459–475.

Guyton AC, Hall JE. General principles of gastrointestinal function – motility, nervous control and blood circulation. *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia, WB. Saunders Company 1996; 793-813.

Haenen GRMM, Bast A. Nitric oxide radical scavenging of flavonoids. *Methods Enzymol* 1999; 301, 490–503.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4.ed. Biosciences, Oxford. New York: Oxford University Press, 2007.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3.ed. Oxford University Press, 1999.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4.ed. New York: Oxford University Press, 2007.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Nutrition and Disease: The Basics*. Oxford Univ Pr, 2009.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 186: 1-85.

Halliwell B, Gutteridge JMC. The chemistry of free radicals and related reactive species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3.ed. Oxford: Oxford Science Publications; 1999. p. 36–104.

Halpern B; Pacaud A. Technique de pelevement dechantillons de sang chez les petits animaux de laboratoire par ponction Du plexus ophthalmique. *Comptes Rendus Des Seances del la societe de biologie et de ses filiales [S.I.]*, 1951 v 145, n 19-2, p1465-1566.

Harbrecht BG, Billiar TR, Stadler J, Demetris AJ, Ochoa JB, Curran RD, and Simmons RL. Nitric oxide synthesis serves to reduce hepatic damage during acute murine endotoxemia. *Crit Care Med* 1992; 20:1568–1574.

Hedda M, Susanne F. Transcriptional analysis of the que D gene coding for quercetinase of *Streptomyces* sp., FLA. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 287:100-7.

Heijnen CG, Haenen GRMM, Oostveen RM, Stalpers EM, Bast A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Radic Res* 2002; 36, 575–581.

Heijnen CG, Haenen GRMM, van Acker FA, van der Vijgh WJ, Bast A. Flavonoids as peroxy nitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol In Vitro* 2001; 15, 3–6.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002; 13:572-84.

Hennig B, Ettinger AS, Jandacek RJ, Koo S, et al. Using nutrition for intervention and prevention against environmental chemical toxicity and associated diseases, *Environ Health Perspect* 2007; 115: 493–495.

Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004; 6(6): p. 265-78.

Hollman PCH, Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother* 1997; 51:305-10.

Hosokawa N, Hirayoshi K, Nakai A, Hosokawa Y, Marui N, Yoshida M, Sakai T, Nishino H, Aoike A, Kawai K et al. Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins. *Cell StructFunct* 1990; 15(6):393–401.

Hu X, Moscinski LC, Valkov NI, Fisher AB, Hill BJ, Zuckerman KS. Prolonged activation of the mitogen-activated protein kinase pathway is required for macrophage-like differentiation of a human myeloid leukemic cell line. *Cell Growth Differ* 2000; 11: 191–200.

Hug H, Strand S, Grambihler A et al. Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells, *J Biol Chem* 1997; 272: 28191.

Hung CC, Ichimura T, Stevens JL, Bonventre JV. Protection of renal epithelial cells against oxidative injury by endoplasmic reticulum stress preconditioning is mediated by ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 2003; 278:29317–29326.

Hung HC, Joshipura KJ, Jiang R, Hu FB et al. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease, *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1577–1584.

Hunter AL, Holscher MA, Neal RA. Thioacetamide-induced hepatic necrosis. Involvement of the mixed-function oxidase enzyme system. *J Pharmacol Exp Ther* 1977; 200, 439–448.

Hwang TL, Yang JT, Lau YT. Arginine-nitric oxide pathway in plasma membrane of rat hepatocytes during early and late sepsis. *Crit Care Med* 1999; 27:137–141.

Ide M, Yamate J, Machida Y et al. Emergence of Different Macrophage Populations in Hepatic Fibrosis Following Thioacetamide-induced Acute Hepatocyte Injury in Rats. *J Comp Path* 2003; 128, 41-51.

Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: The past, present and future. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25:193–200.

Ishikawa Y, Kitamura M. Anti-apoptotic effect of quercetin: intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways. *Kidney Int* 2000; 58(3):1078–87.

