

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

**EFEITOS DA QUERCETINA NO PULMÃO DE RATOS
COM LIGADURA DE DUCTO BILIAR COMUM – UM
MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME
HEPATOPULMONAR**

Juliana Tieppo

Porto Alegre – RS, 2006.

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

**EFEITOS DA QUERCETINA NO PULMÃO DE RATOS COM
LIGADURA DE DUCTO BILIAR COMUM – UM MODELO
EXPERIMENTAL DE SÍNDROME HEPATOPULMONAR**

Juliana Tieppo

Orientadora: Prof. Dra. Norma Possa Marroni

*Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul.*

Porto Alegre – RS, 2006.

Ficha Catalográfica

T563e **Tieppo, Juliana**

Efeitos da quercetina no pulmão de ratos com ligadura de ducto biliar comum – um modelo experimental de síndrome hepatopulmonar / Juliana Tieppo; orient. Norma Possa Marroni. Porto Alegre: UFRGS, 2006.

126f.: il. tab. graf.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde - ICBS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Fisiologia.

1. Síndrome hepatopulmonar. 2. Cirrose. 3. Fibrose. 4. Quercetina. 5. Efeito de drogas. I. Marroni, Norma Possa. II. Título.

C.D.D. 615.704

*Aos meus pais, **Maucir** e **Norma**, pelo amor incondicional, pela compreensão e estímulo constantes, pela educação, por todos os abraços e palavras sábias, pelos momentos juntos, por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida, por sempre terem sido um exemplo e minha fonte de inspiração, por serem meus pais que eu amo.*

*A **Maurício**, meu “mano”, meu melhor amigo, meu companheiro sem faltas, pelo carinho, pelas nossas conversas, pelos momentos de estudo ou não, pelo incentivo e pela coragem, pela sua alegria, por ser o melhor irmão do mundo.*

*A **Ivonny**, minha dinda, sem palavras, por estar ao “meu lado” em “todos os momentos” dessa caminhada.*

Agradecimentos

- Em especial, a **Dra. Norma Possa Marroni**, minha orientadora, pela excelente orientação, pelo incentivo constante, pela coragem, pelo apoio, pelo exemplo, pelos ensinamentos, por ser orientadora entre tantos outros papéis na minha vida (professora, mãe, amiga...). Por ser essa pessoa única, ímpar, tão especial, obrigada por poder estar ao seu lado e sob os seus olhos em mais essa caminhada.
- Ao **Dr. Cláudio Augusto Marroni**, por ser colaborador e idealizador deste trabalho, pelo apoio, pelos esclarecimentos, pelas sugestões pertinentes e enriquecedoras, por sempre contribuir para esta pesquisa compartilhando de seus conhecimentos e também pelo exemplo que é.
- Ao **Dr. Alexandre Simões Dias**, meu mestre e agora doutor, que me incentivou e despertou o interesse pela pesquisa, sendo um exemplo como fisioterapeuta, como pesquisador, como amigo e como ser humano. Obrigada por confiar e acreditar em mim, pelos conselhos e por todos os momentos em que serviu de guia para eu continuar com empenho e dedicação mais essa trajetória.
- Ao “doutorando” **Rafael Vercelino**, meu colega e amigo de longa data, obrigada pelo companheirismo, pela amizade e pela ajuda na conclusão de mais esta etapa.

- A **Dra. Jaqueline Picada**, obrigada por enriquecer de forma ímpar o meu trabalho, pelos seus conhecimentos e técnicas, pelo seu empenho e dedicação, pelo nosso primeiro artigo referente a esta pesquisa, pela sua colaboração e pela sua amizade.
- À **Dra. Themis Reverbel da Silveira**, por acreditar e por valorar nosso trabalho, pelo interesse, pelo enriquecimento e pelo apoio constante ao nosso grupo.
- Ao **Dr. Cláudio Galeano Zettler** pela sua colaboração científica.
- Ao **Dr. Sérgio Saldanha Menna Barreto** pelo seu interesse por este trabalho e pela constante disposição em todos os momentos que precisei, colaborando com todo seu conhecimento e sugestões objetivas para o enriquecimento deste estudo.
- Ao **grupo de pesquisa da Universidad de León**, em especial, **Dr. Javier González-Gallego**, pela atenção, disponibilidade e por acreditarem no meu trabalho.
- Aos **meus amigos e colegas do Laboratório de Hepatologia Experimental – Fisiologia** do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela amizade e pela ajuda imparcial, pela dedicação em todos os momentos desse trabalho, no qual cada um certamente teve uma participação especial.
- A todos do **Departamento de Fisiologia da UFRGS**, em especial, Dra. Adriane Belló Klein e as secretárias Alice e Fabiana, obrigada pela atenção, pelo carinho, pelos ensinamentos, por fazerem parte da minha vida e pela oportunidade de participar deste programa de Pós-Graduação.
- A todos do **Centro de Pesquisa Experimental** do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial, Ângela Tavares, Fernanda de Oliveira, Dra. Ursula Matte, secretária Fabiana, Dra. Roselis, Marcos e Eduardo da Unidade de Experimentação Animal e ao GPPG, obrigada pelo carinho, atenção, confiança, respeito, organização e pela recepção do nosso grupo neste centro.

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO	22
1 REFERENCIAL TEÓRICO	27
1.1 Síndrome Hepatopulmonar (SHP)	28
<i>1.1.1 Definição</i>	28
<i>1.1.2 Achados Clínicos</i>	30
<i>1.1.3 Fisiopatologia</i>	31
1.2 Cirrose Biliar Secundária	35
1.3 LDBC e Síndrome Hepatopulmonar Experimental	37
1.4 Estresse Oxidativo e Antioxidantes	40
<i>1.4.1 Radicais Livres e Espécies Ativas de Oxigênio</i>	40
<i>1.4.2 Defesas Antioxidantes</i>	46
<i>1.4.3 Defesas Antioxidantes Enzimáticas</i>	48
<i>1.4.4 Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas</i>	50
<i>1.4.5 Flavonóides</i>	52
<i>1.4.6 Quercetina</i>	53
2 OBJETIVOS DO ESTUDO	56
2.1 Objetivo Geral	57

2.2 Objetivos Específicos.....	57
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
3.1 Delineamento da Pesquisa.....	60
3.2 Animais.....	60
3.3 Grupos Experimentais.....	61
3.4 Procedimentos Experimentais.....	61
<i>3.4.1 Desenvolvimento do Modelo de Síndrome Hepatopulmonar pela Indução de Cirrose Biliar Secundária.....</i>	<i>61</i>
<i>3.4.2 Administração do Veículo e da Quercetina.....</i>	<i>63</i>
3.5 Sacrifício dos Animais e Obtenção das Amostras de Tecido e Sangue.....	63
3.6 Avaliações Bioquímicas.....	65
<i>3.6.1 Preparação do Homogeneizado.....</i>	<i>65</i>
<i>3.6.2 Dosagem de Proteína.....</i>	<i>65</i>
3.7 Determinação do Estresse Oxidativo.....	66
<i>3.7.1 Determinação das Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....</i>	<i>66</i>
<i>3.7.2 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD).....</i>	<i>67</i>
<i>3.7.3 Atividade da Enzima Catalase (CAT).....</i>	<i>67</i>
3.8 Medida de Nitritos e Nitratos.....	68
3.9 Avaliação do Dano ao DNA.....	69
<i>3.9.1 Ensaio Cometa.....</i>	<i>69</i>
<i>3.9.2 Micronúcleos.....</i>	<i>70</i>
3.10 Avaliação Anatomopatológica dos Tecidos.....	71
3.11 Análise Estatística.....	72
4 RESULTADOS.....	73
4.1 Avaliação da Integridade Hepática.....	76
4.2 Gasometria Arterial.....	77
4.3 Relações Hepatossomática, Esplenossomática e Pneumossomática.....	79
4.4 Determinação da Lipoperoxidação nos Tecidos Hepático e Pulmonar.....	81
4.5 Atividade da Enzima Antioxidante Superóxido Dismutase (SOD).....	83
4.6 Atividade da Enzima Antioxidante Catalase (CAT).....	85
4.7 Avaliação da Produção de Óxido Nítrico (NO) através de Nitratos Totais.....	86
4.8 Avaliação do Efeito Genotóxico da Quercetina dos Testes de Micronúcleos e o Ensaio Cometa.....	88

4.9 Avaliação Histopatológica.....	91
5 DISCUSSÃO.....	95
6 CONCLUSÕES.....	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

Lista de Abreviaturas e Símbolos

μm	micrômetro
μmol	micromol
ALT	Alanina-aminotransferase
AST	Aspartato-aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
$^{\circ}\text{C}$	Graus Centígrados
CAT	Catalase
CBS	Cirrose Biliar Secundária
Cu^{2+}	Cobre
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPM	Desvio Padrão da Média
EAO	Espécies Ativas de Oxigênio
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
ENC	Eritrócitos Normocromáticos
EPC	Eritrócitos Policromáticos
EPM	Erro Padrão da Média
ETb	Receptores de endotelina tipo b
ET-1	Endotelina-1
FA	Fosfatase Alcalina
FD	Frequência de Dano
Fe^{2+}	Ferro
GR	Glutationa Redutase
GSH	Glutationa Reduzida
GSSH	Glutationa Oxidada
GPx	Glutationa Peroxidase
ID	Índice de Dano
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Indúzível
LDBC	Ligadura de Ducto Biliar Comum
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
LPO	Lipoperoxidação
mg	Miligrama
min	Minuto
NaCl	Cloreto de Sódio 0,9%
NADPH	Fosfato Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NO	Óxido Nítrico
O_2	Oxigênio

$O_2^{\bullet -}$	Radical Ânion Superóxido
1O_2	Oxigênio Singlet
OCl^-	Ânion Hipoclorito
OH^{\bullet}	Radical Hidroxila
$PaCO_2$	Pressão Parcial de Gás Carbônico Arterial
PaO_2	Pressão Parcial de Oxigênio Arterial
pH	Potencial de Hidrogênio
Q	Quercetina
RL	Radicais Livres
RO^{\bullet}	Radical Alcoxil
ROO^{\bullet}	Radical Peroxil
SatO ₂ /Hb	Saturação de Oxigênio da Hemoglobina
SOD	Superóxido Dismutase
SHP	Síndrome Hepatopulmonar
vs.	Versus

Lista de Tabelas

Tabela 1	Valores médios de enzimas hepáticas: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA).....	76
Tabela 2	Valores médios da pressão parcial de oxigênio (PaO ₂), pressão parcial de dióxido de carbono (PCO ₂), potencial de hidrogênio (pH) e Saturação da Hemoglobina (SaO ₂ /Hb).....	77
Tabela 3	Resultados do Teste de Micronúcleos.....	89
Tabela 4	Resultados do Teste de Ensaio Cometa.....	90

Lista de Figuras

Figura 1	Efeito <i>shunt</i> relacionando a hipoxemia com as dilatações vasculares pulmonares.....	34
Figura 2	Modelo experimental de Ligadura de Ducto Biliar Comum.....	37
Figura 3	Efeito da ET-1 na microvasculatura normal.....	39
Figura 4	Efeito da ET-1 na microvasculatura na SHP.....	39
Figura 5	Papel do Óxido Nítrico no sistema imune e transcrição da iNOS.....	39
Figura 6	Esquema da produção das EAO.....	41
Figura 7	O papel do O ₂ na lesão celular. A isquemia causa lesão por redução dos suprimentos celulares de O ₂ , enquanto outros estímulos, induzem lesões através de espécies ativadas tóxicas de oxigênio.....	42
Figura 8	Esquema da redução do O ₂ em H ₂ O, na respiração mitocondrial e a redução das EAO.....	43
Figura 9	Esquema da interação entre as enzimas antioxidantes.....	49
Figura 10	Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração.....	52
Figura 11	Estrutura química da quercetina.....	53

Figura 12	Preparação do material cirúrgico.....	62
Figura 13	Posicionamento do animal para cirurgia.....	62
Figura 14	Laparotomia ventral e exposição visceral.....	62
Figura 15	Exposição e ligadura do ducto biliar.....	62
Figura 16	Sutura da camada muscular abdominal.....	62
Figura 17	Diferença Alvéolo-Arterial de Oxigênio.....	79
Figura 18	Relação Hepatossomática.....	80
Figura 19	Relação Esplenossomática.....	80
Figura 20	Relação Pneumossomática.....	81
Figura 21	Valores médios de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) no tecido hepático nos diferentes grupos estudados.....	82
Figura 22	Valores médios de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) no tecido pulmonar nos diferentes grupos estudados.....	83
Figura 23	Valores médios da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no tecido hepático nos diferentes grupos estudados.....	84
Figura 24	Valores médios da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no tecido pulmonar nos diferentes grupos estudados.....	85
Figura 25	Valores médios da atividade da enzima catalase (CAT) no tecido hepático nos diferentes grupos estudados.....	86
Figura 26	Valores médios da atividade da enzima catalase (CAT) no tecido pulmonar nos diferentes grupos estudados.....	86
Figura 27	Valores médios de nitratos totais no homogeneizado de fígado dos diferentes grupos estudados.....	87

Figura 28	Valores médios de nitratos totais no homogeneizado de pulmão dos diferentes grupos estudados.....	88
Figura 29	Fotomicrografia de fígado de animais do grupo controle (CO+V).....	92
Figura 30	Fotomicrografia de fígado de animais do grupo cirrótico (CBS+V).....	92
Figura 31	Fotomicrografia de fígado de animais do grupo cirrótico tratado com quercetina (CBS+Q).....	93
Figura 32	Fotomicrografia de pulmão de animais do grupo controle (CO+V).....	93
Figura 33	Fotomicrografia de pulmão de animais do grupo cirrótico (CBS+V).....	94
Figura 34	Fotomicrografia de pulmão de animais do grupo cirrótico tratado com quercetina (CBS+Q).....	94

RESUMO

RESUMO

Introdução: A Síndrome Hepatopulmonar (SHP) é definida pela tríade que compreende a presença de doença hepática, aumento do gradiente alvéolo-capilar no ar ambiente e dilatações vasculares intrapulmonares na ausência de doença pulmonar ou cardíaca coexistente.

Objetivo: Avaliar o efeito antioxidante do flavonóide Quercetina (Q) no tecido pulmonar de ratos com ligadura de ducto biliar comum, como um modelo experimental de SHP.

Matérias e Métodos: Este estudo tem caráter experimental qualitativo e quantitativo, no qual foram utilizados ratos machos Wistar, pesando entre 200 e 300 gramas, divididos em quatro grupos: Controle + Veículo (CO+V), Controle + Quercetina (CO+Q), Cirrose Biliar Secundária + Veículo (CBS+V) e Cirrose Biliar Secundária + Quercetina (CBS+Q). Foram realizadas análises séricas de Aminotransferases (AST e ALT) e Fosfatase Alcalina (FA), gasometria arterial, avaliação da lipoperoxidação (substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico - TBA-RS), quantificação das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT), avaliação de nitratos totais, avaliação do dano ao DNA através dos Testes de Micronúcleos e Ensaio Cometa e teste anatomopatológico dos tecidos hepático e pulmonar. O período do experimento foi de 28 dias. A partir do 14º dia os animais receberam Q na dose de 50mg/Kg ou veículo (NaCl 0,9%) no volume de 1mL/Kg de peso corporal intraperitonealmente. Para análise estatística foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Student-Newman-Keuls, sendo o nível de significância adotado de 5% ($P < 0,05$).

Resultados: Constatou-se aumento significativo ($P < 0,05$) das enzimas AST, ALT e FA e diminuição significativa de valores gasométricos de pressão parcial de oxigênio arterial (PaO_2) e saturação de oxigênio da hemoglobina ($SatO_2/Hb$) nos animais CBS+V em relação aos demais grupos, e melhora nos parâmetros enzimáticos e gasométricos após o tratamento

com Q. Observou-se redução do dano oxidativo através de TBA-RS no pulmão e no fígado. Quanto às enzimas antioxidantes, a Q nos animais cirróticos manteve os valores da SOD, tanto no fígado como no pulmão, semelhantes aos animais controles. A CAT no pulmão manteve-se inalterada e, no fígado, após o uso de Q, permaneceu em seus níveis basais. Na avaliação de nitratos totais observou-se aumento no tecido pulmonar dos ratos cirróticos e após o tratamento com Q redução aos níveis dos controles. Quanto ao dano ao DNA a Q reduziu a frequência de micronúcleos e o dano ao DNA no fígado e no pulmão dos animais CBS+Q e não mostrou indícios de dano ao DNA nem aumento da frequência de micronúcleos quando comparados CO+Q com CO+V. No teste anatomopatológico do fígado sinais de necrose e nódulos regenerativos foram atenuados nos animais CBS+Q. No tecido pulmonar, os animais CBS+V desenvolveram alterações pulmonares semelhantes a SHP e após o uso de Q observou-se redução da vasodilatação e da estase sangüínea.

Conclusões: Os resultados obtidos sugerem que o flavonóide Quercetina, através do seu potencial antioxidante, provavelmente atenua as alterações pulmonares presentes na SHP, fato que nos estimula a futuras investigações.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: The definition of hepatopulmonary syndrome (HPS) involves the presence of hepatic disease, increase of the alveolar-capillary gradient in surrounding air and pulmonary vasodilatation in the absence of lung or heart disease.

Objectives: To evaluate the antioxidant effect of flavonoid quercetin (Q) in the rat lungs following common bile duct ligation (CBDL), an experimental model of HPS.

Materials and Methods: Wistar rats weighing between 200-300 g, were divided into four groups: Control+Vehicle (CO+V), Control+Quercetin (CO+Q), Secondary Biliary Cirrhosis+Vehicle (SBC+V) and Secondary Biliary Cirrhosis+Quercetin (SBC+Q). The assessment included serum analysis of aminotransferases (AST and ALT) and alkaline phosphatase (FA), arterial blood gas analysis, evaluation of lipoperoxidation (substances that react with tiobarbitúric - acid TBA-RS), quantitative evaluation of antioxidant enzymatic activity of Superoxide Desmutase (SOD) and Catalase (CAT), evaluation of total nitrates, evaluation of the DNA damage through the Tests of micronuclei and comet assay and pathology of lung and liver. The experiment lasted 28 days. On the 14th day and henceforth the animals received Q (50mg/Kg) or vehicle (NaCl 0.9%, 1mL/Kg of body weight) intraperitoneally. Statistical analysis used analysis of variance (ANOVA) and Student-Newman-Keuls test, and the level of significance was 5% ($p < 0,05$).

Results: There was a significant increase in the aminotransferases and alkaline phosphatase and a significant decrease in the partial arterial pressure of oxygen (PaO_2) and hemoglobin oxygen saturation ($SatO_2/Hb$) blood in the SBC+V animals when compared to the other groups. It was also found an increase in the enzymatic and gasometric parameters after treatment with Q. Reduction of the oxidative damage was detected in the lung and liver by TBA-RS. In regards to the antioxidant enzymes it was found that in cirrhotic animals, the Q maintained the same SOD levels both in liver and lung similar to the animal in the control groups. Following treatment with Q, CAT in the lung and in the liver have remained at the

same basal level. Total nitrates were increased in lung tissue of the cirrhotic rats. Such levels decreased after treatment with Q, back to the control levels. Quercetin reduced the micronuclei frequency, the DNA damage in liver and lung of SBC+Q animals, and showed neither DNA damage nor increase in the micronuclei frequency when compared with CO+Q with CO+V. The liver pathology showed a decrease in necrosis in SBC+Q animals. In the lung tissue, the SBC+V animals developed changes in lungs analog to the HPS. Following the use of Q, a decrease in vasodilation and blood stasis were found.

Conclusion: The results of this study suggest that administration of the flavonoid quercetin and its antioxidant properties probably attenuated the lung changes found in HPS. Such findings deserve further investigation.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A associação entre doença hepática crônica e alterações respiratórias foi reconhecida há mais de 100 anos, entretanto somente nos últimos quinze anos a detecção de alterações vasculares pulmonares associadas com a presença de cirrose e/ou de hipertensão portal têm sido submetidas a maiores investigações (Fallon 2005).

As alterações vasculares pulmonares relacionadas com doenças hepáticas crônicas compreendem duas síndromes distintas: a Síndrome Hepatopulmonar (SHP), caracterizada pela dilatação da microvasculatura pulmonar, e a Hipertensão Portopulmonar, caracterizada pela constrição, remodelamento das artérias pulmonares e aumento da sua resistência vascular (Fallon 2005).

O termo “Síndrome Hepatopulmonar” foi utilizado pela primeira vez em 1977 por Kennedy e Knudson, os quais descreveram a presença de dilatação vascular intrapulmonar com anormalidades na oxigenação, que é reconhecida como a principal característica da SHP. Estes autores relataram o caso de um paciente com cirrose hepática que apresentava hipoxemia arterial agravada pelo exercício e utilizaram a nomenclatura “Hepatopulmonar” em analogia à Síndrome Heparrenal, por acreditarem se tratar de mecanismo etiopatogênico semelhante (Kennedy & Knudson 1977).

A SHP é conceituada como uma relação clínica existente entre a disfunção hepática e a existência de dilatações vasculares pulmonares e/ou alterações da difusão de gases, e definida pela tríade que compreende a presença de doença hepática, aumento do gradiente alvéolo-capilar no ar ambiente e dilatações vasculares intrapulmonares na ausência de doença pulmonar ou cardíaca coexistente, as quais podem resultar em concentrações arteriais de oxigênio abaixo da normalidade, levando a alterações sistêmicas (Krowka, Staats et al. 1990).

As manifestações clínicas da cirrose variam desde a ausência de sintomas até a insuficiência hepática e são determinadas tanto pela natureza, quanto pela gravidade da hepatopatia subjacente e magnitude da fibrose estabelecida (Forestier, Solioz et al. 1997).

A cirrose biliar secundária, provocada pela obstrução do ducto biliar comum, é um modelo da icterícia obstrutiva extra-hepática humana, caracterizada pela colestase com evolução cirrogênica, como consequência da permanente agressão hepática, iniciada nos ductos biliares e perpetuadas pela evolução de uma ampla gama de processos fibrohepatogênicos (Hunt 1980).

Estudos prévios demonstraram que a indução de cirrose biliar secundária, através da ligadura de ducto biliar comum (LDBC), estabelecida por Kontouras e colaboradores, em 1984, simula a doença humana pelas alterações provenientes da reação inflamatória causada pelo refluxo biliar e a consequente desorganização da arquitetura natural do parênquima, com áreas inflamatórias e de deposição de colágeno e formação de fibrose (Pastor, Collado et al. 1997).

Em 1997, Fallon e colaboradores descreveram o modelo experimental de cirrose biliar secundária pela obstrução da via biliar comum em ratos, como sendo um modelo de SHP por observarem que a alteração hepática crônica acarretava um desequilíbrio na produção de mediadores vasoativos, resultando em decréscimo do tônus vascular e vasodilatação intrapulmonar neste modelo (Fallon, Abrams et al. 1997).

