

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO NO MODELO ANIMAL DE APNÉIA DO
SONO: EFEITOS DE DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO À HIPÓXIA
INTERMITENTE**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências
Médicas da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul como requisito
para obtenção do título de Mestre
em Medicina

Autor: Darlan Pase da Rosa

Orientadora: Dra. Norma Possa Marroni

Co-Orientador: Dr. Denis Martinez

Porto Alegre - RS, 2010

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO NO MODELO ANIMAL DE APNÉIA DO
SONO: EFEITOS DE DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO À HIPÓXIA
INTERMITENTE**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências
Médicas da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul como requisito
para obtenção do título de Mestre
em Medicina

Autor: Darlan Pase da Rosa

Orientadora: Dra. Norma Possa Marroni

Co-Orientador: Dr. Denis Martinez

Porto Alegre - RS, 2010

R788e Rosa, Darlan Pase da

Estresse oxidativo hepático no modelo animal de apnéia do sono :
efeitos de diferentes tempos de exposição à hipóxia intermitente /
Darlan Pase da Rosa ; orient. Norma Possa Marroni ; co-orient. Denis
Martinez. – 2010.

77 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do
Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Síndromes da apnéia do sono 2. Estresse oxidativo 3. Fígado 4.
Anóxia 5. Modelos animais de doenças I. Marroni, Norma Possa II.
Martinez, Denis III. Título.

NLM: WF 143

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ressonância magnética demonstrando imagem sagital de indivíduo normal e de saos.....	- 20 -
Figura 2 - Mecanismo proposto para geração de radicais livres de oxigênio após períodos de isquemia e reperfusão (12-14).....	- 24 -
Figura 3: Reações em cadeia da lipoperoxidação (67).	- 28 -
Figura 4: Esquema geral das principais fontes celulares de produção e metabolização de ERO.	- 30 -
Figura 5: Geração e reação do peroxinitrito.	- 33 -

ARTIGO

FIGURE 1. Effect of intermittent hypoxia on hepatic lipid peroxidation, evaluated using the TBARS assay.	- 69 -
FIGURE 2. Effect of intermittent hypoxia on total liver glutathione.....	- 71 -
FIGURE 3. Photomicrograph of mouse liver tissues. A. sham operated liver (SO). B. Intermittent hypoxia for 35 days (IH-35).. ..	- 74 -

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Enzymes indicating hepatic integrity: AST, ALT and alkaline phosphatase.....	68
TABELA 2. Activities of liver antioxidant enzymes.....	70
TABELA 3. Comet assay on peripheral blood and liver tissues from mice subjected to hypoxia.....	72
TABELA 4. Quantification of nitric oxide metabolites in liver tissue.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

QUÍMICAS

°C	Graus Celsius
ADP	Adenosina difosfato
AH	Apnéia ou hipopnéia
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AOX	Antioxidante
ATP	Adenosinatrifosfato
ALT	Alanina-aminotransferase
AST	Aspartato-aminotransferase
Ca ⁺⁺	Cálcio
CAT	Catalase
CO ₂	Dióxido de carbono
CPAP	Pressão positiva contínua em vias aéreas (Continuous positive airway pressure)
Cu	Cobre
e ⁻	elétron
EEG	Eletroencefalograma
EHNA	Esteatohepatite não alcoólica
EMG	Eletromiografia
eNOS	NO sintetase endotelial
EO	Estresse oxidativo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FA	Fosfatase alcalina
Fe	Ferro

g	Gramma
GPx	Glutathiona Peroxidase
GSH	Glutathiona Total
GSSG	glutathiona oxidada
H⁺	Hidrogênio
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina e Eosina
HI	Hipóxia intermitente
HI-21	Hipóxia intermitente por 21 dias
HI-35	Hipóxia intermitente por 35 dias
HII	Hipóxia intermitente isocápnica
HIF-1α	Fator de transcrição hipóxia-induzível 1 alfa
IAH	Índice de apnéia e hipopnéia
ICAM-1	moléculas de adesão intercelular-1
IL-6	Interleucina 6
iNOS	NO sintase induzível
Kg	Quilograma
L	Litro
LPO	lipoperoxidação
mg	Miligrama
ml	Mililitro
N₂	Nitrogênio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAPDH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo <i>fosfato</i>

NO	Óxido nítrico
NOS	NO sintase
NREM	Sono movimentos não rápidos dos olhos
O^{·-}	Oxigênio <i>singlet</i>
O₂	Oxigênio
O²⁻	Ânion superóxido
OH[·]	Radical hidroxila
PaCO₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial de Hidrogênio
PO₂	Pressão de oxigênio
PSG	Polissonografia
REM	Sono rápidos movimentos dos olhos
RL	Radical livre
ROO[·]	radicais peroxil
rpm	Rotação por minuto
SAOS	Síndrome da apnéia obstrutiva do sono
SAHOS	Síndrome das apnéias e hipopnéias do sono
SNC	Sistema nervoso central
SO	Sham operated
SOD	Superóxido dismutase
TGF-β	fator de transformação de crescimento beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
VAS	Vias aéreas superiores
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

µg	Micrograma
µl	Microlitro
XO	Xantina oxidase

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	- 4 -
LISTA DE TABELAS	- 5 -
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	- 6 -
RESUMO.....	- 12 -
INTRODUÇÃO	- 14 -
REFERENCIAL TEÓRICO	- 16 -
Vigília E Sono	- 16 -
Apneias do Sono.....	- 17 -
Repercussão das apneias do sono	- 19 -
Fisiopatologia da SAOS	- 19 -
Diagnóstico e classificação da SAOS	- 21 -
SAOS, inflamação e estresse oxidativo	- 22 -
Estresse oxidativo	- 25 -
Radicais livres e espécies reativas de oxigênio.....	- 25 -
Antioxidantes	- 29 -
Estresse Nitrativo	- 31 -
Modelos de hipóxia intermitente (HI).....	- 33 -
Hipóxia e dano hepático.....	- 34 -
OBJETIVOS	- 36 -
Objetivos Gerais.....	- 36 -