Isobe, Katsuramaki T, Kimura H, Nagayama M, Matsuno T, Yagihashi A, Hirata K. Role of inducible nitric oxide synthase on hepatic ischemia and reperfusion injury, *Transplant Proc* 2000; 32: 1650–1652.

Jaeschke H, Bajt ML. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci* 2006; 89:31-41.

Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury, *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 718.

Jones DP. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. *Chem Biol Interact* 2006; 163(1-2): p. 38-53.

Kahl R, Hildebrandt AG. Methodology for studying antioxidant activity and mechanisms of action of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 1986; 24:1007-14.

Kang JS, Morimura K, Salim EI et al. Persistence of liver cirrhosis in association with proliferation of nonparenchymal cells and altered location of alpha-smooth muscle actin-positive cells, *Toxicol Pathol* 2005; 33: 329–335.

Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K. Role of P4502E1 in thioacetamide-induced mouse hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;228: 295–300.

Kaplowitz N. Acetaminophen hepatotoxicity: what do we know, what don't we know, and what do we do next? *Hepatology* 2004; 40, pp. 23–26.

Kaplowitz N. Drug-induced liver disorders: implications for drug development and regulation. *Drug Saf* 2001; 24: 483–490.

Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4 (6): 489–499.

Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology* 1998; 27, 1265–1274.

Kawamoto T, Sueyoshi T, Zelko I, Moore R et al. Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the P4502B gene. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6318-6322.

Kenright S, Levi AJ. Sites of competition in the selective uptake of rifamycin-SV, flavaspidic acid, bilirubin and bromoshulphalein. *Gut* 1974; 15:220-226.

Khan M, Mohan IK, Kutala VK, Kumbala D, Kuppusamy P. Cardioprotection by sulfaphenazole, a cytochrome P450 inhibitor: mitigation of ischemiareperfusion injury by scavenging of reactive oxygen species, *J Pharm Exp Ther* 2007; 323: 813–821.

Kim JY, Mukherjee S, Ngo L, Christiani DC. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to fine particulates, *Environ. Health Perspect* 2004; 112: 666–671.

Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res* 1999; 84: 253–256.

Kishioka T, Iida C, Fujii K, Nagae R, Onishi Y, Ichi I, Kojo S. Effect of dimethyl sulphoxide on oxidative stress, activation of mitogen activated protein kinase and necrosis caused by thioacetamide in the rat liver. *Eur J Pharmacol* 2007; 14;564(1-3):190-5.

Kitamura Y, Washino Y, Koga E, Ito A, Kawagoe M, Nakazaki C, Kiso K, Ichi I, Matsura T, Kojo S. Oxidative stress in the ischemic and non-ischemic parts of the rat liver after two-thirds ischemia/reperfusion. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74(5):979-83.

Kobayashi M, Takeyoshi I, Yoshinari D, Matsumoto K, Morishita Y. The role of mitogen-activated protein kinases and the participation of intestinal congestion in total hepatic ischemia–reperfusion injury. *Hepatogastroenterol* 2006;53:243–8.

Kuhlmann MK, Burkhardt G, Horsch E, Wagner M, Kohler H. Inhibition of oxidant-induced lipid peroxidation in cultured renal tubular epithelial cells (LLC-PK1) by quercetin. *Free Radic Res* 1998; 29:451–460.

Kukreja RC, Salloum F, Das A, Ockaili R, Yin C, Bremer YA, Fisher PW, Wittkamp M, Hawkins J, Chou E, Kukreja AK, Wang X, Marwaha VR, Xi L. Pharmacological preconditioning with sildenafil: basic mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol* 2005; 42: 219–232.

Kumar V, Aster J, Fausto N and Abbas AK. *Robbins And Cotran Pathologic Basis Of Disease*. Elsevier, ed.9, 2009.

Kuntic V, Blagojevic S, Malesev D, Radovic Z, Bogavac M. Spectrophotometric Investigation of the Pd(II)-Quercetin Complex in 50% Ethanol *Chem* 1998; 129:41-8.

Kyle ME, Miccadei S, Nakae D, Farber JL. Superóxido dismutase e catalase proteger culturas de hepatócitos da citotoxicidade de paracetamol. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 149: 889-896.