Na cirrose biliar secundária, há alterações nos mecanismos antioxidantes, que levam a um desequilíbrio entre os processos oxidativos e antioxidativos, o que estimula o processo de peroxidação lipídica, provocando lesões hepáticas (Singh, Shackleton et al. 1992) e está demonstrada a participação dos radicais livres na fisiopatologia da cirrose causada por estase biliar (Forestier, Solioz et al. 1997).

Estudos prévios, realizados por Tieppo & Vercelino, em 2003, demonstram que ratos cirróticos por ligadura de ducto biliar comum apresentam hipoxemia e aumento da lipoperoxidação em homogeneizado de tecido pulmonar, provavelmente devido à ação oxidativa de radicais livres em altas concentrações na circulação pulmonar.

Compostos antioxidantes e flavonóides são considerados eficazes para diminuir fibrose em modelos animais de cirrose biliar secundária por ligadura do ducto biliar comum, de cirrose por álcool ou por administração de tetracloreto de carbono (CCl₄) (Muriel, Suarez et al. 1994).

Os estudos prévios levaram-nos a considerar a hipótese de que a melhora da função hepática, através do uso de antioxidantes, poderia amenizar as complicações pulmonares, características da SHP (Tieppo & Vercelino 2003).

Avaliando as alterações causadas pela SHP e a inexistência de um modelo específico para se estudar as mudanças pulmonares características dessa síndrome, inclusive o envolvimento do estresse oxidativo, o presente trabalho tem como objetivo verificar o efeito do flavonóide quercetina nos tecidos hepático e pulmonar de ratos com ligadura de ducto biliar comum.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Síndrome Hepatopulmonar (SHP)

1.1.1 Definição

A síndrome hepatopulmonar é a situação clínica em que uma doença hepática determina alterações vasculares pulmonares com modificações na oxigenação sanguínea e dilatações vasculares intrapulmonares, logo, a SHP é definida como a presença de doença hepática e a coexistência de dilatações vasculares pulmonares com concentrações arteriais de oxigênio abaixo da normalidade (Sherlock & Dolley 1993).

Doenças crônicas do fígado podem levar a disfunções no sistema cardiovascular e pulmonar, com alterações hemodinâmicas que incluem aumento do débito cardíaco, baixa resistência vascular e vasodilatação (Nelson & Eichinger 2001). A hipertensão portal, a encefalopatia hepática e o desenvolvimento de ascite são complicações secundárias aos distúrbios hemodinâmicos que ocorrem em hepatopatas crônicos (Fernando, Marley et al. 1998).

As conseqüências hemodinâmicas das doenças hepáticas, na circulação sistêmica e pulmonar, incluem ainda a insuficiência cardíaca causada por *shunt* arteriovenoso hepático, hipertensão pulmonar, cardiomiopatia e SHP (Naschitz, Slobodin et al. 2000).

Em 1966, Berthelot e colaboradores documentaram, através de autópsias feitas em pacientes com diagnóstico prévio de cirrose hepática, a presença de dilatações pré-capilares pulmonares difusas, variando de 15 a 150 μm em seu diâmetro, bem como “aranhas” vasculares na pleura das bases pulmonares e a presença de malformações arteriovenosas na presença de hipoxemia arterial.

Tajuddin, em 1994, define SHP como uma relação entre fígado e pulmão, em pacientes com doença hepática crônica, com *shunt* funcional intrapulmonar e hipoxemia arterial associada.

Não há, até o momento, consenso definitivo sobre a SHP, mas aceita-se sua definição como sendo a tríade: 1) doença hepática e/ou hipertensão portal; 2) aumento do gradiente alvéolo-arterial em ar ambiente; 3) evidência de dilatações vasculares intrapulmonares (Krowka & Cortese 1990).

Essa definição é consistente com os critérios diagnósticos para essa síndrome sugeridos por Rodriguez-Roisin e colaboradores em 1992, porém não leva em conta a presença de outras anormalidades pulmonares ou cardíacas que estariam associadas em pacientes com cirrose, quando poderia ser difícil considerar a SHP, pois a hipoxemia e outras alterações pulmonares poderiam ser determinadas por uma pneumopatia ou cardiopatia primárias e não como conseqüência da cirrose.

Na disfunção respiratória por alteração da difusão de gases, que se desenvolve em pacientes com doença hepática avançada sem doença co-existente do parênquima pulmonar, confirma-se o diagnóstico da SHP ou também chamada angiodisplasia hepatogênica (Eriksson 1990; Krowka & Cortese 1990).

A SHP desenvolve-se em cerca de 15 a 20% dos pacientes com cirrose (Lange & Stoller 1995; Fallon & Abrams 2000). A hipoxemia geralmente é progressiva e os índices de mortalidade são significativamente aumentados em pacientes cirróticos com SHP em relação aos pacientes sem a síndrome (Schenk, Schoniger-Hekele et al. 2003).

Várias terapias médicas já foram utilizadas para o tratamento da SHP, entretanto, até o momento, apenas o transplante hepático pode corrigir as alterações vasculares pulmonares e, conseqüentemente, as anormalidades na difusão de gases (Abrams & Fallon 1997; Arguedas, Abrams et al. 2003).

Considerando o alto risco cirúrgico em pacientes gravemente hipoxêmicos, faz-se necessária uma terapia medicamentosa efetiva para o tratamento da SHP.

1.1.2 Achados Clínicos

As manifestações clínicas da SHP são as decorrentes da cirrose, independentemente da sua causa, como icterícia, ascite, hemorragia digestiva, encefalopatia, perda de massa muscular e estigmas de hepatopatia crônica ou de hipertensão portal associados com alterações respiratórias e pulmonares como dispnéia, hipocratismo digital e cianose.

As alterações clínicas e laboratoriais mais características da SHP estão relacionadas à dispnéia e à hipoxemia. A platipnéia é uma queixa caracterizada como falta de ar que ocorre quando o paciente assume a posição ortostática. Associada à platipnéia pode-se constatar a ortodesóxia, sendo esta a dessaturação da oxigenação arterial (hipoxemia arterial) induzida pelo ortostatismo (Altman & Robin 1969). A presença de platipnéia e ortodesóxia reflete a gravidade da dilatação vascular pulmonar, que predominaria nos terços inferiores do pulmão (Riegler, Lang et al. 1995). Outros sintomas respiratórios são pouco frequentes.

A presença de hipocratismo digital e de cianose, que não são constantes, sugere fortemente a SHP. No exame físico do tórax, nenhuma particularidade é observada em relação à síndrome (Garcia, Silvério et al. 1998).

A constatação de SHP em pacientes com hipertensão portal não-cirrótica sugere que a hipertensão portal pode ser um fator determinante desta síndrome (Babbs, Warnes et al. 1988).

1.1.3 Fisiopatologia

Os mecanismos da vasodilatação intrapulmonar não são bem definidos. Muitas hipóteses têm sido consideradas, tais como um desequilíbrio entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras no pulmão que poderia levar às anormalidades vistas nos pacientes com SHP (Aboussouan & Stoller 2000).

Vários mediadores humorais têm sido propostos como vasodilatadores circulantes responsáveis pela SHP, entre eles, as prostaglandinas, o glucagon, a substância P, o peptídeo

atrial natriurético, o fator de ativação plaquetário e o óxido nítrico (NO) (Panos & Baker 1996).

Na busca de uma substância específica, a principal hipótese é a do possível envolvimento do fator relaxante endotélio-derivado (Óxido Nítrico) como um potencial mediador nesta síndrome (Vallance & Moncada 1991; Perrella, Edell et al. 1992).

Muitos estudos têm valorizado o possível envolvimento do Óxido Nítrico (NO) pelo seu papel de vasodilatador capilar, possivelmente um fator que persiste, por alguma razão ainda não conhecida, em níveis elevados em relação ao normal, potencializando a formação de dilatações vasculares intrapulmonares, atuando como um potencial mediador nessa síndrome (Garcia, Silvério et al. 1998).

Atualmente, a atenção é focada sobre a produção excessiva de vasodilatadores, particularmente o NO, que é visto como fator vasoativo responsável pela vasodilatação pulmonar (Fallon 2005). Muitas pesquisas reforçam essa idéia, e muitos estudos têm demonstrado a ação do NO na interação fígado-pulmão (Matsumoto, Ogura et al. 1995; Rolla, Brussino et al. 1997; Brussino, Bucca et al. 2003).

O óxido nítrico é um gás denominado como fator relaxante derivado do endotélio que, em situações de endotoxemia, se mostra em níveis elevados nos tecidos. Nesta situação patológica, existe importante indução da atividade da NO-sintase entre os macrófagos e as células endoteliais, mediada por endotoxinas bacterianas e citocinas liberadas, resultando em significativa produção de óxido nítrico (Piqué 1994).

A baixa resistência vascular pulmonar e a baixa pressão arterial pulmonar estão presentes, devido à vasodilatação intrapulmonar, promovendo uma baixa tensão no leito vascular pulmonar (Lee 1989).

A fisiopatologia da hipoxemia na SHP é multifatorial. Os mecanismos predominantes incluem *shunt* intrapulmonar, comprometimento da relação ventilação-perfusão, baixa difusão, desequilíbrio da difusão-perfusão ou do gradiente de oxigenação alvéolo-capilar (Aboussouan & Stoller 2000).

O desequilíbrio entre a difusão-perfusão é um mecanismo que pode explicar a hipoxemia na SHP. Esse mecanismo pode ser responsável pela alteração do gradiente de oxigenação alvéolo-capilar ou efeito *shunt* e relaciona a hipoxemia com as dilatações vasculares pulmonares. No capilar dilatado e com diâmetro maior, a molécula de oxigênio vinda do alvéolo não pode difundir-se até o centro do vaso, e a hipoxemia, resultante desse fenômeno, ainda pode ser agravada pelo estado hiperdinâmico circulatório, com menor tempo disponível para o trânsito da hemácia dentro do capilar pulmonar (Figura 1). Essa anormalidade na difusão-perfusão traduz a dificuldade do oxigênio em saturar as hemácias em um capilar pulmonar anormalmente dilatado, evidenciando o efeito *shunt* funcional. O *shunt* funcional ocorre devido à diminuição da difusão do oxigênio através da membrana alvéolo-capilar, uma consequência da anormalidade de perfusão que acomete o pulmão de pacientes cirróticos (Garcia, Silvério et al. 1998).

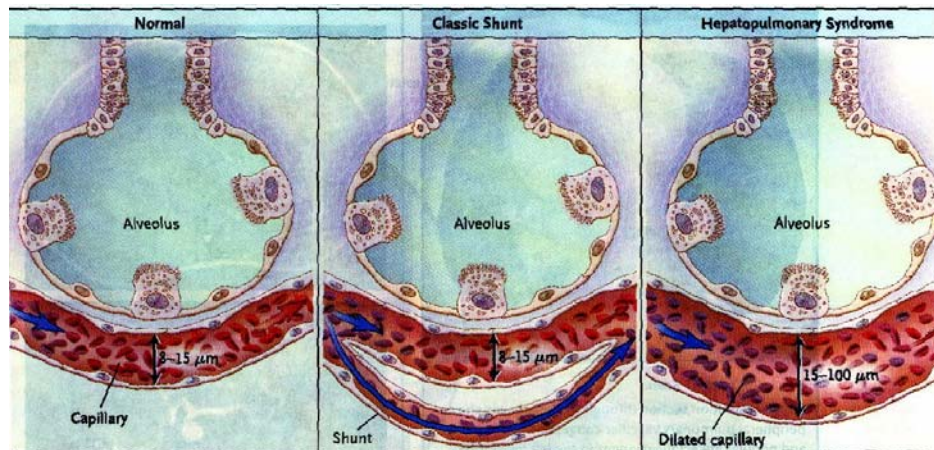


Figura 1. Efeito *shunt* relacionando a hipoxemia com as dilatações vasculares pulmonares.

Em modelos experimentais foi demonstrada a ação vasodilatadora do NO, e o aumento da NO sintase endotelial (eNOS) e pulmonar estaria relacionado à hipoxemia (Fallon, Abrams et al. 1997; Rolla, Brussino et al. 1997; Dinh-Xuan & Naeije 2004). Eles sugerem a ação do NO como o responsável pela vasodilatação intrapulmonar encontrada na SHP, mas novos estudos devem ser realizados para melhor compreensão dos mediadores causadores da SHP.

Além do envolvimento do NO, a endotelina-1 que, em condições normais é um vasoconstritor parácrino que atua na regulação do tônus vascular, também vem sendo amplamente estudada, visto que em situações de cirrose biliar secundária pode contribuir para a vasodilatação na microcirculação pulmonar, situação esta que ainda não é claramente definida (Fallon & Abrams 2000).

Também já foi demonstrado que animais cirróticos por ligadura de ducto biliar comum apresentavam hipoxemia e aumento da lipoperoxidação em homogeneizado de pulmão, provavelmente devido à ação oxidativa de radicais livres e do NO em altas concentrações na circulação pulmonar (Tieppo & Vercelino 2003).

1.2 Cirrose Biliar Secundária

A cirrose biliar é uma enfermidade crônica e difusa do fígado com alterações na sua estrutura e função, seja intra ou extra-hepática, sendo considerada uma possível complicação tardia da obstrução prolongada das vias biliares extra-hepáticas ocorrendo, segundo alguns autores, em menos de um décimo de pacientes com cirrose biliar (Gonzalez-Gallego & Esteller 1998).

Ocorre mais frequentemente como consequência de uma obstrução por lesão benigna do que por uma neoplasia, em vista da curta sobrevivência dos pacientes no segundo caso. Por outro lado, tem sido mais observada em obstruções benignas não-infectadas do que infectadas, talvez em vista do maior grau de obstrução no primeiro caso. A infecção das vias biliares, uma vez instalada, parece acelerar a formação da cirrose. A duração da obstrução para o desenvolvimento da cirrose é, em geral, superior a um ano, embora, em circunstâncias menos frequentes, possa a mesma ser observada após três a quatro meses apenas (Silva & D'albuquerque 1986).

Essa doença é acompanhada pela dificuldade de eliminação da bÍlis, pela destruição do parênquima hepático e pela fibrose progressiva (Rojkind & Ponce-Noyola 1982).

A obstrução crônica da via biliar extra-hepática pode determinar a estase biliar e áreas focais de necrose centrolobular, necrose periportal, proliferação e dilatação dos ductos e canálculos biliares dos espaços porta, colangite estéril ou infecciosa com infiltração de polimorfonucleares, edema e fibrose dos espaços porta. Como em outras formas de cirrose, a

lesão é acompanhada de fenômenos degenerativos e regenerativos do parênquima residual, com a formação de nódulos (Abdel-Aziz, Lebeau et al. 1990).

O extravasamento da bile dos canalículos biliares intralobulares em zonas de necrose periportal dá lugar à formação de “lagos biliares” e de fenômenos regenerativos no parênquima residual, com a formação de nódulos. A eliminação da obstrução costuma ser acompanhada de melhora bioquímica e morfológica (Rojkind & Ponce-Noyola 1982).

O dano hepático colestático é uma característica da cirrose biliar secundária e se define com critérios histopatológicos específicos e bioquímicos bem estabelecidos. A citotoxicidade dos ácidos biliares é atribuída a diversos mecanismos, incluindo as suas propriedades detergentes, a alteração da homeostase do Ca^{++} intracelular, a depleção de ATP e ao dano mitocondrial. Trabalhos recentes sugerem que na patogênese do dano colestático hepático participam as espécies ativas de oxigênio e reações de radicais livres (Parola, Leonarduzzi et al. 1996; Pastor, Collado et al. 1997; Orellana, Rodrigo et al. 2000).

Em crianças, a atresia biliar e a fibrose cística são as principais causas de cirrose biliar secundária. Em adultos, as causas mais freqüentes são coledocolitíase, estenoses benignas ou malignas da via biliar, cistos de colédoco, trauma pós-cirúrgico da via biliar, pancreatite crônica, tumores pancreáticos e colangite esclerosante primária (Friedman & Schiano 2004).

A colestase é uma manifestação comum em enfermidades crônicas do fígado e, quando prolongada, pode representar importante causa de dano hepático, com acúmulo de ácidos biliares tóxicos, que têm papel fundamental na necrose e fibrose hepáticas (Parola, Leonarduzzi et al. 1996).

1.3 LDBC e Síndrome Hepatopulmonar Experimental

A obstrução prolongada do ducto biliar em ratos é um modelo experimental (**Figura 2**) para induzir cirrose biliar secundária e fibrose, sendo que se estabelecem as características próprias da patologia em torno de 28 dias (Kountouras, Billing et al. 1984). Nesse período, a obstrução provoca aumento do ducto biliar, edema, reações inflamatórias agudas pelo refluxo biliar e aparecimento de fibrose periportal devido a alterações na síntese e degradação de proteínas matriciais como colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos causando desorganização da arquitetura natural do parênquima (Rojkind & Ponce-Noyola 1982).

Em ratos com cirrose biliar secundária, provocada pela obstrução do ducto biliar comum, observa-se hepatomegalia e esplenomegalia, que acontecem principalmente pelo aumento do tecido conjuntivo assim como do epitélio biliar e paralelamente pode ocorrer a hipertensão portal que se manifesta pela dilatação das veias esplênicas (Yaari, Sikuler et al. 1992).

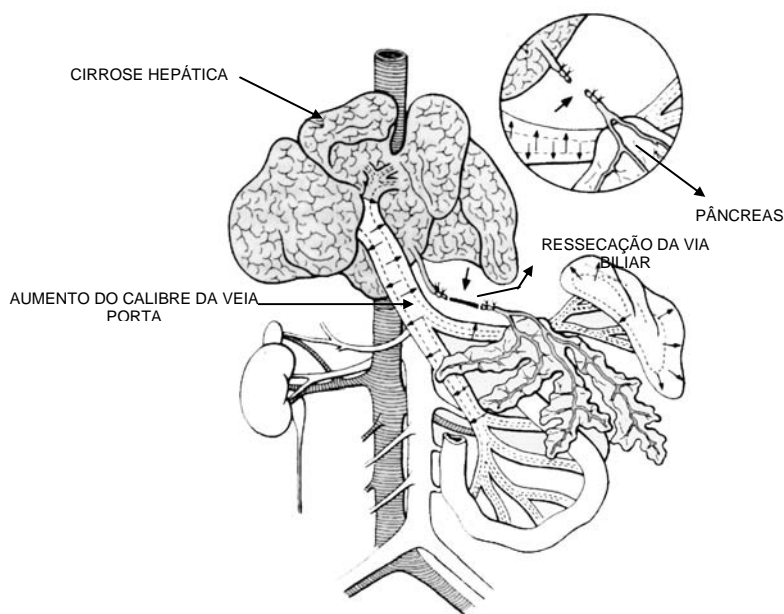
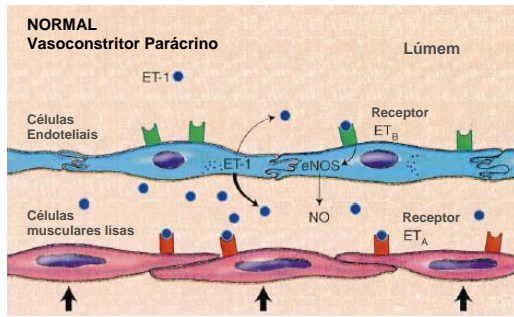


Figura 2 – Modelo experimental de Ligadura de Ducto Biliar Comum (Fernandes & Mies 1998)

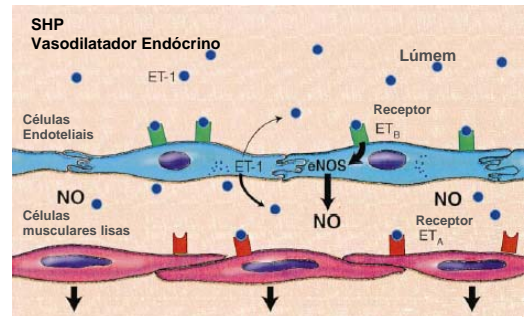
Em 1993, Chang & Ohara demonstraram que animais submetidos à ligadura de ducto biliar comum apresentavam desenvolvimento progressivo de anormalidades nas trocas gasosas. Esses mesmos autores, em 1993, encontraram aumento do nível de glucagon circulante em animais com cirrose biliar secundária experimental e sugeriram que esses animais apresentavam estado circulatório hiperdinâmico devido à ação vasoativa deste hormônio.

Fallon e colaboradores, em 1997, estabeleceram a ligadura de ducto biliar comum (LDBC) como um modelo para o estudo da SHP, demonstrando que animais cirróticos com cinco semanas de LDBC apresentavam hipoxemia e vasodilatação intrapulmonar.

Os estudos que envolvem o modelo de LDBC, como modelo de SHP, avaliaram uma seqüência de alterações moleculares na vasculatura pulmonar que influenciariam o tônus vascular durante a progressão dessa doença. Tem-se dado grande importância ao papel da endotelina-1 (ET-1), que é produzida pelas células estreladas do fígado e que, em situações fisiológicas, atua de forma parácrina. Em situações de disfunção hepática, como na cirrose, a síntese dessa substância pelas células estreladas eleva-se significativamente, aumentando a sua concentração plasmática e passando a atuar de forma endócrina, atingindo a circulação pulmonar, sendo um mediador das alterações endoteliais e da progressão da vasodilatação intrapulmonar, pois o aumento da produção hepática e circulante de ET-1 está relacionado à produção de eNOS, devido a sua ligação com receptores ET_b (**Figuras 3 e 4**). A eNOS possivelmente está ligada à gravidade das anormalidades nas trocas gasosas e à vasodilatação por se tratar de uma substância precursora do NO (Luo, Abrams et al. 1998; Fallon & Abrams 2000).



Figuras 3. Efeito da ET-1 na microvasculatura normal (Fallon & Abrams 2000).



Figuras 4. Efeito da ET-1 na microvasculatura na SHP (Fallon & Abrams 2000).

Um grupo de pesquisadores franceses relacionam o aumento de NO com a translocação bacteriana, que ocorre em 45-75% dos animais cirróticos induzidos experimentalmente. Essa translocação bacteriana se deve ao decréscimo da função fagocitária do fígado pela lesão, o que favorece a entrada de bactérias e endotoxinas na circulação pulmonar, gerando acúmulo de macrófagos no endotélio e estes, por sua vez, secretam produtos para o meio extracelular, incluindo citocinas e NO que, em altas quantidades, tornam-se uma fonte altamente tóxica e oxidante além de o NO ser uma substância relaxante do endotélio, levando à vasodilatação (Thannickal & Fanburg 2000; Rabiller, Nunes et al. 2002).