Objetivos Específicos	- 36 -
REFERÊNCIAS	- 38 -
ARTIGO CIENTÍFICO	- 48 -
ABSTRACT	Erro! Indicador não definido.
KEYWORDS	Erro! Indicador não definido.
INTRODUCTION.....	Erro! Indicador não definido.
OBJECTIVES.....	Erro! Indicador não definido.
METHODS	Erro! Indicador não definido.
RESULTS	Erro! Indicador não definido.
DISCUSSION.....	Erro! Indicador não definido.
CONCLUSION	Erro! Indicador não definido.
ACKNOWLEDGMENTS.....	Erro! Indicador não definido.
BIBLIOGRAPHY	Erro! Indicador não definido.
ANEXOS	- 77 -

RESUMO

Síndrome da apnéia obstrutiva do sono (SAOS) é uma doença crônica comum com importantes consequências cardiovasculares e neuropsiquiátricas. Repetidos eventos de apnéia causam hipóxia intermitente (HI) com alteração de função em diferentes sistemas. Na SAOS ocorre períodos de isquemia e de reperfusão, com isso a formação de radicais livres e estresse oxidativo (EO). Diferentes estudos experimentais na SAOS descrevem o envolvimento do EO e como consequência dano hepático entre outros, porém não há relatos de tempo de hipóxia intermitente necessários aos animais de experimentação para simular a apnéia e suas complicações. Assim esse trabalho investiga o tempo de hipóxia intermitente, simulando apnéia do sono, necessário para o desenvolvimento de dano oxidativo e tecidual hepático. Foram utilizados camundongos CF-1(n=36) divididos em três grupos: Sham operated (SO); Hipóxia Intermitente durante 21 dias (HI-21) e Hipóxia Intermitente durante 35 dias (HI-35). Ao término do experimento os animais foram anestesiados e sangue foi coletado para avaliação de enzimas hepáticas: aspartato amino transferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) que se apresentaram aumentadas no grupo HI-35 e sem diferença significativa no grupo HI-21. Após a morte dos animais, foi retirado o fígado para avaliações bioquímicas e histológicas. O dano hepático foi avaliado pela técnica de TBARS, no qual foi verificado aumento significativo da lipoperoxidação (LPO) no grupo HI-35 em relação ao SO e sem diferença estatística no HI-21. O dano oxidativo ao DNA avaliado por ensaio cometa mostrou aumento significativo de dano no grupo HI-35. A avaliação das enzimas antioxidantes (AOX): Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx),

apresentaram-se diminuídos significativamente no grupo HI-35. A atividade AOX não enzimática avaliada pela glutatona total foi diminuída no grupo HI-35 em comparação ao SO. A avaliação dos metabólitos do óxido nítrico (NO) nitritos e nitratos apresentaram-se aumentados no grupo HI-35. A análise histológica realizada pela coloração de hematoxilina e eosina (HE), mostrou lesão no tecido hepático no grupo HI-35. Desta forma sugerimos que o tempo necessário de hipóxia intermitente, que simula apnéia do sono, para a lesão hepática e estresse oxidativo seja entre 21 e 35 dias.

INTRODUÇÃO

Os distúrbios respiratórios do sono são momentâneos e muitas vezes cíclicos. As cessações no ritmo da respiração (apneia) ou mesmo redução na amplitude da respiração (hipopneias) são suficientes para causar hipoxemia e hipercapnia arterial importante. Ambas - apneias e hipopneias - são exclusivas do sono e ocorrem por comprometimento parcial ou até mesmo completo fechamento das vias aéreas superiores (apneia obstrutiva); acentuada redução ou cessação da atividade do tronco cerebral respiratório (apneia central) ou por combinação de eventos central e obstrutiva. Tais alterações respiratórias levam à hipóxia intermitente, que pode resultar em despertares transitórios do sono, ocasionando fragmentação do sono (1).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produtos resultantes do metabolismo oxidativo normal do oxigênio, que são gerados durante a respiração celular. Dentro dessas ERO apresentam-se moléculas muito reativas, os radicais livres (RL), que reagem levando à lipoperoxidação (LPO). A célula apresenta, porém, um sistema de defesa antioxidante (AOX) enzimático e não enzimático que tem como objetivo impedir, varrer ou eliminar estes RL do meio, impedindo a LPO. Contudo, quando a geração de ERO excede a capacidade celular antioxidante, tanto por aumento da LPO e/ou diminuição das defesas AOX, desencadeia o estresse oxidativo (EO) que tem importante papel em muitas doenças inflamatórias (2-4).

Estudos relatam que o estresse oxidativo está associado com a SAOS, tendo sua melhora após o tratamento com pressão positiva contínua em vias aéreas (CPAP) ou com dispositivo nasal (5-7). O CPAP, tratamento mais

comum para pacientes com apneia do sono, fornece pressão positiva contínua nas vias aéreas superiores, geralmente através de máscara nasal durante o sono, sendo essa ligada à turbina que fornece pressão de ar, melhorando a respiração em pacientes com apneia obstrutiva ou central (8). Ou seja, essa situação leva ao aumento de ERO na SAOS, sendo provavelmente iniciada pelas depleções repetidas na respiração que resultam em mudanças na pressão de oxigênio (PO_2), por promover momentos de isquemia seguidos de reperfusão (4, 9-11). Na isquemia/reperfusão, o processo de formação de ERO dá-se por via da xantina, quando há ativação da enzima xantina oxidase que, em presença de oxigênio na reperfusão, gera RL, contribuindo para o estresse oxidativo (12-14).

A SAOS é associada a doenças crônicas no fígado na esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) (15-22). Savransky e colaboradores demonstraram que a hipóxia intermitente (HI) pode atuar como um “segundo hit” de dano hepático, amplificando a lesão tecidual induzida por uma dose elevada de paracetamol (23-24). O mecanismo de lesão, desencadeado pela SAOS, parece estar relacionado com a formação de peroxinitrito, depleção dos estoques de glutatona e apoptose dos hepatócitos (24).

REFERENCIAL TEÓRICO

VIGÍLIA E SONO

A vigília ocorre antes do início do sono e no despertar matinal. Além de breves períodos de acordar, cinco a quinze vezes por hora, em geral nas trocas de estágio e acompanhada de movimentos corpóreos mais ou menos sutis. O despertar é diferente do acordar. O despertar é breve, com duração entre três e quinze segundos, correspondendo apenas ao aparecimento de ondas alfa no eletroencefalograma (EEG). O acordar dura mais de quinze segundos e se acompanha de aumento de tono muscular, evidenciado por maior atividade no eletromiografia (EMG) (25).