Larrey D. Mecanismos de protection vis-à-vis de l'hepatotoxicité dès médicaments. *Gastroenterol Clin Biol* 1989; 3:572-6.

Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology* 2005; 42: 1364–1372.

Larson RA. The antioxidants of higher plants. *Phytochem* 1988; 27(4): p. 969-78.

Laskin DL, Gardner CR, Price VF, Jollow D.J. Modulation of macrophage functioning abrogates the acute hepatotoxicity of acetaminophen. *Hepatology* 1995; 21, 1045–1050.

Laskin DL, Heck DE, Gardner CR et al. Distinct patterns of nitric oxide production in hepatic macrophages and endothelial cells following acute exposure of rats to endotoxin, *J Leukoc Biol* 1994b; 56, p. 751.

Laskin DL, Rodriguez del Valle M, Heck De et al. Hepatic nitric oxide production following acute endotoxemia in rats is mediated by increased inducible nitric oxide synthase gene expression, *Hepatology* 1995; 22, p. 223.

Laskin JD, Heck DE, Gardner CR and Laskin DL, 2001. Prooxidant and Antioxidant Functions of Nitric Oxide in Liver Toxicity. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3(2); 261–271.

Laskin JD, Heck DE, Laskin DL. Multifunctional role of nitric oxide in inflammation. *Trends Endocrinol Metab* 1994a; 5: 377–382.

Lasser KE, Allen PD, Woolhandler SJ, Himmelstein DU, Wolfe SM, Bor DH. Timing of new black box warnings and withdrawals for prescription medications. *JAMA* 2002; 287: 2215–20.

Lauterburg BH, Adams JD, Mitchell JR. Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover, *Hepatology* 1984; 4: 586–590.

Lee MK, Jeon HY, Lee KY et al. Inhibitory constituents of *Euscaphis japonica* on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV2 microglia. *Planta Med* 2007; 73: 782–786.

Lee WM, Senior JR. Recognizing drug-induced liver injury: current problems, possible solutions, *Toxicol Pathol* 2005; 33: 155–164.

Lee WM. Acute liver failure in the United States. *Semin. Liver Dis* 2003a; 23(3), 217–226.

Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity, *N Engl J Med* 2003b; 349:474–485.

Lewis JH. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Pathology and clinical presentation of hepatotoxicity. In: Kaplowitz N, Deleve LD, eds. *Drug-induced Liver Dis*. New York: Marcel Dekker Inc 2003; 377-404.

Li X, Benjamin IS, Alexander B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality, *J Hepatol* 2002; 36, pp. 488–493.

Limaye PB, Apte UM, Shankar K, Bucci TJ, et al. Calpain released from dying hepatocytes mediates progression of acute liver injury induced by model hepatotoxicants. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 191, 211–226.

Limon-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicol Environ Mutag* 2009; 674(1-2): 137-147.

Liu RH, Jacob JR, Tennant BC, Hotchkiss JH. Nitrite and nitrosamine synthesis by hepatocytes isolated from normal woodchucks (*Marmota monax*) and woodchucks chronically infected with woodchuck hepatitis virus. *Cancer Res* 1992; 1:52(15):4139-43.

Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med* 2003, 34:1-10.

Lowenstein C, Allen G, Walker A, Rose N, Snyder S, Herskowitz A. Nitric oxide inhibits viral replication in myocarditis. *Circulation* 1993, 88: IG-IH (Abstr).

Ludwig J. Drug effects on the liver. A tabular compilation of drugs and drug-related hepatic diseases. *Dig Dis Sci* 1975; 4: 785-0.

Lukaszewicz-Hussain A, Moniuszko-Jakoniuk J. Liver Catalase, Glutathione Peroxidase and Reductase Activity, Reduced Glutathione and Hydrogen Peroxide Levels in Acute Intoxication with Chlorfenvinphos, an Organophosphate Insecticide. *Pol J Environ Studies* 2004; 13(3): 303-309.

Lullmann H, Lullmann-Rauch R. Drug induced lipidosis. In: Bundgaard H, Juul P, Kofod H, editors. *Drug Des Adv React Copenhagen*: Munksgaard 1977; 29-34.