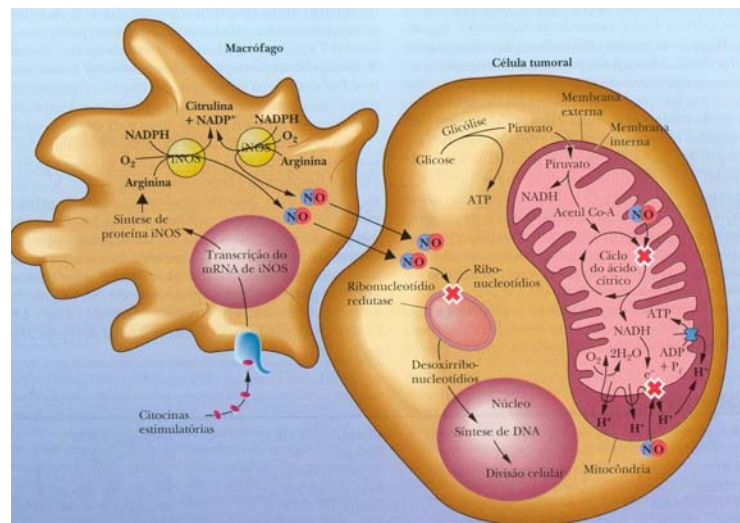


Figura 5. Papel do Óxido Nítrico no sistema imune e transcrição da iNOS (Campbell, 2000).

As células fagocitárias geram ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que é capaz de oxidar a membrana plasmática, produzindo grande quantidade de espécies ativas do oxigênio (EAO), e, quando combinado com NO, pode levar à formação de peroxinitritos, um potente e versátil oxidante que pode atacar tecidos biológicos, promovendo danos por estresse oxidativo (Thannickal & Fanburg 2000).

Foi demonstrado que animais cirróticos por LDBC apresentavam hipoxemia e aumento da lipoperoxidação em homogeneizado de pulmão, provavelmente devido à ação oxidativa de radicais livres e do NO em altas concentrações na circulação pulmonar (Tieppo & Vercelino 2003).

1.4 Estresse Oxidativo e Antioxidantes

1.4.1 Radicais Livres e Espécies Ativas de Oxigênio

O oxigênio é um elemento vital e também potencialmente nocivo para as células. Em certas condições, é responsável por reações químicas muito tóxicas (Boveris & Chance 1973).

A molécula de oxigênio, em seu estado natural, é um birradical que possui dois elétrons desemparelhados, sendo um bom agente oxidante, capaz de oxidar outros átomos ou moléculas, aceitando um par de elétrons (Llesuy 2002).

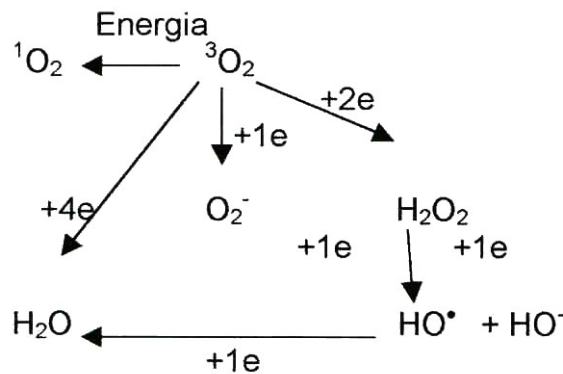


Figura 6. Esquema da produção das EAO (Llesuy 2002).

Os efeitos deletéreos do oxigênio sobre os organismos aeróbios variam, consideravelmente, com a espécie do organismo, com a idade, com o estado fisiológico e com a dieta, e os diferentes tecidos de um mesmo animal também podem ser afetados de formas diferentes (Farber, Kyle et al. 1990). Esses efeitos ocorrem devido à elevada produção de radicais livres ou de espécies ativas de oxigênio (EAO).

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existir independentemente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, sendo espécies paramagnéticas e altamente reativas, capazes de atacar qualquer biomolécula (Halliwell 1994). Tais radicais podem ser formados em situações fisiológicas ou patológicas e são danosos às células e ao organismo quando produzidos em grandes quantidades (Halliwell 1994; Peres, Tunon et al. 2000).

Os RL reagem através de ligações covalentes ou reações bioquímicas em cadeia. Na primeira situação, uma união covalente ocorre quando dois radicais formam um par, combinando os seus elétrons desemparelhados. As reações bioquímicas em cadeia ocorrem quando reagem com outro não-radical, e, ao final dessa reação, produzir-se-á outro radical.

Além dessas duas vias, existem outras formas de obtenção de radicais livres, através da fagocitose na resposta inflamatória, em situações de exposição do organismo a radiações ionizantes, nas contaminações, poluição, excesso de exercício, hiperóxia e isquemia (Figura 7) (Afanas'ev, Ostrachovitch et al. 1995; Peres, Tunon et al. 2000).

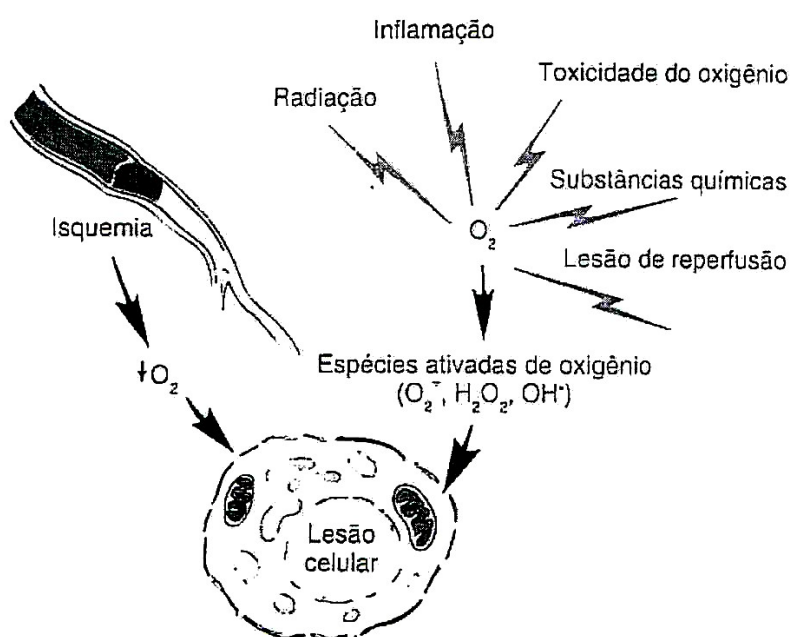


Figura 7. O papel do O_2 na lesão celular. A isquemia causa lesão por redução dos suprimentos celulares de O_2 , enquanto outros estímulos, induzem lesões através de espécies ativadas tóxicas de oxigênio (Cotran, Kumar et al. 2000).

Diferentes estudos também têm demonstrado a participação dos radicais livres e das espécies ativas do oxigênio na fisiopatologia da cirrose causada por estase biliar (Forestier, Solioz et al. 1997; Pastor, Collado et al. 1997).

Esses radicais podem ser pequenos, como a hidroxila, ou grandes e complexos, contendo átomos de carbono e cadeias laterais, sendo os dois principais radicais livres o radical hidroxila (OH^{\bullet}) e o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Droge 2002).

As EAO, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podem ser formadas durante o metabolismo normal de qualquer célula através da perda de elétrons de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por não-radical (Halliwell & Gutteridge 1999) e estão envolvidas numa série de processos degenerativos, devido à propriedade de serem ou gerarem radicais livres (Meneghini 1987; Yu 1994).

Nos organismos aeróbios, o O_2 é reduzido à água no final da respiração mitocondrial (**Figura 8**). A molécula de O_2 se mantém unida ao complexo IV da cadeia respiratória até que ocorra a redução total do O_2 em água. Durante esse processo, por receber apenas um elétron de cada vez, ocorre a redução parcial do O_2 , gerando ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Com a adição de um hidrogênio ao ânion superóxido, este se reduz a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Posteriormente, se um terceiro elétron for acrescentado, ocorrerá a formação de um radical hidroxila (OH^{\bullet}). Deste modo, a formação de radicais ou de espécies ativas de oxigênio deve-se ao fato do O_2 se reduzir à água de forma monovalente, o que permite a geração de moléculas ou íons reativos durante o processo de redução do oxigênio (Thannickal & Fanburg 2000).

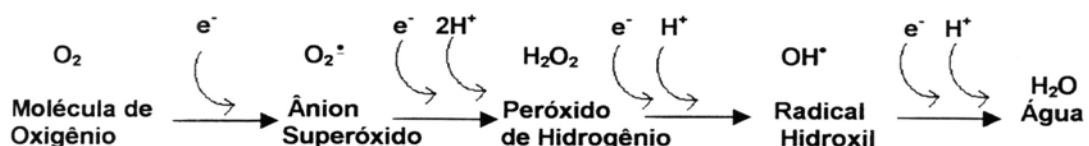
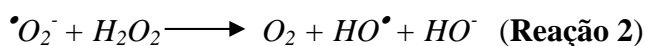
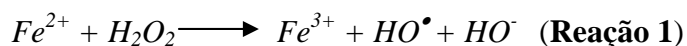


Figura 8. Esquema da redução do O_2 em H_2O , na respiração mitocondrial e a redução das EAO (Meneghini 1987).

Dessa forma, a geração das EAO ocorre durante os processos de oxidação biológica, dentre os quais podemos destacar a respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa, para formação de ATP na mitocôndria. A princípio, o oxigênio (O₂) é reduzido até água (H₂O), recebendo quatro elétrons de uma só vez pela citocromo oxidase. Entretanto, em razão de sua configuração eletrônica, o oxigênio tem uma forte tendência a receber um elétron de cada vez, gerando compostos intermediários altamente reativos. A formação dessas moléculas ocorre em, aproximadamente, 5% de todo processo de redução do oxigênio até água. (Del Maestro 1980; Meneghini 1987; Yu 1994; Droge 2002).

O ânion superóxido (O₂^{•-}) é constituído pela redução do O₂ molecular por um elétron, após aporte energético. Normalmente, é removido pela reação de dismutação, que consiste na reação de dois ânions de superóxido catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). O H₂O₂, é normalmente produto da dismutação do ânion superóxido pela enzima SOD. As enzimas oxidativas são capazes de formar e degradar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e essas enzimas são encontradas nos peroxissomas. Dentre as mais comuns encontram-se a catalase (CAT), D-amino oxidase, urato oxidase, B-oxidase de ácidos graxos e glutathiona peroxidase (GPx). O H₂O₂ apesar de não ser um radical livre, pode reagir com outro ânion superóxido, ou com metais de transição, conforme a reação de Fenton (**Reação 1**) e Haber-Weiss (**Reação 2**), formando o radical hidroxila (OH[•]). (Halliwell 1994; Favier, Cadet et al. 1995).



O radical hidroxil é uma EAO instável, sendo um dos mais potentes oxidantes em sistemas biológicos. É formado a partir da reação do H_2O_2 com um ânion superóxido ou com íons ferro (segundo a reação de Fenton - **Reação 1**) e que não possui enzima que catalise sua remoção. Esse radical livre possui a capacidade de atravessar as membranas e reagir com biomoléculas, como lipídios insaturados e DNA, apesar de seu baixo tempo de meia vida (Halliwell & Gutteridge 1999).

Os radicais peroxil – alcóxil são mais seletivos, reagem com as proteínas da membrana e iniciam a seqüência de reações em cadeia da peroxidação de lipídios, tendo por produto final o malondialdeído (Peres 1994).

O oxigênio *singlet* é uma EAO produzida por fosforilação oxidativa, que se caracteriza como um estado excitado do oxigênio molecular, com mais energia, pelo arranjo de elétrons que reagem mais rapidamente que o oxigênio em estado normal. Quando presente em pequenas quantidades, modula processos bioquímicos e, em grandes concentrações, provoca lesões no DNA e destruição celular. É originado de reações entre o ânion hipoclorito ou ânion superóxido com H_2O_2 . Uma pequena quantidade de O_2 *singlet* é produzida como resultado da absorção da luz dentro da célula, causando formação de um gradiente de fótons através da membrana celular e da membrana mitocondrial, alterando a permeabilidade celular para vários íons (Favier, Cadet et al. 1995; Peres 1994).

Os danos celulares causados pelos radicais livres podem ser a peroxidação lipídica, a inativação enzimática, a alteração do estado redox intracelular e o dano ao DNA (Favier, Cadet et al. 1995).

A peroxidação de lipídios é uma reação em cadeia de formação de radicais livres, iniciada pelo radical hidroxil, que age sobre a cadeia de ácidos graxos da membrana fosfolipídica, na qual o radical hidroxil se transforma em hidroperóxidos de lipídios (Husain, Cillard et al. 1987).

A LPO é a autooxidação das cadeias laterais dos ácidos graxos polinsaturados mediante a abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metileno (Fase de Iniciação). Após essa fase, forma-se um radical lipídio-carbono que reage com a cadeia lateral do ácido graxo polinsaturado adjacente (Fase de propagação). Dessa forma, um evento inicial pode desencadear vários ciclos de auto-oxidação, suficientes para alterar a função da membrana, interrompendo a ação sobre a permeabilidade seletiva, causando descontrole na entrada e saída de ânions, comprovado pela perda de fluidez (Llesuy 2002).

Logo, em condições fisiológicas, o balanço entre agentes oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém equilibrado. Quando ocorre aumento na produção de EAO, diminuição das defesas antioxidantes ou ambas as situações, o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes é rompido em favor dos agentes oxidantes e nessa situação diz-se que a célula ou organismo se encontra sob estresse oxidativo com potenciais danos (Barp, Araujo et al. 2002).

1.4.2 Defesas Antioxidantes

Existem estratégias celulares de defesa contra os processos mediados pelas EAO que incluem os sistemas de defesas antioxidantes.

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações – comparadas àquelas de um substrato oxidável – atrasa significativamente ou impede a oxidação daquele substrato (o termo oxidável inclui macromoléculas tais como proteínas, lipídios, hidrato de carbono e DNA). A função desses compostos é manter os níveis intracelulares de EAO em baixas concentrações, e para isso, atuam prevenindo a formação dessas espécies ou combatendo-as uma vez que tenham sido formadas (Repetto & Llesuy 2002).

As defesas antioxidantes compreendem agentes que cataliticamente removem RL e outras espécies ativas, como as enzimas SOD, CAT e GPx; proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes, como íons ferro e cobre ou como transferinas e hepatoglobinas; proteínas que protegem biomoléculas contra dano por outros mecanismos, como proteínas de choque térmico; e substâncias de baixo peso molecular que combatem EAO e espécies ativas de nitrogênio como glutathiona, α -tocoferol, ácido úrico, bilirrubina e outros (Mendes 2004).

A atividade das defesas antioxidantes varia com o tipo celular, e possivelmente, em diferentes células do mesmo tecido (Halliwell & Gutteridge 1999).

O sistema antioxidante é constituído por componentes enzimáticos e não-enzimáticos, que atuam conjuntamente na proteção celular. O sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. Existem, também, as defesas secundárias que impedem a propagação da LPO e as terciárias, enzimas de reparo de danos já instalados (Yu 1994).

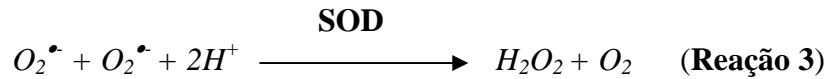
Quando a substância age neutralizando as EAO na fase de iniciação ou propagação da LPO, levando à formação de um composto menos reativo, é chamada de "scavenger". Ao passo que, se a substância antioxidante tiver a propriedade de absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os, é denominada de "quencher" (Sies & Murphy 1991; Halliwell 1997).

A distribuição das enzimas antioxidantes está intimamente relacionada com as fontes de espécies ativas de oxigênio (EAO), sendo assim, podemos notar a importância da existência das defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas. Sem elas, o equilíbrio celular seria alterado e facilitaria o surgimento de várias disfunções que poderiam levar a processos de doença.

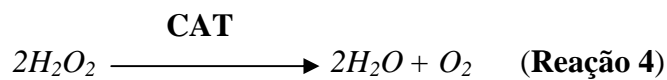
1.4.3 Defesas Antioxidantes Enzimáticas

O sistema enzimático encarregado da detoxificação das EAO é formado por várias enzimas, das quais pode-se destacar: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), sendo que cada uma delas desempenha papel específico no controle do balanço oxidativo.

A SOD tem por principal função atuar na dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em H_2O_2 e O_2 , sendo que o primeiro é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas (**Reação 3**). Essa enzima pode ser classificada em três grandes grupos, segundo o metal que se encontra presente no sítio ativo: a Cu-ZnSOD, localizada no citosol; a SOD-manganês, presente na matriz mitocondrial e a FeSOD existente somente nos procariontes e plantas (Chance, Sies et al. 1979).



Os produtos finais da dismutação são o peróxido de hidrogênio e o oxigênio. O H_2O_2 , apesar de não ser um radical, facilmente reage, originando o radical hidroxila. A remoção dos peróxidos ocorre por meio das enzimas CAT e da GPx, tendo a CAT mais afinidade ao peróxido de hidrogênio, de metila e etila, enquanto a GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos (Llesuy 2002). A ação da CAT sobre o peróxido é apresentada na **Reação 4**.



Entre as peroxidases, que geralmente usam o grupo heme, se sobressai a atividade da GP_x, que se localizada no citosol e na matriz mitocondrial. Ela catalisa a redução do peróxido de hidrogênio, através da oxidação da glutationa reduzida (GSH). Para reestabelecer a glutationa oxidada (GSSH) à reduzida, é necessário que a glutationa redutase (GR) promova a regeneração da GSSH, consumindo NADPH, conforme demonstrado na **Figura 9** (Halliwell & Gutteridge 1999; Yu 1994).

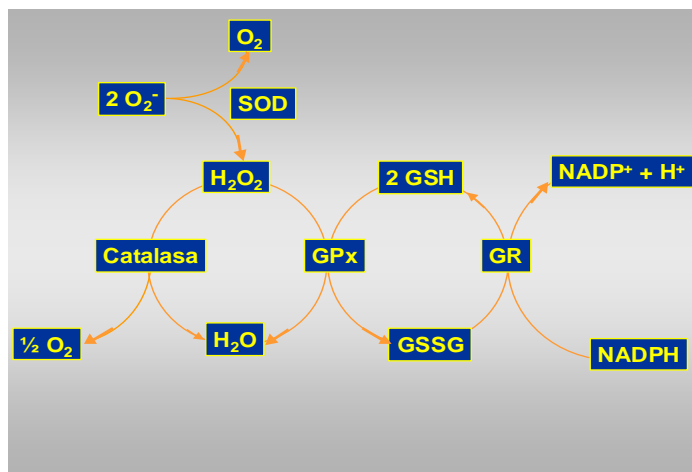


Figura 9. Esquema da interação entre as enzimas antioxidantes.

1.4.4 Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas

Assim como as enzimas antioxidantes, que removem radicais livres ou EAO antes que esses causem dano à membrana, existem substâncias que atuam como antioxidantes, evitando reações em cadeia como a LPO. Elas são conhecidas como defesas antioxidantes não-enzimáticas, sendo as mais conhecidas a glutathione, o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), β -carotenos e flavonóides (Peres, Tunon et al. 2000; Pavanato, Tunon et al. 2003; Moreira, Fraga et al. 2004; Dias, Porawski et al. 2005).

Essas substâncias, quando atuam, podem evitar a formação de RL ou EAO, suprimir uma cadeia de peroxidação na fase de propagação e reparar ou reconstruir a membrana.

A glutathione é um tripeptídeo de ácido α -glutâmico, cisteína e glicina que, além de ser um importante antioxidante não-enzimático, participa de reações de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase e a glutathione transferase, logo, uma alta concentração de GSH intracelular protege a célula contra a ação de EAO, reagindo por via não-enzimática com estas espécies. A sua ação se deve à presença de um grupamento sulfidril, que atua como doador de elétrons (Halliwell & Gutteridge 1999).

A vitamina C é um composto hidrossolúvel que atua como co-substrato na biossíntese do colágeno, catecolaminas e carnitina. Atua como “*scavenger*” de $O_2^{\bullet-}$ e $OH^{\bullet-}$ com a formação de um composto intermediário que vem reduzido sucessivamente pela GSH (Halliwell 1994).

A forma da vitamina E com maior atividade química é o α -tocoferol, que é um composto lipossolúvel, presente em altas concentrações em muitos tecidos, em nível intracelular e está

presente nas membranas celulares e nas lipoproteínas. Sua ação, como antioxidante, está associada à inibição da peroxidação de lipídios. Após reagir com radicais peroxil, retorna à forma de α -tocoferol pela ação do ascorbato. (Landvik 2004).

β -carotenos têm sido considerados porque apresentam a capacidade de neutralizar radicais. Eles age principalmente com o oxigênio *singlet*, sendo que sua utilização ocorre em concentrações baixas, tem afinidade à luz e absorve a energia de excitação do radical (Krinsky 1989).

Os flavonóides são encontrados nas folhas e partes externas das plantas. Para proteger os tecidos da ação oxidativa, é descrito por vários autores que fitoterápicos, entre eles os flavonóides, possuem atividade antioxidante. Alguns flavonóides, como a rutina e a quercetina, estão sendo estudados e estão apresentando bons resultados como antioxidantes (van Acker, van den Berg et al. 1996; Cao, Sofic et al. 1997; Peres, Tunon et al. 2000; Pavanato, Tunon et al. 2003; Moreira, Fraga et al. 2004; Dias, Porawski et al. 2005).

Muitos trabalhos têm demonstrado a redução da fibrose em situações de cirrose biliar e hepática através da administração de flavonóides (Peres, Tunon et al. 2000; Pavanato, Tunon et al. 2003), assim como da redução da hipertensão portal (Moreira, Fraga et al. 2004).

Isso significa que são capazes de proteger a célula ou o tecido de danos decorrentes de RL ou de LPO (Day, Mellon et al. 2001).

1.4.5 Flavonóides

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, de cirrose por álcool ou por administração de tetracloreto de carbono (Pavanato, Tunon et al. 2003).

Flavonóides é o nome genérico de um grupo de moléculas formadas pelo metabolismo secundário dos vegetais, que se originam mediante uma via biossintética mista (Rice-Evans & Miller 1996). São compostos que contêm grupos hidroxila fenólicos que lhes conferem uma ação antioxidante com importante potencial terapêutico (**Figura 10**) 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, Price et al. 1999).

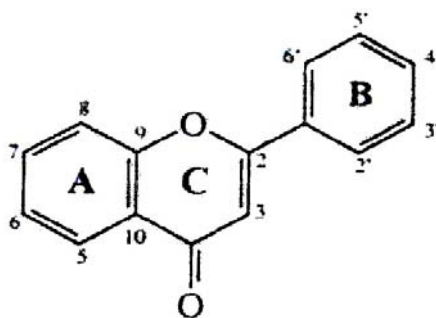


Figura 10. Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração (Rice-Evans & Miller 1996).

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).