No sono, o EEG mostra uma sucessão ordenada e cíclica de ondas cerebrais de diferentes amplitudes e frequências que assinalam os estágios do sono. Estudo recente das propriedades taxonômicas dos estágios do sono concluiu que, do ponto de vista estatístico, as regras atuais de classificação de estágios resultam em padrões de EEG heterogêneos, podendo-se identificar três ou quatro tipos para cada estágio (26).

Atualmente, avalia-se a qualidade do sono objetivamente através da polissonografia (PSG), método que combina eletroencefalograma, eletrooculograma, eletromiograma aos registros de respiração, saturação de oxigênio arterial e eletrocardiograma. Em adultos, o sono noturno é formado por quatro a seis ciclos de períodos de sono REM (do inglês, "rapid eye movement"), alternado com períodos de sono não REM (NREM, do inglês, "no rapid eye movement"). Cada ciclo dura de 90 a 110 minutos (27).

Em humanos, o sono NREM é convencionalmente dividido em quatro estágios, de acordo com o aparecimento em sequência de ondas características no EEG, que vão do mais superficial, o estágio 1, até o mais profundo com ondas delta, o estágio 4 (1).

No sono REM, ocorre redução acentuada ou perda completa do tônus muscular. Também são observados abalos musculares e movimentos oculares rápidos, resultantes de descargas de neurônios pontino-geniculado-occipitais (PGO). Elas nascem na ponte, propagam-se para o núcleo geniculado lateral e alcançam o córtex occipital, gerando as imagens dos sonhos. Os sonhos ocorrem regularmente durante todo o período de sono REM. Predomina no terço final da noite, ocupando de uma a duas horas do sono do adulto (1).

APNEIAS DO SONO

Apneias e hipopneias do sono são perturbações respiratórias que ocorrem durante o sono, com duração de mais de dez segundos, causam hipoxemia e terminam com despertar autonômico ou cortical. O diagnóstico de síndrome das apneias e hipopneias obstrutivas do sono (SAHOS) exige a ocorrência de sintomas de sono perturbado, como sonolência, associado a cinco ou mais apneias ou hipopneias (AH) por hora de sono, causadas por colapso da faringe (1, 25).

Notavelmente, pacientes com apneia do sono apresentam pouco ou nenhum problema com a sua respiração e com a permeabilidade das vias aéreas superiores (VAS), enquanto acordado. A grande maioria dos portadores dessa doença apresenta sistemas de controle ventilatório que são capazes de regular sua ventilação alveolar e gasometria arterial com variações pequenas

em relação à vigília. Além disso, quando acordado, tais sistemas de controle saudáveis possuem feedback suficientemente sensível e controles para assegurar a coordenação precisa da parede torácica e das vias aéreas superiores, com o recrutamento dos músculos respiratórios, de modo a proporcionar diâmetro máximo das vias aéreas, resistência das vias aéreas baixas e volumes pulmonares e ótimo comprimento musculares respiratórias, independente da condição ventilatória (1). Durante o sono, esses indivíduos, mesmo com o controle da respiração normal, estão, entretanto, sujeitos a sofrer apneias.

As perturbações respiratórias do sono são comumente divididas em centrais, denotado por ausência ou redução acentuada na sinalização motora central para os músculos respiratórios; obstrutivas, compostas de esforços respiratórios contra via aérea superior fechada; ou mistas, quando ocorre alternância entre obstrutiva e central (1).

A atividade elétrica de neurônios bulbares responsáveis pela inspiração mostra redução da amplitude na transição do estado vigília para o sono NREM, geralmente acompanhada de ligeira a moderada hipoventilação (2 a 8 mmHg PaCO₂) e aumentada de duas a cinco vezes a resistência das vias aéreas superiores (28-31).

Em momentos de hipóxia, sabe-se que pode ter uma diminuição intrapulmonar de vasodilatadores, diminuindo a luz do vaso, deixando a troca gasosa mais eficiente (32-33). Porém em outros órgãos espera-se um aumento desses vasos, levando ao aumento de vasodilatadores, principalmente o óxido nítrico (NO).

REPERCUSSÃO DAS APNEIAS DO SONO

Além de sonolência diurna, as apneias do sono, por seu impacto sobre o sistema nervoso central, causam alterações psicossociais e distúrbios de memória, pensamento, comunicação e aprendizado (34). Em modelo animal, a hipóxia intermitente (HI) causa morte dos neurônios corticais por apoptose (35). As causas do prejuízo mental tanto podem ser fragmentação do sono pelos despertares, quanto episódio de HI durante as apneias, ou ambos.

Mesmo tratadas as apneias, os pacientes podem continuar sonolentos. Um modelo animal, descrito por Veasey e colaboradores (36), demonstrou que a irreversibilidade da sonolência, em camundongos, deve-se à uma lesão no sistema nervoso central e envolve reações de oxidação e nitração nas áreas responsáveis pela manutenção da vigília (36).

No que tange ao aparelho cardiovascular do paciente com SAHOS, o aumento de incidência de hipertensão arterial sistêmica é comprovado com estudos em grande número de pacientes, sendo controlado para os fatores de confusão conhecidos (37-38). A hipertensão arterial pode ser a base para as demais consequências cardiovasculares das apneias e está comprovadamente relacionada à HI (39-40).

FISIOPATOLOGIA DA SAOS

As vias aéreas superiores (VAS) fazem parte de uma estrutura complexa e necessária para a realização da deglutição, vocalização e respiração. Sua obstrução é mais frequente em seres humanos, em parte, porque o osso hióide não está firmemente ligado às estruturas esqueléticas, como em outros

mamíferos, o osso hióide é anexado ao processo estilóide do crânio (41).

Além do arco hióide, alguns pesquisadores atribuem mudanças anatômicas no desenvolvimento evolutivo, contribuindo para frequência elevada de SAOS em humanos. Principalmente a posição da laringe em relação à orofaringe, a qual, ao separar o palato mole da epiglote, estreita a orofaringe, fazendo com que a língua invada o espaço disponível (42-44).