Lundberg JO, Weitzberg E. NO generation from inorganic nitrate and nitrite: Role in physiology, nutrition and therapeutics. *Arch Pharm Res* 2009; 32(8):1119-26.

Lyons CR. The role of nitric oxide in inflammation. *Adv Immunol* 1995; 60: 323–371.

Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987; 1:441-5.

Maciá MA, Carvajal A, del Pozo JG, Vera E, del Pino A. Hepatotoxicity associated with nimesulide: data from the Spanish Pharmacovigilance System. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72: 596-597

Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006; 43: S31-S44

Malhi H, Guicciardi MU, Gores GJ. Hepatocyte Death: A Clear and Present Danger. *Physiol Rev* 2010; 90: 1165–1194.

Mangipudy RS, Chanda S, Mehendale HM. Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity. *Environ. Health Perspect* 1995; 103, 260–267.

Mariani C. Flavonoid characterization and in vitro antioxidant activity of *Aconitum anthora* L. (Ranunculaceae). *Phytochem* 2008; 69:1220-6.

Martinez M, Mourelle M, Muriel P. Protective effect of colchicine on acute liver damage induced by CCl<sub>4</sub>. Role of cytochrome P-450. *J Appl Toxicol* 1995;15:49–52.

Martínez-Flórez S, Gutiérrez-Fernández B, Sánchez-Campos S, González-Gallego J, Tuñón MJ. Quercetin attenuates nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide production in interleukin-1beta-activated rat hepatocytes. *J Nutr* 2005 Jun; 135(6):1359-65.

Martin-Murphy BV, Holt MP, Ju C. The role of damage associated molecular pattern molecules in acetaminophen-induced liver injury in mice. *Toxicol Lett* 2010; 15;192(3):387-94.

Mason RP, Walter MF, Mason PE. Effect of oxidative stress on membrane structure: small angle X-ray diffraction analysis. *Free Radic Biol Med* 1997; 23, 419–425.

Mateos R, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde by liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative. A marker for oxidative stress in cell cultures of human hepatoma HepG2. *J Chromatogr B* 2004; 805: 33-39.

Mattos AA, Dantas-Corrêa EB. *Tratado de hepatologia*. Rio de Janeiro: Rubio, 2010.

Mehendale HM, Klingensmith JS. In vivo metabolism of CCl<sub>4</sub> by rats pretreated with chlordecone, mirex, or phenobarbital. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988; 93: 247–256.

Mehendale HM, Limaye PB. Calpain: a death protein that mediates progression of liver injury. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26, 232–236.

Mehmetçik G, Özdemirler G, Koçak-Toker N et al. Role of carnosine in preventing thioacetamide-induced liver injury in the rat. *Peptides* 2008; 29: 425-429.

Meini A, Garcia JB, Pessina GP, Aldinucci C et al. Role of intracellular Ca<sup>2+</sup> and calmodulin/MAP kinase kinase/extracellular signal-regulated protein kinase signalling pathway in the mitogenic and antimitogenic effect of nitric oxide in glia- and neurone-derived cell lines. *Eur J Neurosci* 2006; 23: 1690–1700.

Meirelles de Souza AF, Oliveira e Silva A, Baldi J, Souza TNPA, Rizzo PMM. Alterações funcionais hepáticas induzidas pelo uso concomitante de isoniazida, pirazinamida e rifampicina no tratamento da tuberculose pulmonar. *Arq Gastroenterol* 1996; 33:194-98.

Mi Jeong S, Davaatseren M, Kim W et al. Vitisin A suppresses LPS- induced NO production by inhibiting ERK, p38, and NF-κB activation in RAW 264.7 cells. *Int Immunopharmacol* 2009; 9: 319–23.

Mitchell JR, Potrer WZ, Hinson JA, Snodgrass WR, et al. Toxic drug reactions. In: Gillette JR, Mitchell JR, editors. *Concepts Biochem Pharmacol*. New York: Springer-Verlag. 1975; 383-419.