1.4.6 Quercetina

A quercetina é classificada como um flavonol (**Figura 11**) típico, cuja denominação científica é 2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxil-4H-1-benzo-piran-4-ona, também denominado de 3,3',4',5,7-pentahidroxiavona pela Organização Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e apresenta capacidade de unir-se a polímeros biológicos tais como enzimas, transportadores de hormônios e DNA, podendo quelar íons metálicos de transição, tais como Fe^{2+} , Cu^{2+} , catalisar transporte de elétrons e depurar radicais livres. Considera-se que a quercetina tem excelente potencial antioxidante por suas propriedades anti-radicaais livres fundamentalmente aos radicais hidroxila e superóxido que são espécies consideradas altamente reativas e implicadas no início da cadeia de peroxidação lipídica (Rice-Evans & Miller 1996; Nijveldt, van Nood et al. 2001; Van Hoorn, Nijveldt et al. 2002).

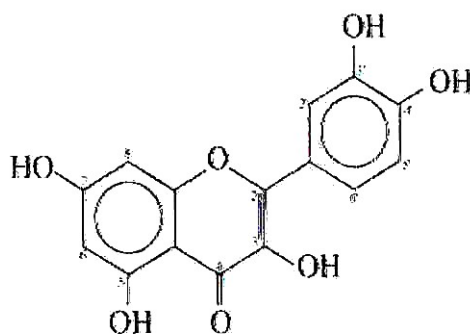


Figura 11. Estrutura química da quercetina (Formica & Regelson 1995).

Os grupos fenólicos possuem forte atividade antioxidante e potencial terapêutico em várias doenças, incluindo câncer, doenças isquêmicas do coração e aterosclerose (Formica & Regelson 1995).

A quercetina é um dos antioxidantes mais efetivos entre os flavonóides naturais e é representada por constituintes da dieta humana (frutas, vegetais, entre outros), protegendo as células contra as espécies ativas do oxigênio (Hertog & Hollman 1996).

Para que um flavonóide apresente potente ação antioxidante, ou seja, atue como um varredor de RL ou EAO, é necessário que esta molécula consiga doar elétrons para estabilizar um RL e que, ao ceder esses elétrons, rapidamente se estabilize (Lin, Chen et al. 2002).

Acredita-se que essa capacidade de doar elétrons, com maior ou menor facilidade, potencializa ou reduz a ação antioxidante dos flavonóides e está associada à relação estrutural-atividade de cada molécula. Para entender essa relação, é importante recordar a estrutura básica dos flavonóides que são compostos por 15 carbonos, distribuídos em 2 anéis fenólicos, conectados a unidade do carbono 3 e, normalmente, acoplados a uma molécula de açúcar, a qual incrementa sua solubilidade em água (Lin, Chen et al. 2002).

Trabalhos experimentais, utilizando quercetina, obtiveram redução das lesões no tecido hepático e verificaram que a administração de quercetina aumenta as defesas antioxidantes, reduz o dano oxidativo no fígado, a proliferação do ducto biliar e a fibrose. Além disso, verificaram que a melhor resposta obtida com a quercetina foi na dose de 150 $\mu\text{mol/Kg}$ de peso corporal que corresponde a 50 mg/Kg de peso corporal utilizado neste trabalho (Peres, Tunon et al. 2000; Pavanato, Tunon et al. 2003; Moreira, Fraga et al. 2004; Dias, Porawski et al. 2005).

Pavanato e colaboradores, em 2003, verificaram que o tratamento de três semanas na dose de 50mg/Kg/dia na cirrose induzida por tetracloreto de carbono intraperitonealmente protege

o fígado, reduz o conteúdo de colágeno e diminui a expressão da iNOS e a peroxidação lipídica.

Estudos *in vitro* têm mostrado que a quercetina e outros flavonóides inibem fortemente a produção de óxido nítrico e do fator de necrose tumoral pelas células de Kupffer quando estimuladas pela injúria (Kawada, Seki et al. 1998).

Militerstainer e colaboradores, em 2003, demonstraram a ação da quercetina, quando administrada a longo prazo, após instalada a cirrose biliar secundária e verificaram efeito protetor sobre o parênquima hepático.

A quercetina também tem sido relatada em vários estudos de apoptose, nos quais foi demonstrado que inibiu a apoptose induzida pelo peróxido de hidrogênio das células mesangiais, fibroblastos e células epiteliais (Park, So et al. 2003).

Muitos efeitos dos flavonóides têm sido constatados sobre funções celulares, incluindo efeito mutagênico, antimutagênico, antiviral e citotóxico, além de antioxidante (Formica & Regelson 1995; Robak & Gryglewski 1996; Erden Inal, Kahraman et al. 2001; da Silva, Herrmann et al. 2002). Tendo em vista as diferentes discussões e as complicações advindas da cirrose, do alto custo do tratamento, dos problemas sociais em decorrência dessa doença e das altas taxas de mortalidade, o estudo de substâncias que possam impedir ou diminuir os danos ocasionados no desenvolvimento dessa doença, bem como as complicações respiratórias, são de extrema relevância e importância.

2 OBJETIVOS DO ESTUDO

2 OBJETIVOS DO ESTUDO

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo geral avaliar o efeito da quercetina no tecido pulmonar de ratos com ligadura de ducto biliar comum, como um modelo experimental de Síndrome Hepatopulmonar (SHP).

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Verificar a integridade do fígado de ratos com cirrose biliar secundária e submetidos à administração da quercetina, através da análise das enzimas séricas aminotransferases Aspartato (AST) e Alanina (ALT), e da fosfatase alcalina (FA), bem como avaliar alterações do peso do fígado, do baço e do pulmão desses animais em relação ao seu peso corporal total.
- 2) Verificar alterações na difusão de gases através de Gasometria Arterial, avaliando a PaO₂ (pressão parcial de oxigênio arterial), a PaCO₂ (pressão parcial de gás carbônico arterial), o pH (Potencial de Hidrogênio) e a SatO₂/Hb (saturação de oxigênio da hemoglobina), bem como a diferença alvéolo-arterial de O₂.

- 3) Avaliar nos tecidos hepático e pulmonar, nos diferentes grupos, através da determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), os efeitos que as substâncias antioxidantes produzem na oxidação de lipídios e quantificar a atividade enzimática antioxidante nos tecidos hepático e pulmonar através da medida das concentrações das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT).

- 4) Avaliar os metabólitos do Óxido Nítrico (nitritos e nitratos) nos tecidos hepático e pulmonar nos diferentes grupos.

- 5) Avaliar os danos ao DNA no modelo de cirrose biliar secundária e a ação da quercetina como agente genotóxico/antigenotóxico, utilizando o teste de micronúcleos e o ensaio cometa.

- 6) Analisar os efeitos do flavonóide quercetina sobre os tecido hepático e pulmonar através da histologia por picrosírius e hematoxilina & eosina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento da Pesquisa

Este estudo tem caráter experimental qualitativo e quantitativo, e para isso, foi realizada a simulação da cirrose biliar secundária por ligadura de ducto biliar comum (LDBC).

3.2 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, com peso entre 200 e 300 gramas, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. 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 individuais, de 47x34x18cm, forradas com maravalha, em ciclo de doze horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas) e temperatura de 22 ± 2 °C. A água e a ração foram administradas livremente, sendo tratados diariamente com água e ração Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil).

Os procedimentos com os animais foram de acordo com o preconizado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação de Clínicas de Porto Alegre (Goldin & Raymundo 1997).

3.3 Grupos Experimentais

O modelo utilizado foi de cirrose biliar secundária através de ligadura de ducto biliar comum (LDBC), e os animais foram divididos em quatro grupos:

- I. **Controle + Veículo (CO + V)** - Grupo submetido à simulação da cirurgia, sem a LDBC e administração de Veículo (NaCl);
- II. **Controle + Quercetina (CO + Q)** - Grupo submetido à simulação da cirurgia, sem a LDBC e tratamento com quercetina;
- III. **Cirrose Biliar Secundária + Veículo (CBS + V)** - Grupo submetido à cirurgia de LDBC e administração de Veículo (NaCl);
- IV. **Cirrose Biliar Secundária + Quercetina (CBS + Q)** - Grupo submetido à cirurgia de LDBC e tratamento com quercetina.

3.4 Procedimentos Experimentais

3.4.1 Desenvolvimento do Modelo de Síndrome Hepatopulmonar pela Indução de Cirrose Biliar Secundária

O processo iniciou com a anestesia do animal mediante a administração de fármacos anestésicos e posicionamento do mesmo para cirurgia (**Figuras 12 e 13**). Foi utilizada uma mistura de Cloridrato de Xilazina 2% 50mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Cetamina 100mg/Kg de peso corporal intraperitonealmente. A intervenção cirúrgica iniciou com a realização de tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida de uma laparotomia ventral média, seguida de uma dissecação do ducto biliar comum na altura da desembocadura

dos ductos pancreáticos, ligando-se por meio de dois nós para posterior secção entre eles (**Figuras 14 e 15**). A cavidade abdominal foi fechada com pontos individuais em “U” no plano cutâneo, e o peritônio e a camada muscular abdominal foram fechados com pontos contínuos (**Figura 16**). Os animais se recuperaram da anestesia em caixas individuais forradas com maravalha em encubadora para recém-nascidos (FANEM - SP), antes de serem devolvidos às condições padrão da Unidade de Experimentação.

Os animais dos grupos **Co + V** e **Co + Q** não foram submetidos a LDBC, sendo realizada somente a manipulação do ducto mediante o estresse cirúrgico.

Após 28 dias, os animais foram sacrificados.



Figura 12. Preparação do material cirúrgico



Figura 13. Posicionamento do animal para cirurgia

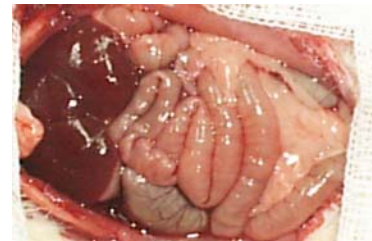


Figura 14. Laparotomia ventral e exposição visceral

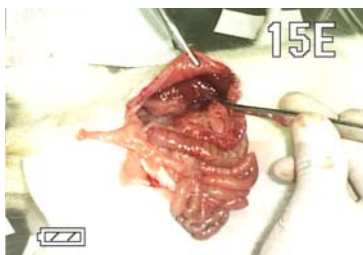


Figura 15. Exposição e ligadura do ducto biliar



Figura 16. Sutura da camada muscular abdominal

3.4.2 Administração do Veículo e da Quercetina

O tratamento com a quercetina iniciou-se a partir do 14º dia do procedimento cirúrgico, diariamente, por via intraperitoneal, na dose de 50 miligramas de quercetina por quilograma de peso do animal. Os animais controle receberam o veículo (solução fisiológica – NaCl 0,9%) no volume de 1mL por quilograma de peso corporal, da mesma forma intraperitonealmente.

3.5 Sacrifício dos Animais e Obtenção das Amostras de Tecido e Sangue

Transcorridos os 28 dias do desenvolvimento do modelo e 14 dias de administração de quercetina ou Veículo, conforme o grupo, os animais foram novamente pesados e anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilasina (10 mg/kg) intraperitonealmente.

Primeiramente foi coletado sangue pela técnica da punção de plexo veno retro-orbital com tubo capilar de vidro e este material foi utilizado para avaliar integridade hepática por meio das análises das aminotransferases aspartato-aminotransferase (AST) e alanina-aminotransferase (ALT), e da fosfatase alcalina (FA).

Posteriormente, realizou-se tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida da intervenção cirúrgica, que iniciou com uma laparotomia ventral média, exposição das alças intestinais para visualização da artéria aorta abdominal, da qual foi coletado sangue para realização de gasometria arterial. A análise dos gases arteriais foi feita através do analisador ABL 700 (RADIOMETER COPENHAGEN), pelo método de eletroiontoforese.

As dosagens séricas (Enzimas Hepáticas e Gasometria Arterial) foram realizadas no Laboratório Central da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Dando continuidade, foram retirados o fígado, o baço (somente para pesagem) e os pulmões sendo estes pesados para realização das relações hepatossomática, esplenossomática e pneumossomática, respectivamente, e, posteriormente, separados em 3 partes:

1º) Um pequeno fragmento do fígado e da porção anterior do lobo inferior do pulmão direito foram emergidos em Bouim por 12 horas e, após, em formol 10% para posterior análise histológica;

2º) Um pequeno fragmento do fígado e da porção anterior do lobo inferior do pulmão esquerdo foram emergidos em eppendorfs no gelo com solução tampão, sendo abrigados da luz, para posteriores análises de dano ao DNA através de Ensaio Cometa;

3º) O restante do fígado e do pulmão foram pesados e congelados a -80°C para posteriores análises de lipoperoxidação, enzimas antioxidantes e avaliação de nitritos e nitratos. O baço foi apenas pesado e, após, desprezado.

Por fim, foi coletado o osso fêmur da pata direita dos animais para posteriores análises de Micronúcleos.

3.6 Avaliações Bioquímicas

3.6.1 Preparação do Homogeneizado

Para homogeneizar o fígado e o pulmão, foram colocados 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 40 segundos, à temperatura de 0 a 4° C. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado em uma centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) por 10 min 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.

3.6.2 Dosagem de Proteína

A concentração de proteínas no homogeneizado de pulmão e fígado foi determinada, utilizando, como padrão, uma solução de albumina bovina 1mg/mL (utilizaram-se volumes de 50, 100 e 150 µL). Colocou-se uma alíquota do homogeneizado (20µL) em 780 µL de água destilada e 2,0 mL do reativo C que foi preparado com 50 ml de NaHCO₃, 0,5 mL do reativo B1 (CuSO₄.H₂O 1%) e 0,5 mL do reativo B2 (tartarato de sódio e potássio 2%). Após a adição do reativo C, aguardaram-se 10 minutos e colocou-se 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteau diluído na proporção 1:3 em água destilada. Após 30 minutos, realizou-se a medida em espectrofotômetro a 625 nm (Lowry, Rosebrough et al. 1951).

3.7 Determinação do Estresse Oxidativo

3.7.1 Determinação das Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

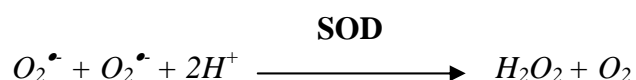
Foi determinada a lipoperoxidação através do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). A técnica de TBA-RS consiste no aquecimento do material homogeneizado na presença de ácido tiobarbitúrico e conseqüente formação de um produto de coloração rósea, medido em espectrofotômetro a 535nm. O aparecimento de coloração ocorre devido à presença do malondialdeído e 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%, 0,25mL de água destilada, 0,75mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 0,25mL 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, agitou-se cada tubo, os quais foram aquecidos à temperatura de 100° C durante 15 minutos. Após, 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).

3.7.2 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade desta enzima é definida por sua capacidade para inibir um sistema de detecção que reage com o $O_2^{\bullet-}$.

A reação catalisada é a seguinte:



A técnica de medida da SOD foi baseada na inibição dessa reação. Para isto, utilizou-se adrenalina que, no meio alcalino, transformou-se em adrenocromo, produzindo $O_2^{\bullet-}$ que é o substrato da enzima (Misra & Fridovich 1972). 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 μ L de adrenalina (60 mM, pH 2,0), esta corresponde a 100% da reação. 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).

3.7.3 Atividade da Enzima Catalase (CAT)

A enzima catalase catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, segundo a seguinte reação.



A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade enzimática e obedece a uma cinética de pseudo primeira 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 consistiu em colocar nas cubetas o meio de reação (solução reguladora de fosfato 50 mM) com distintas alíquotas da amostra. Depois, fez-se um gráfico com uma linha de base. Em seguida, adicionaram-se 20 µL de H₂O₂ 300 mM. A concentração foi expressa em pmol/g de tecido (Boveris & Chance 1973).

3.8 Medida de Nitritos e Nitratos

O NO é uma substância extremamente lábil, com uma meia vida de apenas alguns segundos em sistemas biológicos. Dessa forma, a medida do NO faz-se de forma indireta, através da medida de nitritos e nitratos.

Esse método consiste na transformação de nitratos e nitritos por meio da enzima nitrato redutase. Para isso, utiliza-se, posteriormente, o reativo de Griess.

Para realizar a técnica foram necessários 500 µl de amostra, 100 µl NADPH (0,2 mM), 70 µl Tris Buffer 1M, pH 7,5, 230 µl de uma mistura formada por 6P (50 mM) e glicose 6-fosfato desidrogenase (100 U/ml), 100 µl de nitrato redutase (10/ml), essa mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos.

Posteriormente utilizaram-se 750 µl dessa mistura e adicionaram-se 750 µl do reativo de Griess, incubando-a novamente, à temperatura ambiente, durante 10 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).

3.9 Avaliação do Dano ao DNA

3.9.1 Ensaio Cometa

Foi utilizada a versão alcalina do ensaio cometa, utilizando sangue total, fígado e pulmão dos animais tratados e controles. Um pedaço de cada tecido foi colocado em *eppendorf* contendo solução tamponada (PBS) pH 7.4 gelada e fragmentado com auxílio de uma pinça para obtenção de suspensão celular. O sangue foi coletado em *eppendorfs* heparinizados. As amostras de tecido em suspensão (10 µl) e o sangue (5 µl) foram misturados com uma fina camada de agarose *low melting* 0,75% (95 µl) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal à 1,5%; estas lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% DMSO na hora do uso), por, no mínimo, 1 hora até, no máximo, 72 horas a 4°C, para o rompimento das membranas celulares. A lise celular permitiu a migração dos fragmentos de DNA que foi realizada após a incubação das lâminas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13) por 20 minutos e subsequente aplicação de uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) por 15 minutos às células lisadas sobre as lâminas para microscopia em uma cuba de eletroforese de DNA. As lâminas foram neutralizadas logo após a eletroforese com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5 e coradas com solução de coloração com prata. Os resultados

foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD). O ID foi obtido pela avaliação visual das classes de dano (de 0 – 4), extraindo-se um índice que expressa o dano geral sofrido por uma população de células; os núcleos intactos aparecem redondos (classe 0 – sem dano), já nas células lesadas, o DNA livre migra do núcleo em direção ao ânodo, durante a eletroforese, mostrando uma “cauda” de fragmentos sedimentados, semelhante a um cometa e são classificados entre classes 1 (dano mínimo) a 4 (dano máximo). A FD foi calculada baseada no número de células com cauda versus aquelas sem cauda (Speit & Hartmann 1999; Tice, Agurell et al. 2000; Picada, Flores et al. 2003).

3.9.2 Micronúcleos

Após o sacrifício do animal, uma amostra de medula óssea foi coletada de um dos fêmures. O fêmur foi retirado e limpo com auxílio de tesoura e pinça de dissecação, e papel toalha absorvente áspero. A extremidade final proximal do fêmur foi cortada para expor o canal da medula. Uma agulha histológica foi inserida firmemente na abertura do fêmur, para possibilitar que a medula fosse extraída e misturada a uma gota de soro fetal bovino, previamente colocada sobre uma das extremidades de uma lâmina de microscopia codificada. Com auxílio de uma espátula curva, a amostra de medula óssea foi homogeneizada no soro, obtendo-se uma suspensão de células. Foi realizado esfregaço da suspensão celular sobre a lâmina com auxílio de uma outra lâmina inclinada num ângulo de 45°. Foram preparadas duas lâminas por animal. Após secagem da preparação por, aproximadamente, 30 min, as lâminas foram tratadas com metanol à temperatura ambiente por 10 min para fixação do material biológico. Após secagem por 30 min, foi realizada a coloração utilizando corante de Giemsa (Merck) em tampão fosfato 0.2M, pH 5.8 (proporção de 1:9). Após 7 minutos nesta solução de coloração, as lâminas foram enxaguadas em água destilada, secadas e guardadas em caixas

de lâminas até a análise. Para contagem dos eritrócitos normocromáticos (ENC), eritrócitos policromáticos (EPC) e micronúcleos no EPC, foi utilizado microscópio ótico com objetiva de imersão. Pelo menos 2000 EPC foram analisados por animal. A relação EPC/ENC também foi determinada pela avaliação da frequência de EPC em 1000 eritrócitos de cada animal (MacGregor, Heddle et al. 1987; Mavournin, Blakey et al. 1990; Picada, da Silva et al. 1997).

3.10 Avaliação Anatomopatológica dos Tecidos

O teste anatomopatológico foi realizado no laboratório de patologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre por um patologista.

Para a dissecação anatômica do fígado e do pulmão direito, seccionaram-se todas as demais estruturas, obtendo-se pulmão e fígado que foram incluídos em blocos de parafina.

Na etapa seguinte, os blocos de parafina foram fixados ao Micrótopo (Leitz® 1512) onde se realizaram cortes com 3 micra (3 μ). Na fase de coloração, as lâminas foram mergulhadas nos corantes hematoxilina-eosina durante 5 minutos cada uma, intermediadas por um banho de água corrente. Somente o fígado recebeu coloração de picrossírios. 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 em microscópio binocular *Nikon Labophot* nos diferentes aumentos.

3.11 Análise Estatística

A partir dos dados coletados, as médias e os erros padrões das médias de cada grupo foram calculadas, utilizando para análise estatística o software SigmaPlot, versão 5.0 para Windows XP2000. Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Student-Newman-Keuls, sendo o nível de significância adotado de 5% ($P < 0,05$).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

A apresentação dos resultados segue a seguinte ordem no modelo experimental utilizado nesta pesquisa:

1. Verificação da integridade hepática através dos níveis séricos das aminotransferases aspartato (AST) e alanina (ALT), e da fosfatase alcalina (FA);
2. Avaliação das alterações do peso do fígado, do baço e do pulmão dos animais em relação ao seu peso corporal total (relações hepatossomática, esplenossomática e pneumossomática, respectivamente);
3. Verificação das alterações na difusão dos gases através de Gasometria Arterial (PaO₂ – pressão parcial de oxigênio arterial, PaCO₂ – pressão parcial de gás carbônico arterial, pH – Potencial de Hidrogênio e SatO₂/Hb- saturação de oxigênio da hemoglobina), bem como a diferença alvéolo-arterial de O₂;
4. Avaliação dos efeitos da SHP e das substâncias antioxidantes na oxidação de lipídios nos tecidos hepático e pulmonar, mediante a determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);

5. Quantificação da atividade enzimática antioxidante nos tecidos hepático e pulmonar nos diferentes grupos através da medida das concentrações das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx);
6. Avaliação dos metabólitos do NO (Nitritos e Nitratos) nos tecidos hepático e pulmonar;
7. Avaliação de danos ao DNA no modelo de cirrose biliar secundária e da ação da quercetina como agente genotóxico/antigenotóxico, utilizando o teste de micronúcleos e o ensaio cometa;
8. Análise dos efeitos do flavonóide quercetina sobre os tecidos hepático e pulmonar através da determinação dos aspectos histológicos pelas técnicas de picrossírius e hematoxilina & eosina.

4.1 Avaliação da Integridade Hepática

Na **tabela 1**, observamos os resultados das enzimas séricas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA) expressas em U/L.