A região oral da faringe é dividida em nasofaringe, retropalatal, retroglóssal e hipofaringe (Figura 1A). Pode ocorrer o fechamento (bloqueio da passagem de ar) em uma ou mais regiões da faringe em indivíduos que apresentam a SAOS, sendo que essas regiões podem apresentar um estreitamento até mesmo durante a vigília (45-48). Embora a região retropalatal da orofaringe seja o local mais comum de bloqueio (Figura 1B), o estreitamento da via aérea é um processo dinâmico e muito variado, inclui as regiões retroglóssal e hipofaringe (49-50). Em indivíduos portadores de obesidade com SAOS, ocorre o fechamento das VAS principalmente na velofaringe, enquanto em pacientes portadores de obesidade com SAOS e recesso na mandíbula, o colapso ocorre em ambas as velo e na orofaringe (51).

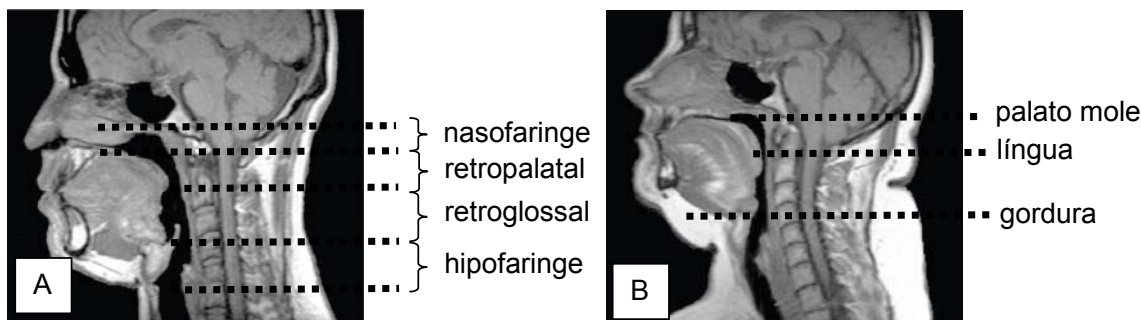


FIGURA 1: RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DEMONSTRANDO IMAGEM SAGITAL DE INDIVÍDUO NORMAL E DE SAOS.

A: imagem sagital de ressonância magnética em indivíduo normal; B: imagem

sagital de ressonância magnética em paciente com SAOS grave. Destacam-se as quatro regiões da via aérea superior (nasofaringe, região retro-palatal, retroglossal, hipofaringe) e tecidos moles das VAS (palato mole, língua, gordura) e estruturas crânio-faciais (mandíbula). Nota-se que o paciente em apneia apresenta as VAS menores, quanto na região retropalatal e retroglossal o palato mole e a língua são maiores, e a quantidade de gordura subcutânea é maior. Adaptado de Schwab, 1995 (47).

DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DA SAOS

A polissonografia assistida é o padrão de teste de diagnóstico para SAOS. Trata-se de gravações simultâneas de múltiplos sinais fisiológicos durante o sono, incluindo o eletroencefalograma, eletrooculograma, eletromiograma, fluxo aéreo oronasal e saturação da oxi-hemoglobina. Coletivamente essas avaliações permitem a identificação e a classificação das apneias e hipopneias. Define-se apneia como cessação completa do fluxo de ar por, pelo menos, dez segundos; e hipopneia como redução no fluxo de ar, seguida por despertar do sono ou diminuição de saturação da oxi-hemoglobina (27).

A gravidade da apneia do sono é geralmente avaliada pelo índice de apneia e hipopneia (IAH), que é o número de apneias e hipopneias por hora de sono. Várias medidas adicionais de gravidade da doença caracterizam o grau de hipoxemia noturna (como a dessaturação de oxi-hemoglobina média) e o grau de fragmentação do sono, as quais também são usadas na clínica e na área de investigação (27).

O aumento de conhecimento sobre a SAHOS demonstrou sua gravidade

como problema de saúde pública, por ser prevalente e impor relevante morbidade cardiovascular e neurocognitiva em todas as faixas etárias. Um estudo de prevalência, realizado na cidade de São Paulo, verificou que 21,3% das pessoas analisadas apresentavam IAH entre 5 e 14,9 e 16,9% tinha IAH superior ou igual a 15 (52).

SAOS, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO

A obesidade, tanto central quanto visceral, está associada com maior risco para SAOS (52-53), demonstrando que há outros fatores, além da causa puramente mecânica, que podem contribuir para a patogênese dos distúrbios do sono. Depósitos de gordura visceral representam uma fonte rica de mediadores humorais e citocinas inflamatórias, portanto podem ter impacto sobre as respostas neurais do controle respiratório (54).

Um dos principais fatores derivados de adipócito estudado é a leptina, que atua no controle respiratório. Inicialmente foi descoberto seu papel de atuação nos receptores hipotalâmicos: reduzir a saciedade e aumentar o metabolismo (55), podendo atuar como um estimulante respiratório (56), sendo associada à síndrome de hipoventilação na obesidade em humanos (57). Embora não haja evidências diretas de que a deficiência de leptina possa ter impacto no controle dos músculos respiratórios nas VAS, ela pode desempenhar um papel de hipoventilação noturna, especialmente em sono REM, quando a respiração é deprimida, conforme demonstrado na deficiência de leptina em camundongos (56).

Barcelo e colaboradores, demonstraram que estão aumentados os níveis de leptina e o neuropeptídeo Y em pacientes com SAHOS,

independentemente de uso de CPAP, a obesidade, porém, foi um interferente para leptina (58). O tecido adiposo libera muitos outros fatores humorais, incluindo clássicas citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), os quais estão aumentados em pacientes com SAOS e podem ser reduzidos com terapia de CPAP (59-60).

A obstrução das VAS leva à diminuição da oxigenação do sangue e hipóxia intermitente (HI), caracterizada por episódios repetidos de hipóxia/reoxigenação. A principal fonte de geração de radicais livres nas células durante a hipóxia foi relatada como semelhante à isquemia e à reperfusão, quando ocorre diminuição do potencial redox mitocondrial, causando uma produção de ERO a partir da cadeia de transporte de elétrons, principalmente no nível III do citocromo (61).