Mitchell JR, Thorgierson SS, Potter WR, Jollow DJ, Keiser H. Acetaminophen induced hepatic injury: Protective role of glutathione in man and rationale for therapy. *Clin Pharmac Ther* 1974;16:676-684.

Moshage H. Simple and Reliable Measurement of Nitric Oxide Metabolites in Plasma. *Clin Chem* 2009; 55:1881-1882.

Muller A, Machnik F, Zimmermann T, Schubert H. Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats-usefulness and reliability of this animal model, *Exp Pathol* 1988; 34: 229–236.

National Toxicology Program. Report on Carcinogens. 9.ed. Department of Health and Human Service, 2000.

Neal RA, Halpert J. Toxicology of thionosulfer compounds. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1982.

Negre-Salvagyre A, Salvagyre R. Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized lowdensity lipoproteins by macrophages. *Free Radic Biol Med* 1992; 12:101-6.

Nelson SD. Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen, *Semin Liver Dis* 1990; 10: 267–278.

Neuberger JM, Davis M, Williams R. Clinical aspects of oral contraceptive associated liver tumours. In: Davis M, Tredger JM, Williams R. *Drug Reactions and the Liver*. London: Pitman Medical. 1981; 271-283.

Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DE, Boelens PG, Van Norren K and Van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 2001; 74, 418-25.

Novo E, Parola M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis, *Fibrogenesis Tissue Repair* 2008; 1, p. 5.

Oinonen T and Lindros KO. Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation. *Biochem J* 1998; 329: 17-35.

Oktyabrsky ON, Smirnova GV. Redox regulation of cellular functions. *Biochem (Mosc)*. 2007; 72(2): 132-45.

Okuyama H, Nakamura H, Shimahara Y, Araya S, Kawada N, Yamaoka Y, Yodoi J. Overexpression of thioredoxin prevents acute hepatitis caused by thioacetamide or lipopolysaccharide in mice. *Hepatology* 2003; 37:1015-1025.

Omura T, Sato R. Biotransformation of Xenobiotics. *Sasarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons*. C.D.Klaasen. New York: McGrawHill 1964; 113-186.

Ong CS, Tran E, Nguyen TT, Ong CK et al. Quercetin-induced growth inhibition and cell death in nasopharyngeal carcinoma cells are associated with increase in bad and hypophosphorylated retinoblastoma expressions. *Oncol Rep* 2004; 11:727-33.

Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt FV et al. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Annu Intern Med* 2002; 137(12): 947-954.

Ozkaya Y et al. The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats. *Diabetes Metab* 2002; 28: 344-84.

Paolini M, Perocco P, Canistro D, Valgimigli L, et al. Induction of cytochrome P450, generation of oxidative stress and in vitro cell-transforming and DNA-damaging activities by glucoraphanin, the bioprecursor of the chemopreventive agent sulforaphane found in broccoli, *Carcinogenesis* 2004; 25: 61–67.

Parcker L, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid - the metabolic antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 625-6.

Park K, Williams DP, Naisbitt DJ, Kitteringham NR, Pirmohamed M. Investigation of toxic metabolites during drug development, *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 207: pp. 425–434.

Pavanato A, Tuñón MJ, Sánchez-Campos S et al. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2003 Apr; 48(4):824-9.

Pawa S, Ali S. Boron ameliorates fulminant hepatic failure by counteracting the changes associated with the oxidative stress. *Chem-Biol Interact* 2006; 160: 89–98.

Pereira-Filho G, Ferreira C, Schwengber A, Marroni C, Zettler C, Marroni N. Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats. *Arq Gastroenterol* 2008; 45(2):156-62.

Pessayre D, Larrey D. Acute and chronic drug-induced hepatitis. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1998; 2: 385-422.

Pessayre D. Mécanismes des hépatites médicamenteuses. Une conséquence de la superposition de deux systèmes xénophobes. *Gastroenterol Clin Biol* 1995; 19:B47–B56.

Pilz, Meineke JI, Gleiter CH. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr* 2000; 742(2): 315-25.

Pirmohamed M, James S, Meakin S, Green C, et al. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ* 2004; 329:15–19.

Plumb GW, Price KR, Williamson G. Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea. *Redox Rep* 1999; 4: 13-6.