Tabela 1. Valores médios das enzimas plasmáticas: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA).

Enzimas Plasmáticas	Grupos Experimentais			
	CO+V	CO+Q	CBS+V	CBS+Q
AST (U/L)	95,67 ± 10,34	66,44 ± 2,26	510,6 ± 46,78 _a	146,9 ± 23,44
ALT (U/L)	65,78 ± 9,02	38,44 ± 2,51	127,5 ± 13,03 _a	52,8 ± 9,36
FA (U/L)	156,00 ± 16,62	143,33 ± 9,23	386,8 ± 27,71 _a	218,9 ± 42,73

Os resultados acima são expressos como a média ± erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem n=9 animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa do grupo CBS+V em relação aos grupos CO+V, CO+Q e CBS+V (P<0,001)

Nota-se aumento significativo das enzimas AST, ALT e FA nos animais com cirrose biliar secundária em relação a todos os demais grupos: controle+veículo (CO+V), controle+quercetina (CO+Q) e cirrose biliar secundária+quercetina (CBS+Q), demonstrando que, quando os animais cirróticos receberam tratamento com o antioxidante quercetina (CBS+Q), houve diminuição significativa dessas enzimas em relação ao grupo não-tratado (CBS+V), sendo P<0,001.

4.2 Gasometria Arterial

Na **tabela 2**, verifica-se parte da Gasometria arterial (PaO_2 mmHg, PCO_2 mmHg, pH e SaO_2/Hb %) dos animais nos diferentes grupos.

Tabela 2. Valores médios da pressão parcial de oxigênio (PaO_2), pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2), potencial de hidrogênio (pH) e Saturação da Hemoglobina (SaO_2/Hb).

	Grupos Experimentais			
	CO+V	CO+Q	CBS+V	CBS+Q
PO₂ (mmHg)	87,67 ± 6,84	85,67 ± 7,49	53,6 ± 4,97 ^{a,b}	73,05 ± 6,99
PCO₂ (mmHg)	49,50 ± 1,76	51,44 ± 4,27	62,7 ± 2,52 ^a	60,83 ± 2,90
pH	7,34 ± 0,01	7,32 ± 0,03	7,3 ± 0,01	7,25 ± 0,03 ^c
SaO₂/Hb %	94,89 ± 0,90	93,11 ± 2,12	71,1 ± 5,09 ^{b,d}	86,17 ± 5,04

Os resultados acima são expressos como a média ± erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem n=9 animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa do grupo CBS+V em relação aos grupos CO+V e CO+Q (P<0,01)

^b – diferença significativa do grupo CBS+V em relação ao grupo CBS+Q (P<0,05)

^c – diferença significativa do grupo CBS+Q em relação ao grupo CO+V (P<0,05)

^d – diferença significativa do grupo CBS+Q em relação ao grupo CO+V e CO+Q (P<0,001)

Em relação à PaO_2 , observa-se diferença significativa do grupo de animais cirróticos (CBS+V) em relação aos grupos controles (CO+V e CO+Q), sendo P<0,01 e da mesma forma do grupo de animais cirróticos tratados com Quercetina (CBS+Q) quando comparados ao grupo não-tratado (CBS+V), com P< 0,05.

Na análise da PCO_2 nota-se diferença significativa do grupo CBS+V em relação aos CO+V e CO+Q, sendo $P < 0,01$ e não houve diferença estatística entre o grupo cirrótico não-tratado (CBS+V) e o grupo submetido à administração da Quercetina (CBS+Q).

No potencial de hidrogênio (pH), observa-se diminuição significativa no grupo cirrótico tratado com a quercetina (CBS+Q) em relação ao grupo controle (CO+V), com $P < 0,05$.

Já na saturação da hemoglobina ($SatO_2/Hb$), observa-se diminuição significativa no grupo cirrótico não-tratado (CBS+V) em relação aos grupos controles (CO+V e CO+Q), sendo $P < 0,001$ e também em relação ao grupo tratado (CBS+Q) com $P < 0,05$.

Na **figura 17**, é demonstrada a diferença alvéolo-arterial de Oxigênio. Observa-se aumento significativo dessa diferença no grupo cirrótico não-tratado (CBS+V) em relação a todos os demais grupos controles e cirrótico tratado com quercetina (CO+V, CO+Q e CBS+Q), sendo $P < 0,001$.

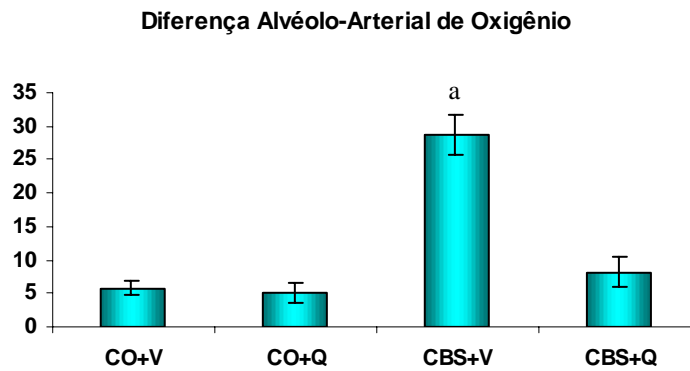


Figura 17. Diferença alvéolo-arterial de oxigênio nos diferentes grupos. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem n=9 animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa do grupo CBS+V em relação aos grupos CO+V, CO+Q e CBS+V ($P < 0,001$).

4.3 Relações Hepatossomática, Esplenossomática e Pneumossomática

Nas **figuras 18, 19 e 20**, estão expressas em porcentagem as relações dos pesos do fígado, do baço e do pulmão dos animais dos diferentes grupos em relação ao seu peso corporal total (100%), sendo descritas, respectivamente, de relação hepatossomática, esplenossomática e pneumossomática.

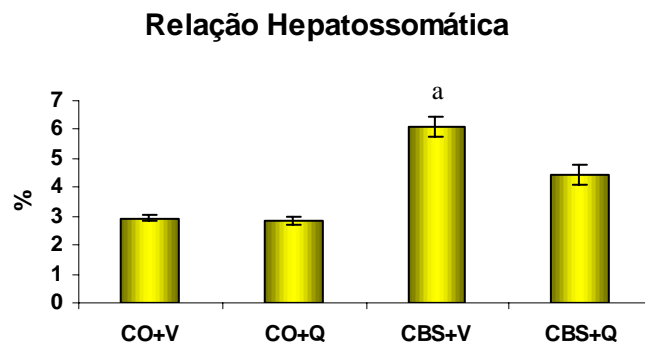


Figura 18. Relação hepatossomática dos animais nos diferentes grupos. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem n=9 animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa do grupo CBS+V em relação aos grupos CO+V, CO+Q e CBS+V ($P < 0,001$).

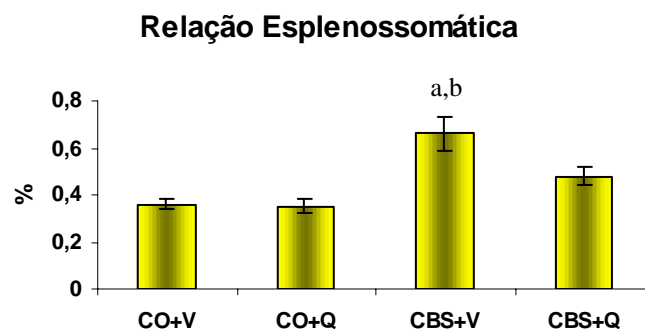


Figura 19. Relação esplenossomática dos animais nos diferentes grupos. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem n=9 animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa do grupo CBS+V em relação aos grupos CO+V e CO+Q ($P < 0,001$).

^b – diferença significativa do grupo CBS+V em relação ao grupo CBS+Q ($P < 0,05$).

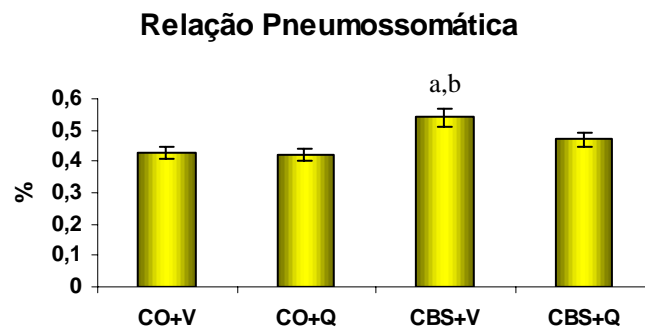


Figura 20. Relação pneumossomática dos animais nos diferentes grupos. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem n=9 animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa do grupo CBS+V em relação aos grupos CO+V e CO+Q ($P < 0,01$).

^b – diferença significativa do grupo CBS+V em relação ao grupo CBS+Q ($P < 0,05$).

Observamos aumento significativo tanto no peso do fígado, quanto no peso do baço e do pulmão, no grupo cirrótico (CBS+V), quando comparados aos grupos controles (CO+V e CO+Q), e uma redução significativa do peso destes órgãos no grupo de animais com cirrose biliar secundária tratados com a Quercetina (CBS+Q).

4.4 Determinação da Lipoperoxidação nos Tecidos Hepático e Pulmonar

Os valores de lipoperoxidação no tecido hepático, vistos na **figura 21**, avaliados através do método das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), demonstram aumento significativo no grupo cirrótico (CBS+V) em relação a todos os demais grupos, sendo $P < 0,01$ em relação aos grupos controle e cirrótico tratados com quercetina (CO+Q e CBS+Q) e $P < 0,001$ em relação ao grupo controle (CO+V). Não houve diferença significativa entre o grupo CBS+Q quando comparados aos grupos controle (CO+V e CO+Q). Observou-se

aumento da lipoperoxidação de, aproximadamente, três vezes no grupo CBS+V, quando comparado aos grupos controle e cirrótico que recebeu tratamento com a quercetina, denotando-se redução da lipoperoxidação hepática nesses animais submetidos à administração do flavonóide quercetina.

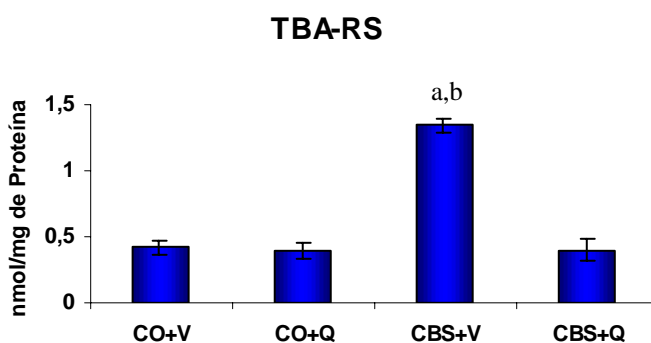


Figura 21. Valores médios de TBA-RS no fígado dos diferentes grupos estudados. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem n=9 animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa do grupo CBS+V em relação aos grupos CO+Q e CBS+Q ($P<0,01$).

^b – diferença significativa do grupo CBS+V em relação ao grupo CO+V ($P<0,001$).

Na avaliação da lipoperoxidação no tecido pulmonar, demonstrada na **figura 22**, observou-se aumento significativo no tecido pulmonar do grupo cirrótico que recebeu apenas veículo (CBS+V) em relação ao grupo cirrótico submetido ao tratamento com quercetina (CBS+Q), com $P<0,05$, e da mesma forma em relação aos grupos controles (CO+V e CO+Q), sendo $P<0,01$, denotando-se o efeito da quercetina sobre a diminuição da LPO no tecido pulmonar de animais cirróticos tratados.

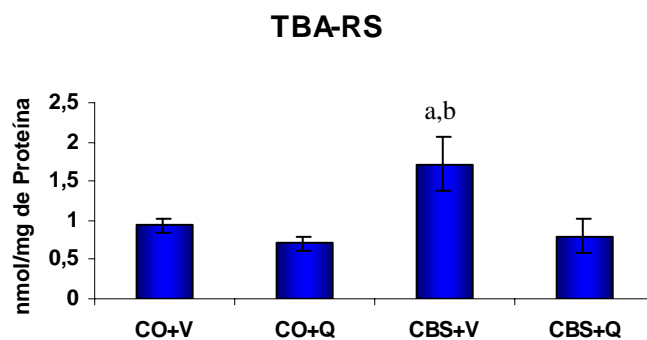


Figura 22. Valores médios de TBA-RS no pulmão dos diferentes grupos estudados. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem $n=9$ animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa do grupo CBS+V em relação aos grupos CO+V e CO+Q ($P<0,01$).

^b – diferença significativa do grupo CBS+V em relação ao grupo CBS+Q ($P<0,05$).

4.5 Atividade da Enzima Antioxidante Superóxido Dismutase (SOD)

Na **figura 23**, são apresentados os resultados da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no homogeneizado de fígado. Observa-se diminuição de 60% da atividade da enzima no grupo cirrótico (CBS+V), quando comparados com os grupos controles (CO+V, CO+Q) e ao o grupo cirrótico tratado com quercetina (CBS+Q), sendo $P<0,01$, no qual a atividade da enzima praticamente retorna aos valores dos grupos controle.

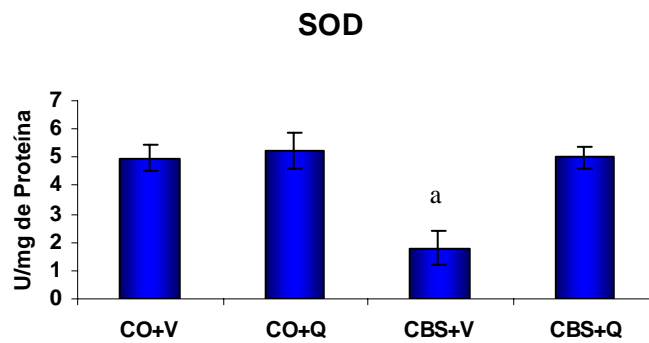


Figura 23. Valores médios da atividade da enzima antioxidante SOD no fígado dos diferentes grupos estudados. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem n=9 animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa do grupo CBS+V em relação aos grupos CO+V, CO+Q e CBS+Q ($P < 0,01$).

Na avaliação da atividade da enzima SOD em homogeneizado de pulmão, demonstrada na **figura 24**, observa-se diferença altamente significativa do grupo cirrótico (CBS+V) em relação aos demais grupos, com diminuição de, aproximadamente, 70% da atividade da enzima neste grupo em relação aos grupos controle (CO+V e CO+Q) e cirrótico tratado (CBS+Q), sendo $p < 0,001$. Dessa forma, o grupo cirrótico submetido ao tratamento com quercetina (CBS+Q) apresentou aumento de 70% na atividade da enzima, quando comparado com o grupo cirrótico (CBS+V), no qual foi realizada apenas a administração do veículo NaCl.

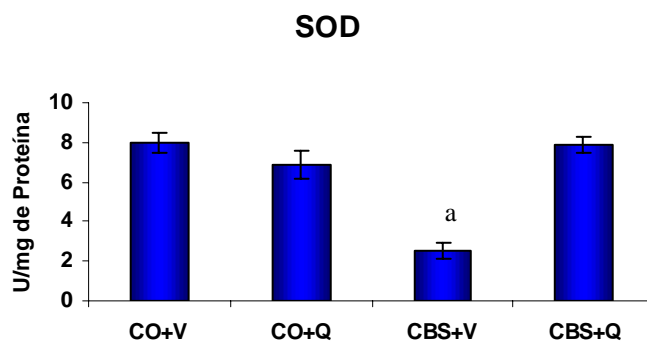


Figura 24. Valores médios da atividade da enzima antioxidante SOD no pulmão dos diferentes grupos estudados. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem n=9 animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa do grupo CBS+V em relação aos grupos CO+V, CO+Q e CBS+Q ($P < 0,001$).

4.6 Atividade da Enzima Antioxidante Catalase (CAT)

Na **figura 25**, são observados os valores da atividade da enzima catalase no homogeneizado de fígado de ratos controles e cirróticos, com e sem tratamento com Quercetina. A catalase apresenta atividade significativamente aumentada no grupo cirrótico (CBS+V), mostrando diferença quando comparada aos grupos controle (CO+V e CO+Q) e ao grupo cirrótico que recebeu tratamento com quercetina (CBS+Q). Na **figura 26**, são apresentados os valores resultantes da enzima catalase (CAT) no homogeneizado de pulmão de ratos controles e cirróticos com e sem tratamento com quercetina, nos quais não foi observado diferença significativa nos grupos avaliados.

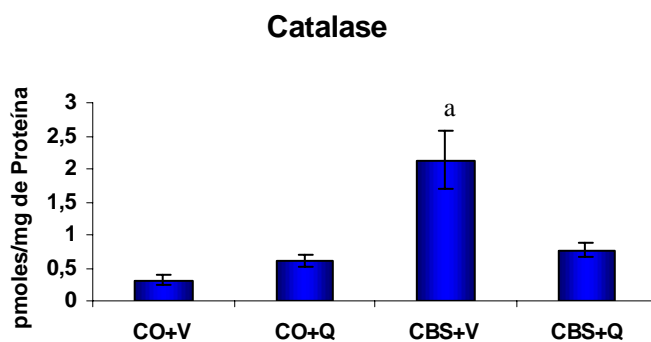


Figura 25. Valores médios da atividade da enzima antioxidante CAT no fígado dos diferentes grupos estudados. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem n=9 animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa do grupo CBS+V em relação aos grupos CO+V, CO+Q e CBS+Q (P<0,001).

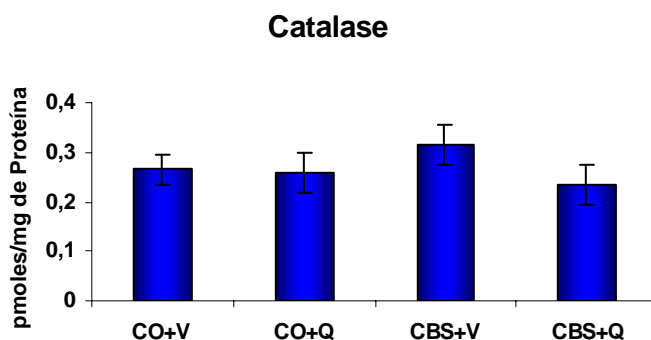


Figura 26. Valores médios da atividade da enzima antioxidante CAT no pulmão dos diferentes grupos estudados. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem n=9 animais. Não houve diferença significativa nos grupos comparados.

4.7 Avaliação da Produção de Óxido Nítrico (NO) através de Nitratos

Totais

Na **figura 27**, observamos os valores referentes aos nitratos totais no homogeneizado de fígado dos animais controles e cirróticos com e sem tratamento com Quercetina. Observa-se diminuição significativa dos nitratos totais nos grupos cirrótico (CBS+V) em relação aos

grupos controles (CO+V e CO+Q), sendo P, respectivamente, $<0,001$ e $P<0,01$ e também em relação ao grupo cirrótico tratado com quercetina (CBS+Q), com $P<0,05$. Nota-se ainda diferença significativa do grupo CBS+Q em relação ao grupo CO, sendo $P<0,05$.

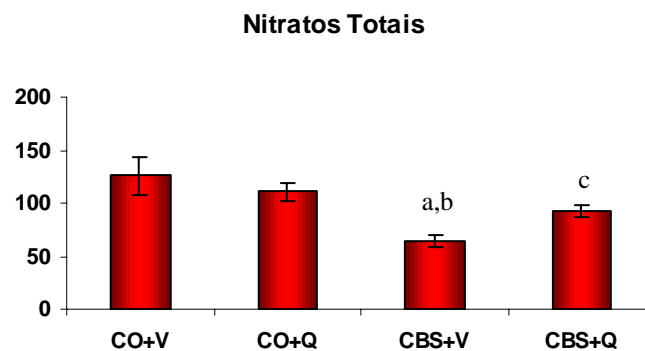


Figura 27. Valores de nitratos totais no homogeneizado de fígado dos diferentes grupos estudados. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem $n=9$ animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa do grupo CBS+V em relação aos grupos CO+V e CO+Q ($P<0,001$ e $P<0,01$ respectivamente).

^b – diferença significativa do grupo CBS+V em relação ao grupo CBS+Q ($P<0,05$).

^c – diferença significativa do grupo CBS+Q em relação ao grupo CO+V ($P<0,05$).

Observamos, na **figura 28**, os valores resultantes de nitratos totais no homogeneizado de pulmão de ratos controles e cirróticos com e sem tratamento com Quercetina. Nota-se diferença altamente significativa ($p<0,001$) no grupo cirrótico (CBS+V) em relação a todos os demais grupos (CO+V, CO+Q e CBS+Q).

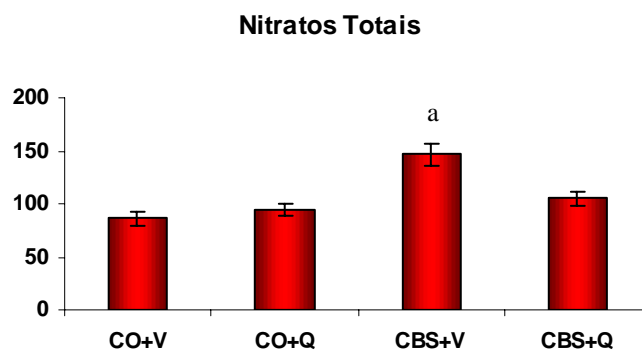


Figura 28. Valores de nitratos totais no homogeneizado de pulmão dos diferentes grupos estudados. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem n=9 animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa do grupo CBS+V em relação aos grupos CO+V, CO+Q e CBS+Q ($P < 0,001$).

4.8 Avaliação do Efeito Genotóxico da Quercetina dos Testes de Micronúcleos e o Ensaio Cometa

Na **tabela 3**, observam-se os resultados do Teste de Micronúcleos nos diferentes grupos estudados.

Tabela 3. Resultados do Teste de Micronúcleos

Grupos								
EPC/ENC								
	Resultados Individuais							Média ± DP
CO+V	2.8	2.6	1.6	2.0	1.9	2.1	-	2.1±0.5
CO+Q	2.1	1.8	3.0	2.9	2.5	2.5	-	2.5±0.4
CBS+V	2.5	2.2	1.7	1.7	1.5	2.6	2.5	2.1±0.5
CBS+Q	1.3	2.0	2.3	1.6	1.8	1.7	2.3	1.8±0.4
Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em 2000 EPC								
	Resultados Individuais							Média ± DP
CO+V	12	16	11	12	16	12	-	13.2±2.2
CO+Q	12	11	13	13	12	15	-	12.7±1.4
CBS+V	42	30	56	50	42	28	29	39.6±11.0 ^a
CBS+Q	22	45	29	30	22	26	23	28.2±8.1 ^{b,c}

Os resultados acima são expressos como a média ± desvio padrão da média (DPM), sendo que cada grupo tem n=9 animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa do grupo CBS+V em relação aos grupos CO+V e CO+Q (P<0,001)

^b – diferença significativa do grupo CBS+Q em relação aos grupos CO+V e CO+Q (P<0,01)

^c – diferença significativa do grupo CBS+Q em relação ao grupo CBS+V (P<0,05)

Não foi detectada toxicidade quando analisada a relação EPC/ENC em todos os grupos (**Tabela 3** – parte superior). Houve aumento na frequência dos micronúcleos no grupo cirrótico (CBS+V), quando comparado ao grupo controle (CBS+V). No grupo controle que recebeu quercetina (CBS+Q) observa-se resposta similar ao grupo controle que recebeu apenas o veículo (CBS+V). Nos ratos cirróticos tratados com quercetina (CBS+Q) denota-se um decréscimo significativo (P<0,05) na frequência de micronúcleos em relação ao grupo cirrótico não-tratado (CBS+V).