Além disso, a liberação de ERO pode ser aumentada em condições de hipóxia através da ativação da xantina oxidase (XO) (62), Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAPDH) oxidase (63), e fosfolipase A2 (64). Devido à alteração do sistema de formação de ATP, na hipóxia, que altera da via aeróbica para a via anaeróbica (figura 2), o qual ativa a xantina oxidase que em presença de oxigênio (reoxigenação) gera radicais livres (62).

Sabe-se que as consequências da isquemia em diferentes tecidos dependem de sua duração, e que muitas lesões são desenvolvidas durante o estágio de reoxigenação, decorrente da reperfusão tecidual (12-14). Durante a isquemia, sabe-se que há alteração no sistema de formação de ATP, sendo por via da hipoxantina e, quando há reoxigenação (reperfusão) com ativação da XO, dá-se a formação de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (Figura 2),

grandes responsáveis pelo aumento de RL com a consequência do estresse oxidativo.

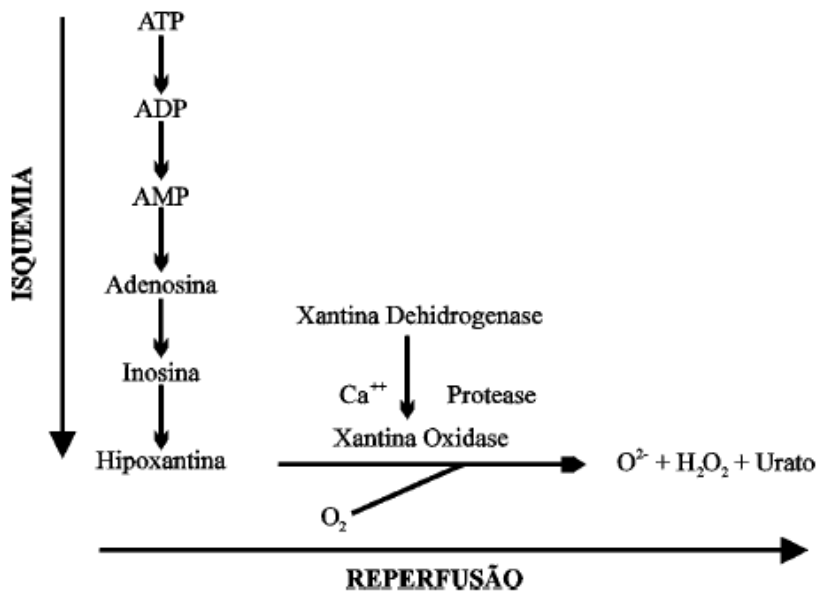


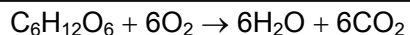
FIGURA 2 - MECANISMO PROPOSTO PARA GERAÇÃO DE RADICAIS LIVRES DE OXIGÊNIO APÓS PERÍODOS DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO (12-14).

A mitocôndria é alvo importante dos danos provocados pelos processos de isquemia e reperfusão (65). Nela, ocorre diminuição das atividades da nicotinamida adenina dinucleotídeo ligada com hidrogênio (NADH) desidrogenase, do carregador de adenosina difosfato/adenosina trifosfato (ADP/ATP) e da ATP sintetase, além de aumento na atividade da fosfolipase A2. Ocorre ainda acentuado acúmulo de cálcio e aumento da geração de radicais livres pelas mitocôndrias. A associação desses eventos pode ser responsável pelas lesões e morte celular, decorrentes da reperfusão, possivelmente por um fenômeno de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial interna (66).

ESTRESSE OXIDATIVO

RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

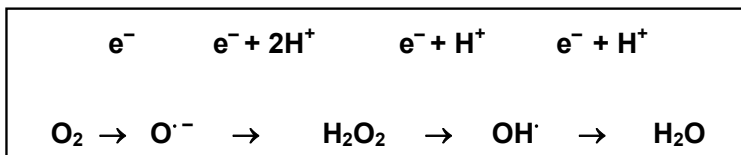
O consumo de oxigênio pelos organismos aeróbios está intimamente ligado à otimização da extração de energia dos diversos substratos energéticos. Seu alto potencial oxidante pode ser verificado pela comparação da eficiência com que ocorrem as reações do metabolismo aeróbio. Por exemplo, a oxidação completa da glicose pode liberar energia suficiente para ressíntese de 38 ATP, enquanto no sistema anaeróbio apenas 2 ATP são obtidos. No primeiro caso, as células transformam glicose (C₆H₁₂O₆) em água e dióxido de carbono (CO₂), graças à oxidação por oxigênio molecular.



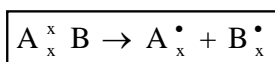
A redução completa de uma molécula de oxigênio à água requer quatro elétrons. Redução tetraeletrônica do O₂ evita as reações intermediárias e ocorre na cadeia respiratória acoplada à fosforilação oxidativa, pelo sistema citocromo-oxidase, que forma ATP (67).



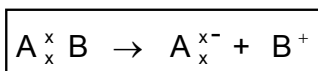
É preciso, porém, ressaltar que nem sempre o oxigênio transforma-se diretamente em água. Em cerca de 5% do processo, o oxigênio tem tendência forte de receber um elétron de cada vez, redução monoeletrônica do oxigênio, formando, durante as reações, uma série de intermediários tóxicos e reativos que são as ERO (68).



O rompimento das ligações entre as moléculas também pode levar à formação de RL. Na fissão homolítica, cada elemento fica com um elétron desemparelhado, formando, assim, dois RL. Na fissão heterolítica, não há formação de RL, pois um elemento fica com os dois elétrons (com carga negativa) e o outro elemento fica sem nenhum elétron (com carga positiva) (69).



Fissão Homolítica



Fissão Heterolítica

Algumas ERO também são conhecidas como radicais livres (RL). Essa denominação, no entanto, não inclui só os radicais de oxigênio, mas vários outros como o átomo de hidrogênio, os íons de metais de transição, mas também os radicais de nitrogênio como o peroxinitrito, o óxido nítrico, o dióxido de nitrogênio, etc. Portanto: RL é qualquer espécie química (átomo, molécula) capaz de existência independente, que possua um ou mais elétrons desemparelhados em qualquer orbital, normalmente no orbital mais externo” (67, 70-71).