Polovka M, Brezova V, Stasko A. Antioxidant properties of tea investigated by EPR spectroscopy. *Biophys Chem* 2003; 106:39-56.

Porter WR, Gudzinowicz MJ, Neal RA. Thioacetamide-induced hepatic necrosis: II. Pharmacokinetics of thioacetamide and thioacetamide-S-oxide in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1979; 208: 386–391.

Prakasam A, Sethupathy S, Lalitha S. Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. *Clin Chim Acta* 2001; 310:107–12.

Rahman TM, Hodgson HJF. The effects of early and late administration of inhibitors of inducible nitric oxide synthase in a thioacetamide-induced model of acute hepatic failure in the rat. *J Hepatol* 2003; 38: 583–590.

Ramaiah SK, Apte U, Ehendale HM. Cytochrome P450E1 induction increases thioacetamide liver injury in diet-restricted rats. *Drug Metab Dispos* 2001; 29:1088–1095.

Rao PS, Mangipudy RS, Mehendale HM. Tissue injury and repair as parallel and opposing responses to CCl<sub>4</sub> hepatotoxicity: a novel dose–response. *Toxicol* 1997; 118: 181–193.

Rees K, Rowland G, Varcoe J. The Metabolism Of Tritiated Thioacetamide In The Rat. *Int J Cancer* 1966; 14: 625–628.

Reiners JJ Jr, Lee J, Clift RE, Dudley DT, Myrand SP. PD98059 is an equipotent antagonist of the aryl hydrocarbon receptor and inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Pharmacol* 1998; 53:438–445.

Repetto M, Llesuy S. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res*, 2002; 35(5): 523-34.

Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* 2001; 8:797-807.

Rice-Evans CA, Miller NJ and Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 1996; 20: 933–956.

Rodríguez-Antona C, Donato MT, Boobis A, Edwards RJ, et al. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica* 2002; 32, pp. 505–520.

Roehrs R et al. Alvos redox-sensíveis nas cascatas de sinalização. In: *Radicais Livres e a resposta celular ao estresse oxidativo*. Canoas: ULBRA, 2004.

Rosa DP, Bona S, Simonetto D, Zettler C, Marroni CA, Marroni NP. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. *Arq Gastroenterol* 2010 Mar; 47(1):72-8.

Rossner Jr. P, Svecovaa V, Milcovaa A, Lnenickovaa Z et al. Seasonal variability of oxidative stress markers in city bus drivers. Part II. Oxidative damage to lipids and proteins. *Mutat Res* 2008; 642: 21–27.

Rumack BH. Acetaminophen misconceptions. *Hepatology* 2004; 40: 10–15.

Russmann S, Kullak-Ublick GA and Grattagliano I. Current Concepts of Mechanisms in Drug-Induced Hepatotoxicity. *Curr Med Chem* 2009, 16: 3041-3053 3041.

Sanz N, Diez-Fernandez C, Fernandez-Simon L, Alvarez A, Cascales M. Relationship between antioxidant systems, intracellular thiols and DNA ploidy in liver of rats during experimental cirrhogenesis. *Carcinogenesis* 1995; 16: 1585–1593.

Sasaki M, Nakamura H, Tsuchiya S et al. Quercetin-induced PC12 cell death accompanied by caspase-mediated DNA fragmentation. *Biol Pharm Bull* 2007; 30:682–6.

Sathyaikumar KV, Swapna I, Reddy PV et al. Fulminant Hepatic Failure in Rats Induces Oxidative Stress Differentially in Cerebral Cortex, Cerebellum and Pons Medulla. *Neurochem Res* 2007;32:517–524.

Sawant SP, Dnyanmote AV, Mitra MS, Chilakapati J et al. Protective effect of type 2 diabetes on acetaminophen-induced hepatotoxicity in male Swiss-Webster mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2006a; 316, 507–519.

Sawant SP, Dnyanmote AV, Warbritton A, Latendresse JR, Mehendale HM, Type 2 diabetic rats are sensitive to thioacetamide hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006b; 211, 221–232.