Na **tabela 4**, observam-se os resultados do Ensaio Cometa nos diferentes grupos estudados nos tecidos hepático, pulmonar e no sangue.

Tabela 4. Resultados do Ensaio Cometa

<i>Tecido</i>	<i>Grupo</i>	<i>Índice de Dano</i>	<i>Frequência de Dano</i>
Fígado	CO+V	15.6±3.7	11.2±2.8
	CO+Q	39.9±22.1*** ^b	27.9±15.7*** ^b
	CBS+V	116.3±38.8*** ^a	65.9±21.4*** ^a
	CBS+Q	31.7±15.7*** ^b	20.8±10.0*** ^b
Pulmão	CO+V	31.2±16.2	22.6±12.2
	CO+Q	40.7±10.7** ^b	29.0±9.1** ^b
	CBS+V	93.1±39.0** ^a	60.0±20.6*** ^a
	CBS+Q	35.7±19.1*** ^b	26.0±12.6*** ^b
Sangue	CO+V	6.1±3.9	5.9±3.5
	CO+Q	7.6±6	6.0±2.8
	CBS+V	6.4±3	5.4±3.5
	CBS+Q	4.7±1.4	4.6±1.5

Os resultados acima são expressos como a média ± desvio padrão da média (DPM), sendo que cada grupo tem n=9 animais. Índice de Dano: 0 (completamente sem dano, 100 células x 0) a 400 (com dano máximo 100 x 4); Frequência de Dano (%): foi calculada baseada no número de células com cauda vs. aquelas sem cauda. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa em relação ao grupo CO+V

^b – diferença significativa em relação ao grupo CBS+V

Diferença de significância: *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Os dados do Ensaio Cometa mostram aumento significativo do dano ao DNA no fígado e no pulmão, mas não no sangue dos animais cirróticos não-tratados (CBS+V), demonstrado pelo Índice de Dano (ID) e pela Frequência de Dano (FD), em comparação com os ratos do grupo não-cirrótico (CO+V). No grupo controle tratado com quercetina não foi evidenciado aumento do dano ao DNA significativo em comparação com o grupo controle que recebeu apenas veículo (CO+V) em nenhum dos três tecidos analisados. Nos animais cirróticos tratados com quercetina, nota-se redução do dano ao DNA, quando comparados ao grupo de animais cirróticos sem tratamento (CBS+V), em ambos os tecidos, fígado e pulmão.

4.9 Avaliação Histopatológica

A histopatologia foi realizada por meio de coloração de hematoxilina-eosina e picrosírius dos animais controle (CO+V), animais com cirrose biliar secundária (CBS+V) e animais com cirrose biliar secundária tratados com quercetina (CBS+Q).

Na **figura 29 A e B**, a fotomicrografia do fígado do grupo controle mostra a estrutura lobular hepática normal.

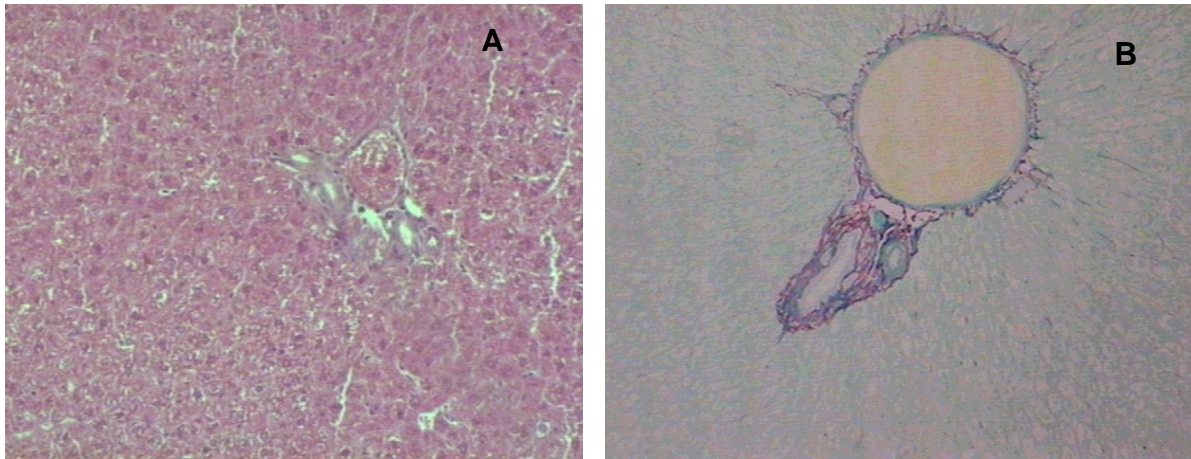


Figura 29. Fotomicrografia de fígado de animais do grupo controle (CO+V) com coloração de (A) hematoxilina-eosina (100x) e (B) picrosírius (100x), mostrando a estrutura lobular hepática.

Na **figura 30 A e B**, observa-se a fotomicrografia do fígado do grupo cirrótico (CBS+V) mostrando alterações no parênquima hepático com presença de nódulos regenerativos, necrose celular e presença de fibrose.

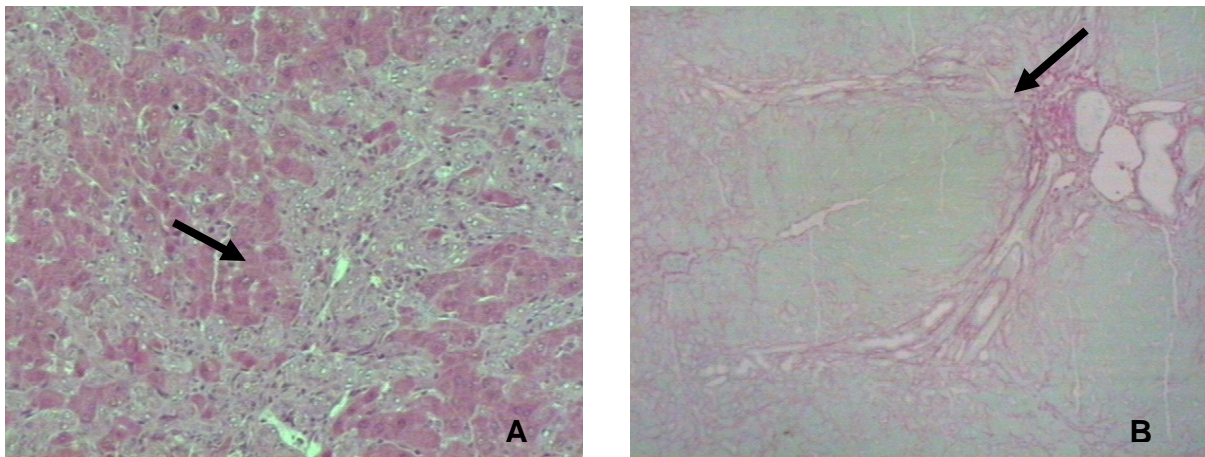


Figura 30. Fotomicrografia de fígado de animais do grupo cirrótico (CBS+V) com coloração de (A) hematoxilina-eosina (100x) e (B) picrosírius (100x) mostrando alterações no parênquima hepático, com presença de nódulos regenerativos, necrose e fibrose.

Na **figura 31 A e B**, apresenta-se a fotomicrografia do fígado do grupo cirrótico tratado com Quercetina (CBS+Q), na qual observa-se a redução dos nódulos de fibrose.

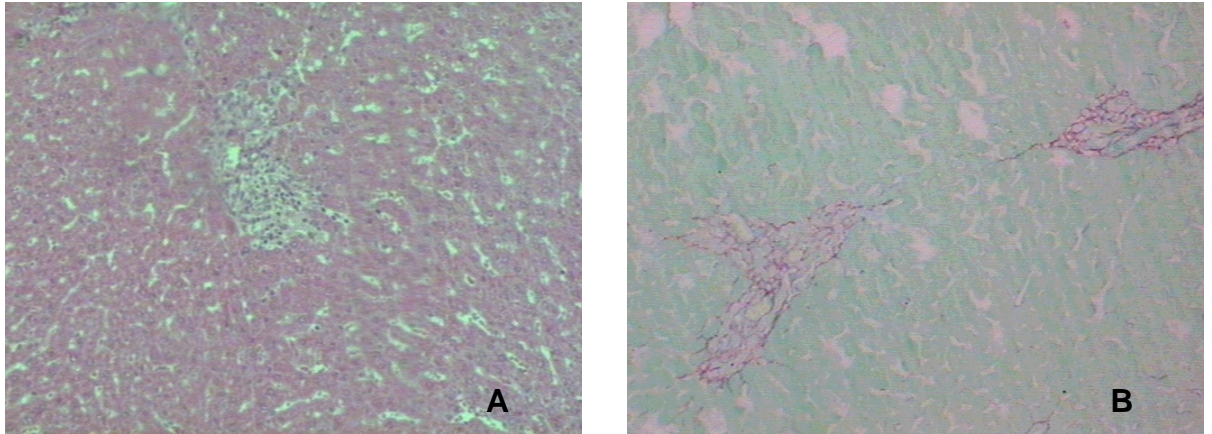


Figura 31. Fotomicrografia de fígado de animais do grupo cirrótico tratado com Quercetina (CBS+Q) com coloração de (A) hematoxilina-eosina (100x) e (B) picrossírius (100x) mostrando ausência de fibrose e nódulos.

Na **figura 32**, a fotomicrografia do pulmão de animais controle avaliado por hematoxilina-eosina evidenciou arquitetura normal do parênquima pulmonar e diâmetro normal dos vasos sem acúmulo de hemácias no seu interior.

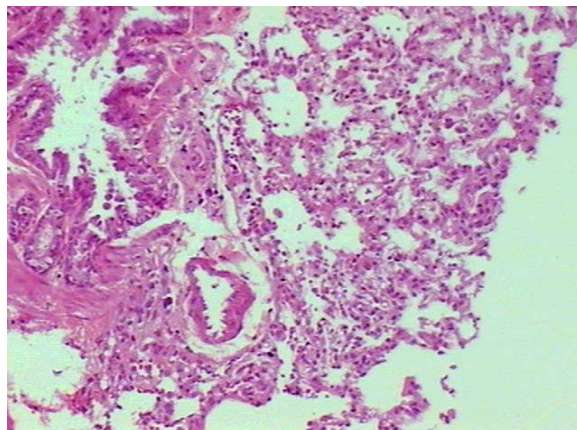


Figura 32. Fotomicrografia de pulmão de animais do grupo controle (CO+V) com coloração de hematoxilina-eosina mostrando a estrutura normal do parênquima pulmonar (200x).

A **figura 33 A e B** mostra a fotomicrografia do pulmão de ratos cirróticos (CBS+V) por hematoxilina-eosina. Observa-se aumento do diâmetro do vaso e estase sangüínea no seu interior, demonstrada pelo acúmulo de hemácias.

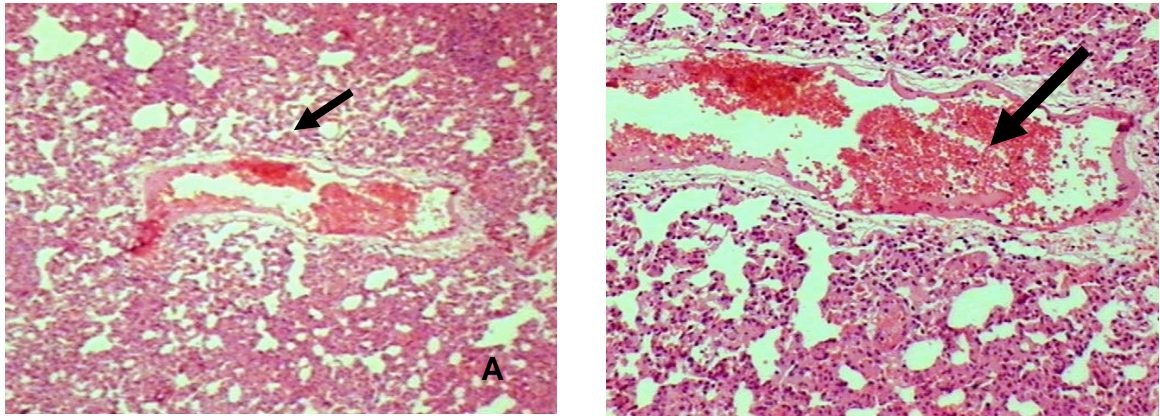


Figura 33. Fotomicrografia de pulmão de animais do grupo cirrótico (CBS+V) com coloração de hematoxilina-eosina mostrando alterações no parênquima como vasodilatação e estase sangüínea (A. 40x; B. 200x).

A **figura 34** mostra a fotomicrografia do pulmão de ratos cirróticos tratados com quercetina, na qual se nota redução da vasodilatação e da estase sangüínea.

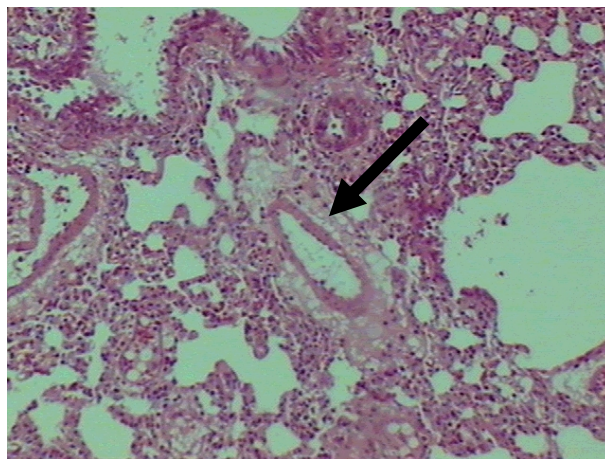


Figura 34. Fotomicrografia de pulmão de animais do grupo cirrótico tratado com Quercetina (CBS+Q) com coloração de hematoxilina-eosina mostrando redução da vasodilatação e ausência da estase sangüínea sem evidência de acúmulo de hemáceas no centro do vaso (200x).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A associação entre a disfunção pulmonar e a doença hepática foi reconhecida há mais de 100 anos, porém o termo Síndrome Hepatopulmonar foi utilizado após 1977, para conceituar as alterações vasculares pulmonares relacionadas com doenças hepáticas, no caso, a cirrose biliar secundária (Kennedy & Knudson 1977).

Recentemente, o modelo de ligadura de ducto biliar comum em ratos tem sido reconhecido como sendo o modelo experimental capaz de reproduzir as alterações clínicas observadas nessa doença em humanos (Lee 1989; Fallon, Abrams et al. 1997; Tieppo & Vercelino 2003; Lee, Yoon et al. 2004).

Nesse trabalho foi utilizado o modelo de ligadura de ducto biliar comum (LDBC) para avaliar o potencial antioxidante do flavonóide quercetina sobre as alterações hepáticas e pulmonares, na tentativa de correlacionar esses achados na Síndrome Hepatopulmonar humana.

Foram avaliadas a integridade hepática, as alterações na difusão de gases, as relações do peso dos órgãos com o peso corporal total, a lipoperoxidação, enzimas antioxidantes, nitratos

totais, dano ao DNA e os achados anatomopatológicos em fígado e pulmão de ratos cirróticos com SHP.

Na avaliação da integridade hepática (**Tabela 1**) através das enzimas séricas AST, ALT e FA observamos aumento significativo delas no grupo com cirrose biliar secundária (CBS+V) por ligadura de ducto biliar comum em relação a todos os demais grupos ($P < 0,001$).

As enzimas AST e ALT que catalisam a transferência do grupo α -amino do ácido aspártico e da alanina para o grupamento de α -ceto do cetoglutarato, com formação de ácido oxalacético e pirúvico, respectivamente, e atuam na gliconeogênese, facilitam a síntese de glicose a partir de outras fontes que não carboidratos. Dessa forma, por estarem diretamente relacionadas à lesão e necrose celular de tecidos ricos em ALT e AST, ou ainda a alterações da permeabilidade da membrana celular do hepatócito, ocorre liberação e elevação dos valores enzimáticos na corrente sanguínea, em alterações hepáticas estabelecidas (Brandão & Marroni 2001).

Fosfatase alcalina é um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ortofosfatos em pH alcalino originando fosfato inorgânico e radicais inorgânicos e se encontra em níveis elevados no grupo cirrótico por LDBC em relação aos demais grupos estudados.

A elevação dos níveis séricos da FA em pacientes com doença hepatobiliar é secundária à síntese da enzima no fígado e sua posterior liberação no soro. Os ácidos biliares induzem à síntese de fosfatase alcalina que, por sua vez, atua na membrana do hepatócito levando à ruptura de organelas hepáticas e tornando solúvel a FA ligada às membranas (Fan, Ng et al. 1999). A dosagem sanguínea de FA é o exame mais comumente solicitado para identificar a

presença de colestase em pacientes com enfermidade hepatobiliar ocasionada pela obstrução do fluxo biliar (Santos, Zucoloto et al. 1998).

Nossos achados, em relação à integridade hepática e obstrução do fluxo biliar, estão de acordo com trabalhos de outros autores que fizeram uso do modelo de LDBC, indicando o comprometimento hepático e a fidelidade deste modelo animal (Pastor, Collado et al. 1997; Peres, Tunon et al. 2000; Zhang, Katsuta et al. 2003; Montero, Quireze et al. 2005; Vercelino & Marroni 2005).

Os animais cirróticos por LDBC submetidos à administração da quercetina tiveram diminuição da atividade de todas as enzimas séricas avaliadas, mostrando que o flavonóide quercetina, através de seu potencial antioxidante, possui uma ação hepatoprotetora sobre o fígado. Esses dados também foram mostrados por Peres e colaboradores, em 2003, no mesmo modelo animal e no uso deste flavonóide. Em outro estudo, Pavanatto e colaboradores, em 2004, utilizando o modelo de cirrose induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄), obtiveram efeitos similares aos nossos achados na avaliação destas enzimas após o uso do flavonóide quercetina em ratos.

Doenças crônicas do fígado, especialmente a cirrose, podem estar associadas com hipoxemia arterial, que resulta da combinação de alterações na relação ventilação-perfusão de “shunts” pela dilatação vascular intrapulmonar (Dal palu, Donaggio et al. 1968; Andersen, Gordon et al. 1982).

No diagnóstico da SHP, a hipoxemia arterial, constatada pela gasometria arterial, é um achado fundamental. Os estudos apontam para um considerável desarranjo estrutural na

microcirculação pulmonar, suficiente para permitir a passagem de sangue venoso misto para as veias pulmonares, que é representado pela disseminada vasodilatação pré-capilar no leito vascular pulmonar, próximo às áreas de trocas gasosas, permitindo diminuição nas concentrações de gases arteriais (Lima, Martinelli et al. 2004). O diâmetro normal dos capilares é de, aproximadamente, 8 a 15 μm , podendo chegar a 500 μm nos pacientes com Síndrome Hepatopulmonar (Chiesa, Ciappi et al. 1969; Schraufnagel & Kay 1996).

Em pacientes cirróticos com suspeita de SHP, a análise gasométrica deve apresentar valores de PaO_2 menores que 80mmHg, saturação de hemoglobina (SaO_2/Hb) inferior ou igual a 92% (Krowka and Cortese 1990; Krowka, Tajik et al. 1990) e valores de PCO_2 em torno de 30mmHg (Martinez, Barbera et al. 1999) indicando possível diagnóstico de SHP.

Na análise da gasometria arterial (**Tabela 2**), observamos diminuição significativa da pressão parcial de oxigênio (PO_2) e aumento significativo da pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2) nos ratos cirróticos, demonstrando alteração na difusão de gases neste modelo. Esses dados confirmam os achados de diversos autores que utilizaram o mesmo modelo para avaliar as alterações pulmonares associadas à cirrose, e esta hipoxemia está relacionada à vasodilatação intrapulmonar ocasionada por aumento da produção de substâncias vasodilatadoras no endotélio pulmonar, em especial, o óxido nítrico (NO) (Fallon, Abrams et al. 1997; Nunes, Lebrec et al. 2001; Zhang, Katsuta et al. 2003; Fallon 2005; Tieppo, Vercelino et al. 2005; Vercelino & Marroni 2005) .

A saturação da hemoglobina (SatO_2/Hb) (**Tabela 2**) mostrou-se diminuída nos ratos cirróticos em relação a todos os demais grupos. Isso se deve, provavelmente, ao aumento do PCO_2 , juntamente com a diminuição do pH, mesmo não sendo significativo em relação aos

grupos controle. Essas duas variáveis proporcionam alterações no desvio da curva de dissociação da hemoglobina para a direita, diminuindo a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, e favorecendo a dessaturação da mesma (West 2001).

Entretanto, nos animais cirróticos que receberam tratamento com a quercetina, notou-se aumento da PO_2 e da $SatO_2/Hb$ aproximando-se dos valores encontrados nos animais controle. Tais achados mostram que a quercetina, possivelmente pelo seu efeito *scavenger* de radicais livres, melhora a função hepática e, conseqüentemente, ameniza as alterações pulmonares características dessa síndrome, como a hipoxemia arterial. Além disso, estudos mostram que os flavonóides têm importante função na manutenção da resistência e da integridade da parede capilar, podendo, dessa forma, também melhorar a relação ventilação-perfusão, facilitando as trocas gasosas (Havsteen 1983; Gabor 1988; Formica & Regelson 1995; Pratico 2005).

Na avaliação da diferença alvéolo-arterial de oxigênio (Figura 17), observa-se aumento significativo desse índice no grupo cirrótico não-tratado em relação a todos os demais grupos. Achados semelhantes foram encontrados por Fallon e colaboradores, em 1997, que relatam o aumento do gradiente alvéolo-arterial de oxigênio em ratos submetidos à LDBC, demonstrando anormalidades na difusão de gases.

Considerando-se as relações hepatossomática, esplenossomática e pneumossomática (**Figuras 18, 19 e 20**), podemos observar no grupo cirrótico aumento significativo do peso do fígado ($P < 0,001$), do peso do baço ($P < 0,05$) e do peso dos pulmões ($P < 0,05$) em relação a todos os demais grupos estudados, salientando que, no grupo cirrótico tratado com quercetina, essa situação foi reduzida significativamente.