Quando um RL reage com um composto não radical, outro RL pode ser

formado, induzindo, assim, reações em cadeia, como é o caso da lipoperoxidação (LPO). Dessa forma, podem ser produzidos efeitos biológicos distantes do sítio de geração do primeiro RL formado. As reações em cadeia têm uma série de etapas durante as quais se consome uma espécie intermediária, os reativos convertem-se em produtos e os intermediários são regenerados, permitindo que o ciclo recomece. As etapas do processo de LPO são estas: iniciação, propagação e terminação.

A iniciação é o primeiro passo das reações em cadeia, é necessário que o RL ataque uma molécula orgânica, abstraindo um átomo de hidrogênio de um grupamento químico. Na LPO, o RL é geralmente o radical hidroxil (OH[·]); o grupamento químico é um metileno pertencente a um ácido graxo poliinsaturado da membrana (72).

A retirada de um átomo de hidrogênio do grupamento metileno leva à formação de um radical centrado no carbono (-•CH-), o qual tende a se estabilizar por um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado (Figura 3). Este, por sua vez, ao se combinar com o oxigênio, produz o radical peroxil também chamado radical peróxi.

No estágio de propagação, os radicais peroxil (ROO[·]) são capazes de abstrair hidrogênio de outra molécula lipídica, ou seja, de um ácido graxo adjacente. O radical peroxil pode também se combinar com o átomo de hidrogênio que ele abstraiu, produzindo um lipídio hidroperóxido. Os lipídios hidroperóxidos decompõem-se numa reação catalisada por complexos de ferro e cobre, produzindo aldeídos como o malondialdeído, hidrocarbonetos voláteis (como o gás pentano) e outros produtos (Figura 3) (69). Foi sugerido que

reações de degradação, as quais ocorrem durante a LPO, podem originar oxigênio *singlet*, acelerando este processo (69).

Além da perda da fluidez da membrana, há também desarranjo dos receptores e potenciação da lise celular. O dano dos RL a enzimas que contêm enxofre e outras proteínas culmina em sua inativação, ligações cruzadas, de maneira aleatória, e desnaturação (73).

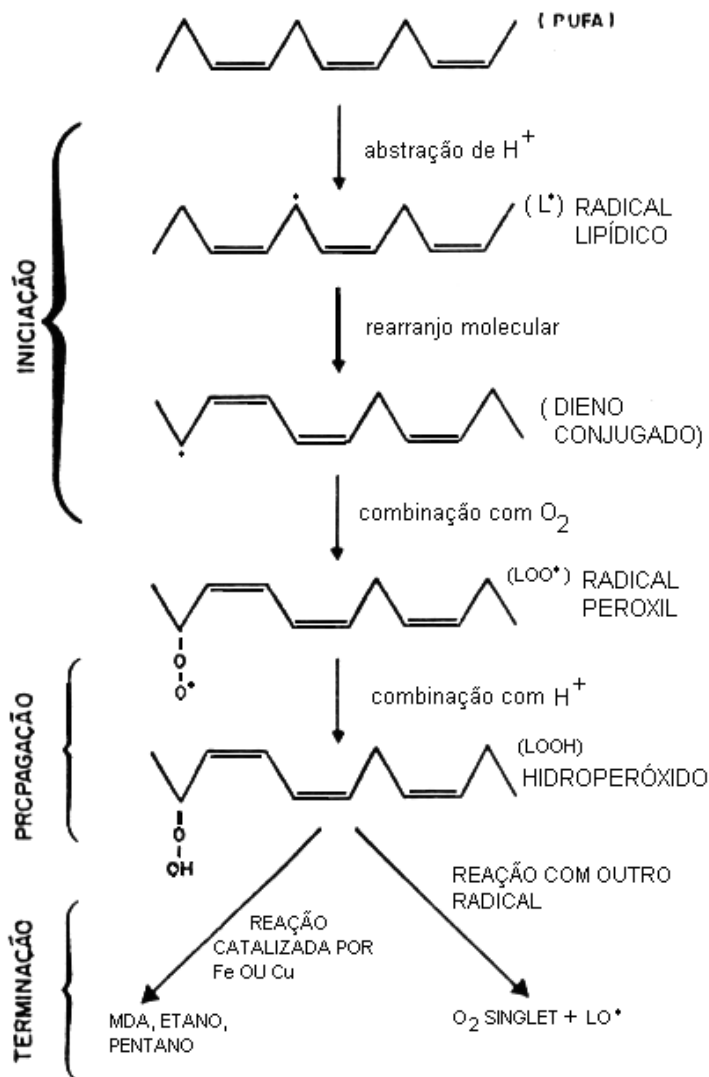


FIGURA 3: REAÇÕES EM CADEIA DA LIPOPEROXIDAÇÃO (67).

ANTIOXIDANTES

Existem defesas contra os processos mediados pelas ERO que incluem os sistemas de defesas antioxidantes (AOX). Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada às de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato de maneira enzimático ou não enzimático (69).

A defesa do organismo contra as ERO vai desde prevenção da formação das ERO, interceptação dos radicais formados, a reparo das células danificadas. Os sistemas que previnem a formação de ERO são considerados biomoléculas ligantes de metais (Fe^{2+} e Cu^+), ou seja, são os quelantes. A presença de proteínas quelantes é de vital importância aos seres vivos, pois previne as células de processos oxidativos catalisados por íons metálicos. Pigmentos especializados previnem a ação da radiação ultravioleta, a melanina e os carotenoides impedem a ação do oxigênio *singlet*. As enzimas que controlam os níveis de ERO são GPx, SOD, CAT, sendo a interceptação a desativação das ERO, quando elas são destruídas de forma a impedir a oxidação posterior de outras moléculas. A desativação final de um composto com um ou mais e^- não emparelhados consiste na formação de outro produto não radical. O interceptador (antioxidante) mais eficiente deve combinar propriedades ótimas, as quais reagem com RL iniciais, tais como, radicais peróxil (ROO^\bullet) e, posteriormente, interagem com compostos hidrossolúveis para a sua própria regeneração (74).

Os compostos hidrossolúveis transferem a função radical para longe do sítio-alvo potencial e são chamados “scavengers” de RL. A combinação de uma substância com um RL leva à formação de um não radical ou um radical menos

lesivo como, por exemplo, tocoferóis e carotenoides. As substâncias que funcionam como “quenchers” de oxigênio *singlet* são aquelas que absorvem a energia de excitação e a liberam em forma de calor ou movimento (74).