Schnabl B, Bradham CA, Bennett BL, Manning AM, Stefanovic B, Brenner DA. TAK1/JNK and p38 have opposite effects on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2001;34:953–63.

Schroer K, Kittelmann M, Lütz S. Recombinant Human Cytochrome P450 Monooxygenases for Drug Metabolite Synthesis. *Biotechnol Bioeng* 2010; 106(5).

Schroeter H, Boyd C, Spencer JP, Williams RJ, et al. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol Aging* 2002; 23:861-80.

Schuetz JD, Beach DL, Guzelian PS. Selective expression of cytochrome P450 P4503A mRNAs in embryonic and adult human liver. *Pharmacogen* 1994; 4: 11-20.

Senior JR. What is idiosyncratic hepatotoxicity? What is it not? *Hepatology* 2008; 47: 1813–1815.

Shakera ME, Salema HA, Shihab GE, Ibrahima TM. Nilotinib counteracts thioacetamide-induced hepatic oxidative stress and attenuates liver fibrosis progression. *Fundam Clin Pharmacol* 2010.

Shankar K, Vaidya VS, Apte UM, Manautou JE et al. Type 1 diabetic mice are protected from acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2003; 73: 220–234.

Sherlock S, Dooley J. *Diseases of the Liver and Biliary System*. 11.ed. Londres: Blackwell Scientific Publications, 1996.

Sies H. Glutathione and its role in cellular functions, *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 916–921.

Sirica AE, Nathanson MH, Gores GJ and Larusso NF. Pathobiology of biliary epithelia and cholangiocarcinoma: proceedings of the Henry M. and Lillian Stratton Basic Research Single-Topic Conference. *Hepatology* 2008; 48: 2040–2046.

Smith DA, Obach RS. Metabolites in safety testing (MIST): Consideration of mechanisms of toxicity with dose, abundance and duration of treatment. *Chem Res Toxicol* 2009; 22:267– 279.

Snyder SH, Bredt DS. Biological role of nitric oxide. *Science Am* 1992, 266: 68-77.

Soneja A, Drews M, Malinski T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep* 2005; 57: 108-19.

Sonica P, Shakir A. Boron ameliorates fulminant hepatic failure by counteracting the changes associated with the oxidative stress *Chem-Biol Interact* 2006; 160:89–98.

Spolarics Z, WU JX. Role of glutathione and catalase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in LPS-activated hepatic endothelial and Kupffer cells. *Gastroint Liver Physiol* 1997; 273, G1304.

Stadheim TA, Kucera GL. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity is required for TPA-mediated inhibition of drug-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245:266–271.

Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide, *Cell* 1994; 78: 931.

Stickel F, Patsenker E, Schuppan D. Herbal hepatotoxicity. *J Hepatology* 2005; 43:901–10.

Stirnemann G, Kessebohm K, Lauterburg B. Liver injury caused by drugs: an update. *Swiss Med Wkly* 2010;140:w13080.

Stoyanovsky DA, Cederbaum AI. Thiol oxidation and cytochrome P450-dependent metabolism of CCl<sub>4</sub> triggers Ca<sup>2+</sup> release from liver microsomes. *Biochem* 1996;35:15839–15845.

Suttnar J, Cermak J, Dyr E. Solid-phase extraction in malondialdehyde analysis. *Anal Biochem* 1997; 249(1): p. 20-23.

Suttnar J, Másová L, Dyr J. Influence of citrate and EDTA anticoagulants on plasma malondialdehyde concentrations estimated by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 751(1): p. 193-7.

Taye A, El-Moselhy MA, Hassan MK, Ibrahim HM, Mohammed AF. Hepatoprotective effect of pentoxifylline against D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Ann Hepatol* 2009 Oct-Dec;8(4):364-70.

Temple RJ, Himmel MH. Safety of newly approved drugs: implications for prescribing. *JAMA* 2002;287:2273–5.

Therond P et al. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000; 3: p. 373-84.

Tieppo J, Cuevas MJ, Vercelino R, Tuñón MJ, et al. Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats. *J Nutr* 2009;139(7):1339-46.

Tieppo J, Vercelino R, Dias AS et al. Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food Chem Toxicol* 2007 Jul;45(7):1140-6.