Em relação ao peso do fígado e do baço, os dados coincidem com trabalhos nos quais foi mostrado que tais aumentos também foram atenuados após o uso da N-acetilcistina e da quercetina no modelo de LDB. (Pastor, Collado et al. 1997; Peres, Tunon et al. 2000). Jeon e colaboradores, em 2003, observaram aumento na relação hepatossomática em ratos que receberam tetracloreto de carbono e diminuição após o tratamento com “chitosan”, que é um antioxidante extraído da parede celular das bactérias encontradas no exoesqueleto de crustáceos.

O aumento da relação pneumossomática provavelmente decorre de *shunts* e da dilatação vascular intrapulmonar, o que aumenta o peso do órgão em estudo. Berthelot e colaboradores (1966) encontraram aumento no diâmetro de arteríolas em animais após LDBC, o que poderia influenciar no peso desse órgão, nessa situação.

O aumento do peso pode decorrer, ainda, da infiltração de células inflamatórias e das proteínas plasmáticas no parênquima pulmonar, em função da endotoxemia presente neste modelo experimental (Chang & Ohara 1993).

Muitos autores têm descrito que, na presença de cirrose, há aumento considerável da lipoperoxidação pela formação de espécies ativas de oxigênio (Britton & Bacon 1994).

Sabe-se que todas as células fagocitárias são responsáveis pela geração de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), capaz de oxidar a membrana plasmática e produzir grande quantidade de espécies reativas do oxigênio (ERO) (Thannickal & Fanburg 2000). Considerando que neste modelo ocorre o processo de endotoxemia por translocação bacteriana, esse fator deve ser levado em consideração.

A avaliação da LPO pode ser realizada através da medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), método que verifica a presença de malondialdeído, que é um subproduto do processo de oxidação das membranas lipídicas celulares (Buege & Aust 1978).

Na avaliação da lipoperoxidação, (**Figuras 21 e 22**) observamos aumento das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) no fígado e no pulmão dos animais cirróticos em relação ao grupo controle e sugere-se que o aumento desse processo esteja relacionado ao aumento do estresse oxidativo.

Como citado anteriormente, tais achados no modelo de LDB podem ser explicados pela endotoxemia e pelo aumento de ácidos biliares, que poderiam desequilibrar a atividade da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria hepática e, assim, favorecer o aumento da produção de espécies ativas de oxigênio. (Pastor, Collado et al. 1997; Orellana, Rodrigo et al. 2000).

Entretanto, em animais cirróticos que foram tratados com quercetina, observaram-se valores de TBARS próximos aos dos grupos controle, tanto no tecido hepático como no tecido pulmonar, reforçando o potencial antioxidante desse flavonóide. A diminuição da lipoperoxidação em situações de cirrose já foi demonstrada pelo uso de outras substâncias com ação antioxidante, como a rutina, a melatonina e a N-acetilcisteína neste modelo de cirrose biliar secundária (Pastor, Collado et al. 1997; Peres, Tunon et al. 2000; Esrefoglu, Gul et al. 2005; Vercelino & Marroni 2005).

Na cirrose, ocorre um desbalanço entre as substâncias oxidativas e antioxidativas, levando ao processo de estresse oxidativo. A quercetina, por sua ação antioxidante, parece proteger o

tecido hepático, melhorando a função hepática e, através desta, de forma secundária diminui a translocação bacteriana do trato gastrointestinal e, conseqüentemente, a atenuação das alterações pulmonares encontradas nessa síndrome (Formica & Regelson 1995).

Vários trabalhos têm evidenciado o envolvimento do estresse oxidativo e da ação das enzimas antioxidantes na cirrose, na tentativa de proteger o fígado da ação lesiva dos radicais livres (Orellana, Rodrigo et al. 2000; Peres, Tunon et al. 2000).

As células têm um sistema de defesa antioxidante enzimático, que converte espécies oxidantes em moléculas não-tóxicas, e protegem o organismo dos efeitos deletéreos do estresse oxidativo (Formica & Regelson 1995).

A enzima superóxido dismutase (SOD) constitui a primeira linha de defesa da célula contra o estresse oxidativo (Halliwell 1994).

Vários trabalhos relacionam a diminuição da atividade da enzima SOD ao aumento do estresse oxidativo (Hodgson & Fridovich 1975; Santiard, Ribiere et al. 1995). No presente estudo, observou-se diminuição de 60% e 70% da atividade da enzima SOD (**Figuras 23 e 24**), respectivamente, no fígado e no pulmão do grupo cirrótico em relação aos demais grupos. Em contrapartida, os animais cirróticos que foram tratados com quercetina, mantiveram os valores da atividade da enzima SOD próximos aos do grupo controle. Tais dados foram também observados por Peres e colaboradores, em 2000, ao utilizar o flavonóide quercetina e por Pastor e colaboradores, em 1997, ao utilizar NAC na avaliação do tecido hepático no modelo de cirrose por LDBC, levando-nos a pensar que quando o fígado está protegido pela quercetina, a SOD é preservada.

Pavanatto et al., em 2005, obtiveram resultados semelhantes aos nossos, em um estudo com animais cirróticos por tetracloreto de carbono, no qual as enzimas antioxidantes CAT e SOD se mostravam significativamente reduzidas no fígado dos animais cirróticos em relação aos grupos controle e que se elevavam em 70% (SOD) e 80% (CAT) após a administração da quercetina.

Os níveis de SOD estão diminuídos no tecido pulmonar, em várias doenças, pela perda completa da afinidade heparina - SOD extracelular, em função da proteólise sítio de ligação da enzima à molécula de heparina. As proteases liberadas por neutrófilos ou ativadas durante a reação inflamatória podem ser responsáveis pela proteólise da SOD extracelular. O mecanismo da perda dessa enzima da matriz tecidual pulmonar é exacerbado e mediado pelo dano causado pelas EAO, mas esses fenômenos ainda não são inteiramente claros (Fattman, Schaefer et al. 2003).

A translocação bacteriana e a endotoxemia podem aumentar as citocinas no endotélio pulmonar com aumento da formação de espécies ativas de oxigênio, entre elas, o ânion radical superóxido, o que justificaria o consumo da SOD no tecido pulmonar pela grande quantidade deste radical.

Tais dados reforçam a hipótese de que flavonóides como a quercetina são potentes varredores de radicais livres, como o radical hidroxil e o ânion superóxido, pois, após o seu uso, a SOD está aumentada em níveis semelhantes aos dos controles, fato observado por nós (Robak & Gryglewski 1988).

A enzima SOD, ao dismutar o radical superóxido, forma a espécie ativa de oxigênio peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é o substrato para a atividade da enzima catalase (CAT) (), considerada como a segunda linha de defesa enzimática a atuar na detoxificação celular, convertendo peróxido de hidrogênio em água (Gate, Paul et al. 1999).

Observamos aumento significativo da atividade da CAT no fígado do grupo cirrótico (**Figura 25**), possivelmente pela grande geração do radical ânion superóxido e a conseqüente formação de H_2O_2 , estimulando a atividade dessa enzima. No grupo de animais cirróticos tratados com quercetina, a atividade da CAT diminuiu, equiparando-se à dos grupos controle, confirmando a atuação deste flavonóide como antioxidante que preserva o fígado e, conseqüentemente, os níveis da enzima. Salientamos que a avaliação da expressão dessas enzimas (SOD e CAT) seria de interesse para melhor conhecimento desses fatos.

A atividade da CAT (**Figura 26**), no tecido pulmonar, não apresentou diferença significativa entre os grupos, provavelmente pelos altos níveis de óxido nítrico (NO) encontrados no tecido pulmonar e que, em grande quantidade, inativam a atividade desta enzima (Droge 2002).

A ausência ou a diminuição de bile no intestino delgado leva à perda do efeito emulsificante e antiendotóxico dos sais biliares, o que provoca níveis elevados de endotoxinas no intestino grosso, onde são absorvidas, e, através da circulação portal, favorecem a translocação bacteriana (Cruz 1998), encontrada em 45 – 75% dos animais com cirrose experimental por LDB (Rabiller, Nunes et al. 2002), agravando a lesão hepatocelular. A lesão hepática favorece a inadequada filtração do sangue nos sinusóides e, pelo desenvolvimento de “shunts” portossistêmicos e acentuada diminuição da capacidade fagocitária do fígado, há

entrada de bactérias e endotoxinas na circulação pulmonar. Nessa situação, o pulmão filtra o sangue, compensando o decréscimo da função fagocitária do fígado (Rabiller, Nunes et al. 2002).

Acredita-se que a dilatação vascular intrapulmonar pode estar relacionada à translocação bacteriana do trato gastrointestinal, um fenômeno que expõe o pulmão ao efeito de endotoxinas e citocinas inflamatórias (Chu, Lee et al. 1997).

Esse aumento de endotoxinas na circulação pulmonar promove o acúmulo de macrófagos intravasculares na microcirculação pulmonar e se correlaciona com o aumento da expressão da óxido nítrico induzível (iNOS) (Nunes, Lebec et al. 2001).

O NO funciona como um sinalizador molecular mediando a vasodilatação, quando produzido em baixas concentrações pela óxido nítrico sintase (NOS) em células vasculares endoteliais, mas como uma fonte altamente tóxica e oxidante, quando produzido em altas concentrações, pela NOS em macrófagos no processo patológico (Nelson 2001).

Na avaliação dos nitratos totais no homogeneizado de fígado (**Figuras 27**), observamos diminuição significativa na produção destes metabólitos no grupo cirrótico sem tratamento em relação a todos os demais.

Este resultado condiz com outros estudos em que a produção de NO está reduzida no fígado cirrótico (Wiest & Groszmann 2002), evidenciada pelo déficit dessa substância na microcirculação hepática. Essa redução da quantidade de NO levaria a uma elevação da pressão de perfusão em resposta ao aumento do fluxo sanguíneo e subsequente estresse de

cisalhamento. Os mesmos autores enfatizam que a redução da população sinusoidal no fígado cirrótico, em consequência das limitações dessas estruturas por compressão mecânica, por nódulos regenerativos e presença de fibrose, levariam a um aumento da velocidade do fluxo sanguínea e de forças estressantes na parede dos vasos, afetando as células endoteliais que são responsáveis pela expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), importante fonte de produção de óxido nítrico.

Em nosso estudo, no grupo cirrótico que recebeu administração do flavonóide quercetina, observa-se que os níveis de nitratos totais retornam aos níveis dos animais controle. Possivelmente, a quercetina, devido sua ação antioxidante e hepatoprotetora, determina melhora da função hepática, comprovada por dados citados anteriormente, como a avaliação da LPO, das enzimas antioxidantes e dos testes de função hepática, e possibilita um rearranjo tecidual, com diminuição da fibrose e dos nódulos regenerativos (**Figuras 29, 30 e 31**), melhorando o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, levando à redução do estresse de cisalhamento e da lesão do endotélio, normalizando a atividade das células endoteliais e os níveis de NO.

Vercelino & Marroni, em 2005, em um estudo utilizando o mesmo modelo experimental também encontraram diminuição de nitratos totais no fígado cirrótico e, após o tratamento com N-acetilcisteína, houve melhora da função hepática e conseqüente aumento dos níveis desse metabólito.

Na avaliação da produção de nitratos totais no homogeneizado de pulmão (**Figuras 28**), dos grupos estudados, observamos grande aumento na produção desses metabólitos no grupo cirrótico em relação aos demais grupos. Esses dados estão de acordo com os estudos, que

correlacionam a vasodilatação intrapulmonar de ratos cirróticos por LDBC à presença de óxido nítrico (NO) no tecido pulmonar (Fallon & Abrams 2000; Nunes, Lebrez et al. 2001; Zhang, Katsuta et al. 2003).

A excessiva produção de NO no tecido pulmonar em situação de SHP está associada a duas vias de produção de óxido nítrico. Na primeira, pela patogênese da endotoxemia (Titheradge 1999), que se relaciona ao desenvolvimento da SHP no modelo de LDBC, pela atividade de macrófagos intravasculares pulmonares e expressão de iNOS no tecido pulmonar (Nunes, Lebrez et al. 2001). E, em segundo lugar, através da eNOS. Em condições normais, a endotelina-1 é um vasoconstritor parácrino que regula o tônus vascular e se liga a receptores do tipo A nas células musculares lisas da parede vascular, causando vasoconstrição e, em menor grau, aos receptores do tipo B das células endoteliais, desencadeando a produção de NO e contrabalançando os efeitos vasoconstritores. Na cirrose, ocorre a superprodução de endotelina-1 pelas células estreladas do fígado, e essa passa a atuar de forma endócrina, difundindo-se na corrente sanguínea e atingindo a circulação pulmonar, onde interage, preferencialmente, com receptores do tipo B da superfície luminal do endotélio vascular pulmonar e, dessa forma, aumenta a produção da eNOS e, conseqüentemente, a geração de NO, causando a vasodilatação intrapulmonar (Fallon & Abrams 2000).

Em nosso estudo, os valores de nitratos totais dos animais que receberam tratamento com quercetina permaneceram próximos aos do grupo controle, sendo significativamente menores que dos níveis encontrados no grupo cirrótico sem tratamento. A quercetina parece apresentar efeitos sobre a produção de NO, provavelmente por melhorar a função hepática e reduzir a produção de endotelina pelas células estreladas do fígado e, subseqüentemente, a produção da

eNOS, e por diminuir a translocação bacteriana, minimizando o acúmulo de citocinas e células de defesa no endotélio pulmonar com consequente redução da produção da iNOS.

Em relação à avaliação do dano ao DNA, foram realizados neste trabalho testes de micronúcleos e ensaio cometa.

No teste de micronúcleos (**Tabela 3**), observa-se aumento na frequência de micronúcleos no grupo cirrótico em relação ao grupo controle. Já no grupo controle submetido à administração de quercetina, os resultados foram similares aos encontrados no grupo controle que recebeu apenas veículo e o grupo cirrótico tratado com quercetina mostra um decréscimo significativo na frequência dos micronúcleos em relação aos ratos cirróticos não-tratados.

Os dados do ensaio cometa mostraram aumento significativo do dano ao DNA no fígado e no pulmão, mas não no sangue dos animais cirróticos, mensurados por ID e IF, em comparação com o grupo controle (**Tabela 4**). No grupo controle tratado com quercetina, não foi observada diferença significativa de dano ao DNA em relação ao grupo controle + veículo em nenhum dos três tecidos analisados. Já no grupo cirrótico tratado com quercetina, notou-se redução do dano ao DNA em relação ao grupo de animais cirróticos não-tratados, nos tecidos hepático e pulmonar (**Tabela 4**).

O aumento da frequência de micronúcleos e dano ao DNA nos animais cirróticos em comparação com o grupo não-cirrótico sugere que a SHP pode diminuir a estabilidade genômica. Estudos prévios relatam que, na patofisiologia da cirrose biliar, ocorrem lesões no fígado e no pulmão provenientes da ação de radicais livres, dados estes também observados no nosso trabalho pela avaliação de LPO e enzimas antioxidantes (Vallance & Moncada 1991;

Singh, Shackleton et al. 1992; Zhang, Katsuta et al. 2003). Além disso, os níveis de óxido nítrico são aumentados na SHP, e as defesas antioxidantes naturais são diminuídas (Zhang, Katsuta et al. 2003). Essa superprodução de óxido nítrico na SHP no tecido pulmonar poderia levar à geração de peroxinitritos e conseqüente dano ao DNA (Ferguson 2001).

A quercetina, por sua vez, não induziu danos ao DNA e nem aumentou a frequência de micronúcleos, como pode ser observado nos resultados do grupo de animais controle tratados com este flavonóide (**Tabela 3 e 4**). De fato, a maioria dos estudos sobre as atividades genotóxica e carcinogênica de flavonóides em mamíferos apresenta resultados predominantemente negativos (Das, Wang et al. 1994). Estudos relatam que a quercetina inibe o desenvolvimento de câncer em modelos experimentais (Stoewsand, Anderson et al. 1984; Wiltrout & Hornung 1988; Stavric 1994).

Inúmeras pesquisas têm mostrado que a quercetina e outros flavonóides são capazes de proteger contra o dano ao DNA, induzido quimicamente em linfócitos humanos in vivo, através de ensaio cometa (Anderson, Yu et al. 1994; Duthie & Dobson 1999; Wilms, Hollman et al. 2005) e que, em contrapartida, aumentam a capacidade antioxidante total no plasma (Breinhold, Lauridson et al. 1999).

Neste estudo, a quercetina foi capaz de proteger o DNA em ratos cirróticos por LDBC (**Tabelas 3 e 4**). Os animais cirróticos tratados com quercetina exibiram uma pequena redução das células micronucleadas (**Tabela 3**). Além disso, o dano ao DNA em fígado e pulmão, tecidos alvo acometidos na SHP, foram menores no grupo cirrótico tratado em relação ao não-tratado (**Tabela 4**). Na análise enzimática, comparando a atividade da SOD nestes tecidos, essa encontrou-se aumentada nos animais cirróticos tratados com quercetina quando

comparada aos não-tratados, reforçando os mecanismos de proteção antioxidante da quercetina nesse modelo.

Outros mecanismos protetores dos flavonóides em células-alvo têm sido sugeridos em experimentos *in vitro* (culturas de células) (Bors & Sarah 1987; Anderson, Yu et al. 1994; Ferguson 2001). Tais estudos têm demonstrado que a quercetina e outros flavonóides inibem eficazmente a produção de óxido nítrico e do fator de necrose tumoral nas células de Kupffer (Kawada et al., 1998). Os flavonóides podem também proteger estas células da ação de radicais livres, conseqüentemente inibindo o dano ao DNA e a mutagenicidade (Edenharder & Grunhage 2003; Salter, Clifford et al. 2004).

Através da histologia, devido ao uso de hematoxilina e eosina e de picrossírius em fragmentos de fígado e pulmão, foi verificado que ambos os tecidos apresentavam diferenças entre o grupo cirrótico e os grupos controle e cirrótico tratado com quercetina.

No exame histopatológico do tecido hepático por meio da hematoxilina-eosina, confirma-se o desenvolvimento de cirrose no grupo com ligadura de ducto biliar comum (Figura 30), com nódulos regenerativos, fibrose e focos de necrose. Os animais cirróticos tratados com quercetina (Figura 31) apresentaram diminuição dessas alterações com diminuição de fibrose em pontes porta-porta, sem, no entanto, delimitar claramente a formação de nódulos. Esses achados estão de acordo com estudos que utilizaram quercetina e outras substâncias antioxidantes, como a N-acetilcisteína e a rutina, em que, se observa a redução da fibrose hepática (Pastor, Collado et al. 1997; Peres, Tunon et al. 2000; Pavanato, Tunon et al. 2003; Vercelino & Marroni 2005). A melhora no parênquima hepático acompanha-se com a

observada nos parâmetros enzimáticos e bioquímicos, assim como a melhora na integridade da membrana plasmática é acompanhada por meio da redução na lipoperoxidação.

Na análise histológica do pulmão, observamos aumento do diâmetro dos vasos e acúmulo de hemácias no centro dos mesmos, nos animais cirróticos (**Figura 33**), denotando-se vasodilatação e estase sangüínea, fenômenos estes que caracterizam a síndrome hepatopulmonar. Tais achados estão de acordo com os de outros autores que utilizaram o mesmo modelo para investigação da síndrome hepatopulmonar (Chang & Ohara 1993; Fallon, Abrams et al. 1997; Nunes, Lebrec et al. 2001; Zhang, Katsuta et al. 2003).

Os animais cirróticos, quando submetidos ao tratamento com quercetina, apresentam redução da vasodilatação e também da estase sanguínea pulmonar (Figura 34). Isso possivelmente se dá em decorrência do potencial antioxidante da quercetina, que reduz a lesão oxidativa no fígado dos animais com LDBC, acarretando melhora na função hepática e, conseqüentemente, levando à redução da endotoxemia e à diminuição de NO e EAO no tecido pulmonar. O decréscimo da lesão oxidativa, a diminuição dos níveis de NO e a redução da vasodilatação pulmonar, possivelmente, restabelecem as alterações difusionais dos gases.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o flavonóide quercetina, através do seu potencial antioxidante, exercendo uma ação protetora sobre o fígado dos animais cirróticos, poderia atenuar as alterações pulmonares presentes na Síndrome Hepatopulmonar, caracterizando qualidades de um agente terapêutico promissor nesta doença, fato que nos estimula a futuras investigações.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Pelos dados obtidos neste trabalho concluiu-se que

- a administração de quercetina em ratos cirróticos por LDBC diminuiu os níveis séricos das enzimas relacionadas à integridade do parênquima hepático, bem como restabeleceu os valores de gasometria nos animais cirróticos equiparando-os com valores animais controles, assim como diminuiu a diferença alvéolo-arterial de oxigênio neste grupo;
- a quercetina em ratos cirróticos diminuiu o dano sobre os lipídios das membranas tanto no fígado como no pulmão, resultado observado pela diminuição das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico, e manteve os valores da SOD, tanto do fígado como do pulmão semelhantes aos animais dos grupos controle. A CAT no pulmão manteve-se inalterada e, no fígado, após o uso de quercetina, permanecem em seus níveis basais conforme os animais controle;
- nos animais submetidos à ligadura de ducto biliar comum, notou-se diminuição nos nitratos totais no fígado, ao contrário do tecido pulmonar, no qual encontram-se aumentados significativamente. O uso da quercetina reverteu esse quadro, em ambos os órgãos, nos animais com ligadura de ducto biliar comum;
- a administração da quercetina reduz a frequência de micronúcleos e o dano ao DNA no fígado e no pulmão dos animais cirróticos tratados e não mostrou indícios de dano ao DNA nem de aumento da frequência de micronúcleos quando os dados dos animais

controle que receberam quercetina foram comparados com animais controle que receberam apenas veículo;

- nos aspectos histológicos do fígado, os sinais de necrose e nódulos regenerativos são atenuados nos animais com cirrose biliar secundária, após o uso da quercetina;
- nos aspectos histológicos do tecido pulmonar, os animais cirróticos com ligadura de ducto biliar comum desenvolveram alterações pulmonares semelhantes a SHP e estas foram revertidas com o uso da quercetina, observando-se redução da vasodilatação e da estase sangüínea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Aziz, G., G. Lebeau, et al. (1990). "Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat." Am J Pathol **137**(6): 1333-42.
- Aboussouan, L. S. and J. K. Stoller (2000). "The hepatopulmonary syndrome." Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol **14**(6): 1033-48.
- Abrams, G. A. and M. B. Fallon (1997). "The hepatopulmonary syndrome." Clin Liver Dis **1**(1): 185-200, xiii.
- Afanas'ev, I. B., E. A. Ostrachovitch, et al. (1995). "Different antioxidant activities of bioflavonoid rutin in normal and iron-overloading rats." Biochem Pharmacol **50**(5): 627-35.
- Altman, M. and E. D. Robin (1969). "Platypnea (diffuse zone I phenomenon?)." N Engl J Med **281**(24): 1347-8.
- Andersen, B. L., L. Gordon, et al. (1982). "Intrapulmonary shunting associated with cirrhosis: incidental diagnosis by perfusion lung scan." Clin Nucl Med **7**(3): 108-10.
- Anderson, D., T. W. Yu, et al. (1994). "The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay." Mutat Res **307**(1): 261-71.
- Arguedas, M. R., G. A. Abrams, et al. (2003). "Prospective evaluation of outcomes and predictors of mortality in patients with hepatopulmonary syndrome undergoing liver transplantation." Hepatology **37**(1): 192-7.
- Babbs, C., T. W. Warnes, et al. (1988). "Non-cirrhotic portal hypertension with hypoxaemia." Gut **29**(1): 129-31.
- Barp, J., A. S. Araujo, et al. (2002). "Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones." Braz J Med Biol Res **35**(9): 1075-81.
- Berthelot, P. et al. (1966). "Arterial changes in the lungs in cirrhosis of the liver-lung spider nevi". N Engl J Med **274**: 291-98.
- Bors, W. & M. Saran. (1987). "Radical scavenging by flavonoid antioxidants". Free Radical Research Communications **2**:289 -294.
- Boveris, A. and B. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." Biochem J **134**(3): 707-16.
- Brandão, A.B. & C.A. Marroni (2001). "Testes de Função Hepática". In: Mattos, A.A. & W. Dantas. *Compêndio de Hepatologia*. São Paulo: Fundação BYK.