A figura 4 demonstra as principais fontes celulares de ERO e sua metabolização.

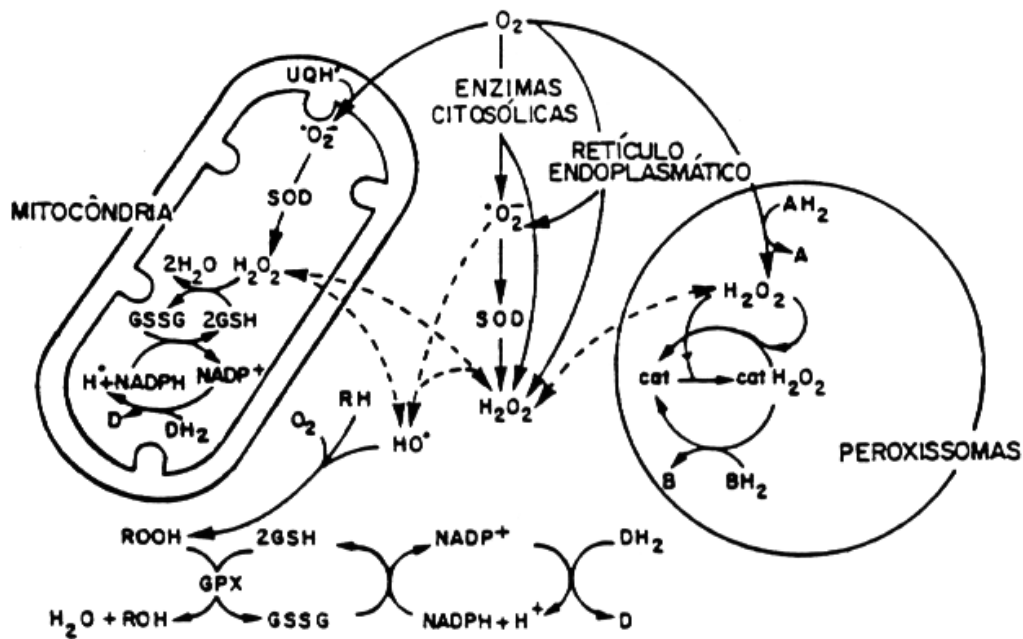


FIGURA 4: ESQUEMA GERAL DAS PRINCIPAIS FONTES CELULARES DE PRODUÇÃO E METABOLIZAÇÃO DE ERO.

UQH• = UBISSEMIQUINONA; GSSG = GLUTATIONA OXIDADA; GSH = GLUTATIONA REDUZIDA; DH2 E D = SISTEMAS REDUTORES DE NADP NÃO ESPECÍFICOS; SOD = SUPERÓXIDO DISMUTASE; GPX = GLUTATIONA PEROXIDASE; CAT = CATALASE; B E BH2 = DOADORES DE HIDROGÊNIO (75).

No mecanismo de isquemia/reperfusão, observa-se a formação de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A falta de oxigênio é lesiva, mas a falta seguida da reperfusão é muito mais lesiva, pois levará à formação de ERO, ocorrendo, então, o processo conhecido como “paradoxo do oxigênio”, que foi, primeiramente, descrito em 1973, quando foi constatado que

a reoxigenação abrupta do coração, após um episódio isquêmico, produzia alterações substanciais no músculo cardíaco (71).

ESTRESSE NITRATIVO

Óxido Nítrico (NO) é uma pequena molécula hidrofóbica que atravessa membranas celulares sem a necessidade de canais ou receptores (76). Ele é gerado pela NO sintase (NOS), através da conversão de L-arginina a citrulina. Três tipos de NOS foram identificadas: NO sintase endotelial (eNOS), que é constitutiva do endotélio vascular e conhecida por ser fortemente ativada pela entrada de cálcio através da membrana; NO sintase induzível (iNOS), que foi identificado pela primeira vez nos macrófagos e em seguida, em outras células, incluindo hepatócitos, é conhecido por *up*-regulada por citocinas pró-inflamatórias e/ou lipopolissacarídeos, e é capaz de gerar níveis baixos de NO em comparação as outras isoformas; e a NO sintase neuronal (nNOS) (77-78).

O NO exerce seus efeitos fisiológicos controlando o tom vascular, célula de adesão, a permeabilidade vascular e plaquetas de adesão (79-82). Ele também exerce potencialmente efeitos tóxicos, embora muitos deles são mais provavelmente mediado por produtos de oxidação incluídos na definição espécies reativas de nitrogênio (ERN). Em particular, NO é capaz de reagir rapidamente com $O_2^{\cdot-}$ para formar peroxinitrito ($ONOO^-$).

O $O_2^{\cdot-}$ é removida pela SOD enquanto o NO é removido como uma consequência da sua rápida difusão através dos tecidos (83). Porém, sob condições pró-inflamatórias, há produção simultânea de $O_2^{\cdot-}$ e NO, gerando significativa quantidade de $ONOO^-$, o que pode causar um prejuízo significativo às diferentes estruturas celulares (84).

O ONOO^- é um agente pró-oxidante forte, capaz de reagir diretamente com grupos tióis, centros ferro-enxofre, outros grupos ativos $-\text{SH}$ em tirosina fosfatases e em outras proteínas. Em condições fisiológicas sua produção é bastante baixa e o prejuízo oxidativo é minimizado pelas defesas antioxidantes endógenas, porém quando aumentado em condições patológicas, ONOO^- pode atuar como uma espécie pró-oxidante direta mas também de maneira indireta por decomposição em radicais livres reativos. Ele pode reagir com proteínas (nitração direta da tirosina ou reações com aminoácidos específicos), lipídios (peroxidação lipídica), podendo ser avaliado pela técnica de TBARS (85), e ácidos nucleicos (modificações oxidativas nas bases nucleicas), que pode ser avaliada pela técnica de teste cometa (86-87). Essa espécie reativa de nitrogênio (ERN) pode também interagir com mitocôndrias, atingindo compartimentos extra-mitocondriais ou ser produzido localmente através da interação do NO e $\text{O}_2^{\cdot-}$, resultando em reações oxidativas diretas de componentes principais da cadeia respiratória ou de radical livre mediando danos. Persistente geração de níveis significativos de ONOO^- pode levar a indução de morte celular, tanto por apoptose quanto necrose (84) (Figura 5).