Toledo-Pereyra LH, Toledo AH, Walsh J, Lopez-Neblina F, 2004. Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion. *Exp Clin Transplant* 2004;2:174–7.

Tommasini I, Cerioni L, Guidarelli A, Cantoni O (2005) ERK1/2- dependent regulation of U937 cell survival after exposure to peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Comm* 329:1282–1287

Uetrecht J. Idiosyncratic drug reactions: current understanding. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 513–539.

Uetrecht J. Idiosyncratic drug reactions: past, present, and future. *Chem Res Toxicol* 2008; 21: 84–92.

Uhlmann D, Uhlmann S, Spiegel HU. Endothelin/nitric oxide balance influences hepatic ischemia–reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36:S212–S214.

Vercelino R, Crespo I, de Souza GF et al. S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in cirrhotic rats. *J Mol Med* 2010 Apr; 88(4):401-11.

Vercelino R, Tieppo J, Dias AS, et al., N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008 Apr; 102(4):370-6.

Verma AK, Pratap R. The biological potential of flavones. *Nat Prod Rep* 2010; 27, 1571–1593.

Walgren JL, Mitchell MD, Thompson DC. Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 2005;35: 325–361.

Wang CH, Jawan B, Lee TH, Hung KS, Chou WY, Lu CN, Liu JK, Chen YJ. Single injection of naked plasmid encoding alphas-melanocyte-stimulating hormone protects against thioacetamide-induced acute liver failure in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 10(322):153-161.

Wang T, Shankar K, Ronis MJ, Mehendale HM. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced P450E1. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294, 473–479

Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ. The cellular response to oxidative stress: Influences of mitogen-activated pro-tein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* 333:291–300, 1998.

Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 2003; 33: 105-136.

Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story, *Gen Biol* 2001; 1: 1–8.

Williams DP, Kitteringham NR, Naisbitt DJ, Pirmohamed M et al. Are chemically reactive metabolites responsible for adverse reactions to drugs? *Curr Drug Metab* 2002; 3: 351–366.

Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? *Radic Biol Med* 2004; 36: 838–49.

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995; 270:1326–1331

Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996;88: 386-401

Yilmaz H et al. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *Biochem Mol Toxicol* 2004; 18: p. 234-8.

Yoshioka N, Nakashima H, Hosoda K, Eitaki Y, et al. Urinary excretion of an oxidative stress marker, 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua), among nickel-cadmium batteryworkers. *J Occup Health* 2008; 50: 229–235.

Zimmerman HJ, Madrey WC. Acetaminophen (Paracetamol) hepatotoxicity with regular intake of alcohol: analysis of instances of therapeutic misadventure. *Hepatology* 1995; 22:767-73.

Zimmerman HJ. *Hepatotoxicity*. Appleton-century-crofts, New York. 1978: 232–487.

Zimmerman HJ. *Hepatotoxicity. The Adverse Effects of Drugs and other Chemicals on the Liver*. 2.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1999.

Zimmerman, HJ. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver Dis* 1998; 2: 523-41.

## ANEXOS

Artigo submetido à publicação na revista Toxicologic Pathology, sob o título "Role of quercetin in preventing thioacetamide-induced liver injury in rats".

ID do manuscrito na revista: ToxPath-10-2079-ORGMAN.R2.

O e-mail mais recente do editor da revista segue abaixo:

*15-Mar-2011*

*Dear Dr. de David:*

*Your manuscript entitled "Role of quercetin in preventing thioacetamide-induced liver injury in rats" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Toxicologic Pathology. The review process will take up to 6 weeks at which time we will communicate the results to you.*

*If this is a revision, a decision should be made within 4 weeks.*

*Your manuscript ID is ToxPath-10-2079-ORGMAN.R2.*

*Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/toxpath> and edit your user information as appropriate.*

*You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/toxpath> .*

*Thank you for submitting your manuscript to Toxicologic Pathology.*

*Sincerely,*

*Toxicologic Pathology Editorial Office*

*John Foster, Editor-in-Chief*

*Stephanie Dickinson, Managing Editor*