- Breinhold, V., S.T. Lauridson, et al. (1999). "Dragsted LO Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolising and antioxidant enzymes in female rat". Xenobiotica **29**:1227-40.
- Britton, R. S. and B. R. Bacon (1994). "Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis." Hepatogastroenterology **41**(4): 343-8.
- Brussino, L., C. Bucca, et al. (2003). "Effect on dyspnoea and hypoxaemia of inhaled N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in hepatopulmonary syndrome." Lancet **362**(9377): 43-4.
- Buege, J. A. and S. D. Aust (1978). "Microsomal lipid peroxidation." Methods Enzymol **52**: 302-10.
- Campbell, M. (2000). "Bioquímica". 3º ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul.
- Cao, G., E. Sofic, et al. (1997). "Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships." Free Radic Biol Med **22**(5): 749-60.
- Chance, B., H. Sies, et al. (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." Physiol Rev **59**(3): 527-605.
- Chang, S. W. and N. Ohara (1993). "Increased pulmonary vascular permeability in rats with biliary cirrhosis: role of thromboxane A2." Am J Physiol **264**(3 Pt 1): L245-52.
- Chiesa, A., G. Ciappi, et al. (1969). "Role of various causes of arterial desaturation in liver cirrhosis." Clin Sci **37**(3): 803-14.
- Chu, C. J., F. Y. Lee, et al. (1997). "Hyperdynamic circulation of cirrhotic rats with ascites: role of endotoxin, tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide." Clin Sci (Lond) **93**(3): 219-25.
- Cotran, R.S., V. Kumar, et al. (2000). "Robbins – Patologia: Estrutural e Funcional". Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Cruz, C.A.T. (1998). "Alterações imunológicas na obstrução biliar extra-hepática". In: Silva, O.C., S. Zucoloto, et al. *Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia*. São Paulo: Robe.
- da Silva, J., S. M. Herrmann, et al. (2002). "Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test." Food Chem Toxicol **40**(7): 941-7.
- Dal palu, C., G. Donaggio, et al. (1968). "Arteriovenous shunts in cirrhotic patients studied with human serum albumin macroaggregates tagged with I-131 (MAA131-I)." Scand J Gastroenterol **3**(4): 425-31.
- Das, A., J. H. Wang, et al. (1994). "Carcinogenicity, mutagenicity and cancer preventing activities of flavonoids: a structure-system-activity relationship (SSAR) analysis." Prog Drug Res **42**: 133-66.

- Day, A. J., F. Mellon, et al. (2001). "Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin." Free Radic Res **35**(6): 941-52.
- Del Maestro, R. F. (1980). "An approach to free radicals in medicine and biology." Acta Physiol Scand Suppl **492**: 153-68.
- Dias, A. S., M. Porawski, et al. (2005). "Quercetin Decreases Oxidative Stress, NF- κ B Activation, and iNOS Overexpression in Liver of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats." J Nutr **135**(10): 2299-304.
- Dinh-Xuan, A. T. and R. Naeije (2004). "The hepatopulmonary syndrome: NO way out?" Eur Respir J **23**(5): 661-2.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev **82**(1): 47-95.
- Duthie, S. J. and V. L. Dobson (1999). "Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro." Eur J Nutr **38**(1): 28-34.
- Edenharder, R. and D. Grunhage (2003). "Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in Salmonella typhimurium TA102." Mutat Res **540**(1): 1-18.
- Erden Inal, M., A. Kahraman, et al. (2001). "Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A." Clin Exp Dermatol **26**(6): 536-9.
- Eriksson, L. S. (1990). "Hypoxemia in patients with liver cirrhosis." Acta Gastroenterol Belg **53**(2): 209-15.
- Esrefoglu, M., M. Gul, et al. (2005). "Protective effect of low dose of melatonin against cholestatic oxidative stress after common bile duct ligation in rats." World J Gastroenterol **11**(13): 1951-6.
- Fallon, M. B. (2005). "Mechanisms of pulmonary vascular complications of liver disease: hepatopulmonary syndrome." J Clin Gastroenterol **39**(4 Suppl 2): S138-42.
- Fallon, M. B. and G. A. Abrams (2000). "Pulmonary dysfunction in chronic liver disease." Hepatology **32**(4 Pt 1): 859-65.
- Fallon, M. B., G. A. Abrams, et al. (1997). "Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome." Am J Physiol **272**(4 Pt 1): G779-84.
- Fan, S. T., I. O. Ng, et al. (1999). "Hepatectomy for hepatocellular carcinoma: the surgeon's role in long-term survival." Arch Surg **134**(10): 1124-30.
- Farber, J. L., M. E. Kyle, et al. (1990). "Mechanisms of cell injury by activated oxygen species." Lab Invest **62**(6): 670-9.

- Fattman, C. L., L. M. Schaefer, et al. (2003). "Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine." Free Radic Biol Med **35**(3): 236-56.
- Favier, A.E., J. Cadet et al. (1995). "Análisis of free radicals in biological systems". Basel, Boston, Berlin, Birkhauser.
- Ferguson, L. R. (2001). "Role of plant polyphenols in genomic stability." Mutat Res **475**(1-2): 89-111.
- Fernandes, A.O. & S. Mies (1998). "Hipertensão Portal". In: Silva, O.C., S. Zucoloto, et al. *Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia*. São Paulo: Robe.
- Fernando, B., R. Marley, et al. (1998). "N-acetylcysteine prevents development of the hyperdynamic circulation in the portal hypertensive rat." Hepatology **28**(3): 689-94.
- Forestier, M., M. Solioz, et al. (1997). "Hepatic mitochondrial proliferation in rats with secondary biliary cirrhosis: time course and mechanisms." Hepatology **26**(2): 386-91.
- Formica, J. V. and W. Regelson (1995). "Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids." Food Chem Toxicol **33**(12): 1061-80.
- Friedman, S.L. & T.D. Schiano (2004). "Cirrhosis and its sequela". In: Goldman L. & D. Ausiello. *Cecil Textbook of Medicine*. Philadelphia: Saunders.
- Gabor, M. (1988). "Szent-Gyorgyi and the bioflavonoids: new results and perspectives of pharmacological research into benzo-pyrone derivatives. Commemoration on the 50th anniversary of the award of the Nobel Prize." Prog Clin Biol Res **280**: 1-15.
- Garcia, E., A. Silvério, et al. (1998). "Síndrome Hepatopulmonar: fisiopatogenia e opções terapêuticas". GED **17**(2): 53-62.
- Gate, L., J. Paul, et al. (1999). "Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants." Biomed Pharmacother **53**(4): 169-80.
- Goldin, J.R. & M.M. Raymundo (1997). "Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais". 2º ed. Porto Alegre: HCPA.
- Gonzalez-Gallego, J. & A. Esteller (1998). "El hígado. Fisiopatología de las hepatopatías". In: Esteller A. & M. Cordero. *Fundamentos de fisiopatología*. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana.
- Granger, D. L., N. M. Anstey, et al. (1999). "Measuring nitric oxide production in human clinical studies." Methods Enzymol **301**: 49-61.
- Halliwell, B. (1994). "Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?" Lancet **344**(8924): 721-4.
- Halliwell, B. (1997). "Antioxidants: The Basis What They Are and How to Evaluate Them". In: Sies, H. *Antioxidants in diseases: Mechanisms and Therapy*. (Advances in Pharmacology. vol. 38) California: Academic Press.

- Halliwell, B. & J.C.M. Gutteridge (1999). "Free Radicals in Biology and Medicine". 3th ed. Oxford University Press.
- Husain, S.R., J. Cillard, et al. (1987). "Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids". Phytochem **26**(9): 2489-491.
- Havsteen, B. (1983). "Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency." Biochem Pharmacol **32**(7): 1141-8.
- Hertog, M. G. and P. C. Hollman (1996). "Potential health effects of the dietary flavonol quercetin." Eur J Clin Nutr **50**(2): 63-71.
- Hodgson, E. K. and I. Fridovich (1975). "The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation." Biochemistry **14**(24): 5299-303.
- Hunt, D. R. (1980). "The identification of risk factors and their application to the management of obstructive jaundice." Aust N Z J Surg **50**(5): 476-80.
- Jeon, T.I.; S.G. Hwang et al. (2003). "Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats". Toxicol **187**: 67-73.
- Kawada, N., S. Seki, et al. (1998). "Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells." Hepatology **27**(5): 1265-74.
- Kennedy, T. C. and R. J. Knudson (1977). "Exercise-aggravated hypoxemia and orthodeoxia in cirrhosis." Chest **72**(3): 305-9.
- Kountouras, J., B. H. Billing, et al. (1984). "Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat." Br J Exp Pathol **65**(3): 305-11.
- Krinsky, N. I. (1989). "Antioxidant functions of carotenoids." Free Radic Biol Med **7**(6): 617-35.
- Krowka, M. J. and D. A. Cortese (1990). "Hepatopulmonary syndrome." Chest **98**(5): 1053-4.
- Krowka, M. J. and D. A. Cortese (1990). "Hepatopulmonary syndrome: an evolving perspective in the era of liver transplantation." Hepatology **11**(1): 138-42.
- Krowka, M. J., B. A. Staats, et al. (1990). "A prospective study of airway reactivity before bone marrow transplantation." Mayo Clin Proc **65**(1): 5-12.
- Krowka, M. J., A. J. Tajik, et al. (1990). "Intrapulmonary vascular dilatations (IPVD) in liver transplant candidates. Screening by two-dimensional contrast-enhanced echocardiography." Chest **97**(5): 1165-70.
- Landvik, S. (2004). "Vitamin E from supplements has good bioavailability." Am J Clin Nutr **80**(3): 784-5; author reply 785-6.

- Lange, P. A. and J. K. Stoller (1995). "The hepatopulmonary syndrome." Ann Intern Med **122**(7): 521-9.
- Lee, K. N., S. K. Yoon, et al. (2004). "Hepatopulmonary syndrome induced by common bile duct ligation in a rabbit model: correlation between pulmonary vascular dilatation on thin-section CT and angiography and serum nitrite concentration or endothelial nitric oxide synthase (eNOS)1 expression." Korean J Radiol **5**(3): 149-56.
- Lee, S. S. (1989). "Cardiac abnormalities in liver cirrhosis." West J Med **151**(5): 530-5.
- Llesuy, S.F. (2002). "Especies Activas de Oxígeno". In: Marroni, N.A.P. et al. *Estresse Oxidativo e Antioxidantes*. Canoas: Ulbra.
- Lima, B., A. Martinelli, et al. (2004). "[Hepatopulmonary syndrome: pathogenesis, diagnosis and treatment]." Arq Gastroenterol **41**(4): 250-8.
- Lin, C. M., C. S. Chen, et al. (2002). "Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase." Biochem Biophys Res Commun **294**(1): 167-72.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.
- Luo, B., G. A. Abrams, et al. (1998). "Endothelin-1 in the rat bile duct ligation model of hepatopulmonary syndrome: correlation with pulmonary dysfunction." J Hepatol **29**(4): 571-8.
- MacGregor, J. T., J. A. Heddle, et al. (1987). "Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes." Mutat Res **189**(2): 103-12.
- Martinez, G., J. A. Barbera, et al. (1999). "Hepatopulmonary syndrome associated with cardiorespiratory disease." J Hepatol **30**(5): 882-9.
- Matsumoto, A., K. Ogura, et al. (1995). "Increased nitric oxide in the exhaled air of patients with decompensated liver cirrhosis." Ann Intern Med **123**(2): 110-3.
- Mavournin, K. H., D. H. Blakey, et al. (1990). "The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program." Mutat Res **239**(1): 29-80.
- Mendes, R.H. (2004). "Marcadores de estresse oxidativo e resposta isquêmica cardíaca em ratos diabéticos tratados com proteína de soja". Dissertação de Mestrado, Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Meneghini, R.A. (1987). "Toxicidade do Oxigênio". *Ciência Hoje*. vol. 5 Número 28.
- Milnerstainer, A., D. Milnerstainer et al. (2003). "Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos". Acta Cir Bras **18**: 232 – 237.

- Misra, H. P. and I. Fridovich (1972). "The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase." J Biol Chem **247**(10): 3170-5.
- Montero, E. F., C. Quireze, Jr., et al. (2005). "Bile duct exclusion from selective vascular inflow occlusion in rat liver: role of ischemic preconditioning and N-acetylcysteine on hepatic reperfusion injury." Transplant Proc **37**(1): 425-7.
- Moreira, A. J., C. Fraga, et al. (2004). "Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats." Biochem Pharmacol **68**(10): 1939-46.
- Muriel, P., O. R. Suarez, et al. (1994). "Protective effect of S-adenosyl-l-methionine on liver damage induced by biliary obstruction in rats: a histological, ultrastructural and biochemical approach." J Hepatol **21**(1): 95-102.
- Naschitz, J. E., G. Slobodin, et al. (2000). "Heart diseases affecting the liver and liver diseases affecting the heart." Am Heart J **140**(1): 111-20.
- Nelson, R. S. and M. R. Eichinger (2001). "Role of nitric oxide (NO) in pulmonary dysfunction associated with experimental cirrhosis." Respir Physiol **126**(1): 65-74.
- Nelson, R. S., Eichinger, M.R. (2001). "Role of Nitric Oxide (NO) in pulmonary dysfunction associated with experimental cirrhosis." Respir Physiol **126**: 65-74.
- Nijveldt, R. J., E. van Nood, et al. (2001). "Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications." Am J Clin Nutr **74**(4): 418-25.
- Nunes, H., D. Lebrec, et al. (2001). "Role of nitric oxide in hepatopulmonary syndrome in cirrhotic rats." Am J Respir Crit Care Med **164**(5): 879-85.
- Orellana, M., R. Rodrigo, et al. (2000). "Bile duct ligation and oxidative stress in the rat: effects in liver and kidney." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **126**(2): 105-11.
- Panos, R. J. and S. K. Baker (1996). "Mediators, cytokines, and growth factors in liver-lung interactions." Clin Chest Med **17**(1): 151-69.
- Park, C., H. S. So, et al. (2003). "Quercetin protects the hydrogen peroxide-induced apoptosis via inhibition of mitochondrial dysfunction in H9c2 cardiomyoblast cells." Biochem Pharmacol **66**(7): 1287-95.
- Parola, M., G. Leonarduzzi, et al. (1996). "On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis." Free Radic Biol Med **20**(3): 351-9.
- Pastor, A., P. S. Collado, et al. (1997). "Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine." J Hepatol **27**(2): 363-70.

- Pavanato, A., M. J. Tunon, et al. (2003). "Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis." Dig Dis Sci **48**(4): 824-9.
- Peres, W., M. J. Tunon, et al. (2000). "The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction." J Hepatol **33**(5): 742-50.
- Peres, W. (1994). "Radicais livres em níveis biológicos". Pelotas: Educat.
- Perrella, M. A., E. S. Edell, et al. (1992). "Endothelium-derived relaxing factor in pulmonary and renal circulations during hypoxia." Am J Physiol **263**(1 Pt 2): R45-50.
- Picada, J. N., K. V. da Silva, et al. (1997). "Genotoxic effects of structurally related beta-carboline alkaloids." Mutat Res **379**(2): 135-49.
- Picada, J. N., D. G. Flores, et al. (2003). "DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine." Brain Res Mol Brain Res **114**(1): 80-5.
- Pique, J.M. (1992). "Óxido Nítrico". Formación Médica Continuada vol. 43: 1000.
- Plumb, G. W., K. R. Price, et al. (1999). "Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea." Redox Rep **4**(1-2): 13-6.
- Pratico, D. (2005). "Antioxidants and endothelium protection." Atherosclerosis **181**(2): 215-24.
- Rabiller, A., H. Nunes, et al. (2002). "Prevention of gram-negative translocation reduces the severity of hepatopulmonary syndrome." Am J Respir Crit Care Med **166**(4): 514-7.
- Repetto, M. G. and S. F. Llesuy (2002). "Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers." Braz J Med Biol Res **35**(5): 523-34.
- Rice-Evans, C. A. and N. J. Miller (1996). "Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food." Biochem Soc Trans **24**(3): 790-5.
- Riegler, J. L., K. A. Lang, et al. (1995). "Transjugular intrahepatic portosystemic shunt improves oxygenation in hepatopulmonary syndrome." Gastroenterology **109**(3): 978-83.
- Robak, J. and R. J. Gryglewski (1988). "Flavonoids are scavengers of superoxide anions." Biochem Pharmacol **37**(5): 837-41.
- Robak, J. and R. J. Gryglewski (1996). "Bioactivity of flavonoids." Pol J Pharmacol **48**(6): 555-64.
- Rodriguez-Roisin, R. et al. (1992). "The hepatopulmonary síndrome: new name, old complexities [Editorial]". Thorax **47**: 897-902.
- Rojkind, M. and P. Ponce-Noyola (1982). "The extracellular matrix of the liver." Coll Relat Res **2**(2): 151-75.

- Rolla, G., L. Brussino, et al. (1997). "Exhaled nitric oxide and oxygenation abnormalities in hepatic cirrhosis." Hepatology **26**(4): 842-7.
- Salter, L., T. Clifford, et al. (2004). "The use of comet assay data with a simple reaction mechanism to evaluate the relative effectiveness of free radical scavenging by quercetin, epigallocatechin gallate and N-acetylcysteine in UV-irradiated MRC5 lung fibroblasts." J Photochem Photobiol B **75**(1-2): 57-61.
- Santiard, D., C. Ribiere, et al. (1995). "Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by free radicals derived from ethanol metabolism: a gamma radiolysis study." Free Radic Biol Med **19**(1): 121-7.
- Santos, J.S., S. Zucoloto et al. (1998). "Cirrose biliar secundária". In: Silva, O.C., S. Zucoloto, et al. *Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia*. São Paulo: Robe.
- Schenk, P., M. Schoniger-Hekele, et al. (2003). "Prognostic significance of the hepatopulmonary syndrome in patients with cirrhosis." Gastroenterology **125**(4): 1042-52.
- Sherlock, S. & J. Dooley (1993). "Diseases of the liver and biliary system". 9th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Schraufnagel, D. E. and J. M. Kay (1996). "Structural and pathologic changes in the lung vasculature in chronic liver disease." Clin Chest Med **17**(1): 1-15.
- Sies, H. and M. E. Murphy (1991). "Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage." J Photochem Photobiol B **8**(2): 211-8.
- Silva, A.O. & L.C. D'albuquerque (1986). "Hepatologia Clínica e Cirúrgica". São Paulo: Sarvier.
- Singh, S., G. Shackleton, et al. (1992). "Antioxidant defenses in the bile duct-ligated rat." Gastroenterology **103**(5): 1625-9.
- Speit, G. and A. Hartmann (1999). "The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair." Methods Mol Biol **113**: 203-12.
- Stavric, B. (1994). "Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen." Clin Biochem **27**(4): 245-8.
- Stoewsand, G. S., J. L. Anderson, et al. (1984). "Quercetin: a mutagen, not a carcinogen, in Fischer rats." J Toxicol Environ Health **14**(2-3): 105-14.
- Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(6): L1005-28.
- Tajuddin, M.J. (1994). "Unexplained hypoxemia in liver disease: the hepatopulmonary syndrome". J Crit Illness **9**: 934-47.

- Tice, R. R., E. Agurell, et al. (2000). "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing." Environ Mol Mutagen **35**(3): 206-21.
- Tieppo, J., R. Vercelino et al. (2005). "Ligadura de ducto biliar como modelo de estudo da síndrome hepatopulmonar e estresse oxidativo". Arq Gastroenterol **42**(4):244-48.
- Tieppo, J. & R. Vercelino (2003). "Comparação de modelos experimentais para verificação das alterações características da síndrome hepatopulmonar". Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de Fisioterapia, Universidade Luterana do Brasil.
- Titheradge, M. A. (1999). "Nitric oxide in septic shock." Biochim Biophys Acta **1411**(2-3): 437-55.
- Vallance, P. and S. Moncada (1991). "Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide?" Lancet **337**(8744): 776-8.
- van Acker, S. A., D. J. van den Berg, et al. (1996). "Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids." Free Radic Biol Med **20**(3): 331-42.
- Van Hoorn, D. E., R. J. Nijveldt, et al. (2002). "Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids." Eur J Pharmacol **451**(2): 111-8.
- Vercelino, R & N. Marroni (2005). "O efeito da N-Acetilcisteína sobre a síndrome hepatopulmonar induzida por cirrose biliar secundária em ratos". Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- West, J.B. (2001) "Fisiologia Respiratória Moderna". São Paulo: Manole.
- Wiest, R. and R. J. Groszmann (2002). "The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough." Hepatology **35**(2): 478-91.
- Wilms, L. C., P. C. Hollman, et al. (2005). "Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes." Mutat Res **582**(1-2): 155-62.
- Wiltout, R. H. and R. L. Hornung (1988). "Natural products as antitumor agents: direct versus indirect mechanisms of activity of flavonoids." J Natl Cancer Inst **80**(4): 220-2.
- Yaari, A., E. Sikuler, et al. (1992). "Bromosulphophthalein disposition in chronically bile duct obstructed rats." J Hepatol **15**(1-2): 67-72.
- Yu, P.B. (1994). "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species". Physiol Rev **74**(1): 139-62.
- Zhang, X. J., Y. Katsuta, et al. (2003). "Intrapulmonary vascular dilatation and nitric oxide in hypoxemic rats with chronic bile duct ligation." J Hepatol **39**(5): 724-30.