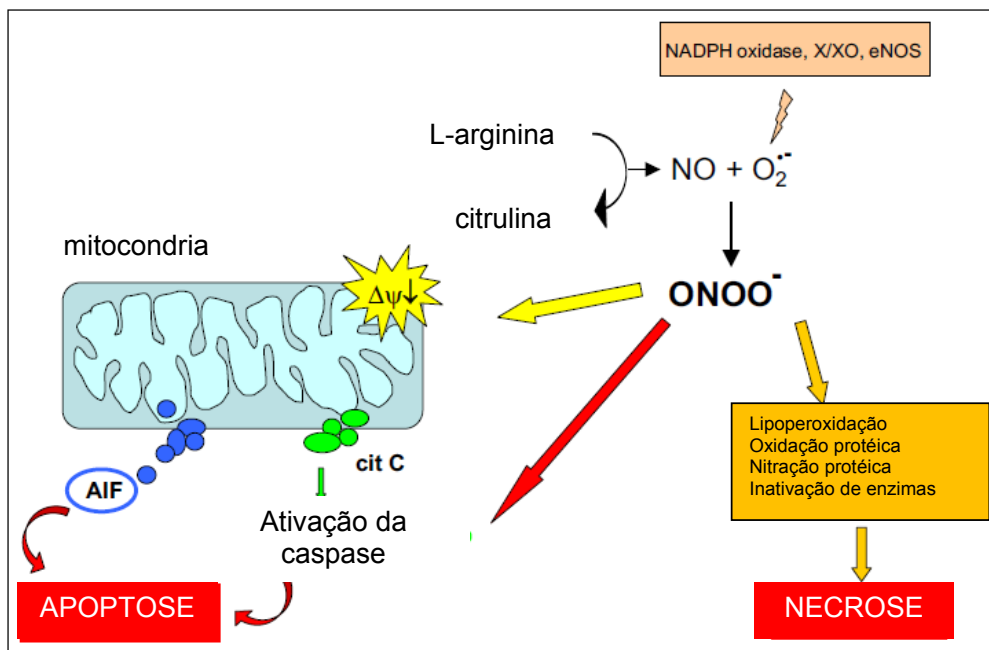


FIGURA 5: GERAÇÃO E REAÇÃO DO PEROXINITRITO.

Adaptado de Novo, 2008 (84).

MODELOS DE HIPÓXIA INTERMITENTE (HI)

Em estudos anteriores foram utilizados modelos de HI em cães, coelhos, camundongos e em culturas de células para simular os danos potenciais a que estão expostos os pacientes com síndrome das apneias obstrutivas do sono. Tais experimentos, em sua totalidade, demonstraram alterações anatômicas e funcionais na reatividade simpática e vascular à hipóxia e hipercapnia (88); na regulação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (89); na pressão arterial sistêmica (90); pressão arterial pulmonar (91); na eritropoiese e massa do ventrículo direito (92); no crescimento fetal (93); e no comportamento de crias de ratas expostas a hipóxia intermitente pré-natal (94). As consequências das apneias no SNC resultam em sinais que podem ser identificados como sonolência, aprendizado espacial (95); neurônios do hipocampo (96-97);

metabolismo lipídico cerebral (98) e serotonina (99).

HIPÓXIA E DANO HEPÁTICO

O grau de esteatose hepática está diretamente ligado ao índice de IAH, sendo reconhecido como um fator de risco (16, 100), independente de índice de massa corporal, sugerindo desempenhar um papel na patogênese de EHNA, aumentando a resistência à insulina e deve possuir uma contribuição direta da hipóxia na lesão hepática (16).

A falta de O₂ ativa o fator de transcrição hipóxia-induzível 1 alfa (Hypoxia-inducible factor 1 alpha; HIF-1 α), estimula a eritropoietina (101) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (102) o que, juntamente com os fatores de transformação de crescimento beta (TGF- β), de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1), participa da ativação de promotores e genes durante a hipóxia. Modelos de HI, em roedores, foram capazes de provocar hipertensão arterial sistêmica, resistência à insulina e dislipidemia. Estudos em humanos demonstraram que pacientes obesos com SAHOS podem ter risco aumentado de desenvolver esteato-hepatite não alcoólica e dano hepático crônico (103). HI durante doze semanas em camundongos não causou esteatose, mas determinou aumento de transaminase, colesterol, triglicérides e glicemia. Além de aumento no volume dos hepatócitos, houve acúmulo de glicogênio hepático e evidência de estresse oxidativo (23).

Em estudos com metodologia de HI que não simula SAHOS (quatro horas de oxigênio a 10% por dia) avaliou-se o endotélio, os autores mostraram que HI afeta o leito capilar pulmonar, cardíaco e cerebral (104), mas não o

hepático. Danos teciduais podem ser causados por aumento das ERO que se acumulam no fígado. O dano por ERO pode-se limitar à fase inicial da hipóxia crônica, mas pode também ocorrer em situações de HI, como na SAHOS. Fontes de ERO na hipóxia intermitente incluem xantina-oxidase derivado do endotélio, ciclo-oxigenases, lipoxigenases, eNOS, NADH-oxidase derivada de células de músculo liso vascular (105) e macrófagos ativados. Além disso, ERN podem depletar o endotélio ativando tanto proliferação quanto morte celular (106).

Apesar de dano hepático ser raro em pacientes com SAHOS, os estudos de HI em animais demonstraram diversos efeitos nocivos em doze semanas e em seis meses. Ainda não foi descrito, no entanto, o tempo que leva para a produção de ERO e dano hepático. Baseado nisso, o presente trabalho tem como fim estabelecer um protocolo de HI, simulando a apnéia do sono, e investigar o tempo necessário para o desenvolvimento de dano hepático bem como estresse oxidativo.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

Investigar o efeito de diferentes tempos de exposição à hipóxia intermitente, que simula a apneia do sono, necessário para o desenvolvimento de dano tecidual e estresse oxidativo no fígado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ∞ Verificar a integridade hepática do fígado de camundongos submetidos à HI, através da análise das enzimas séricas aminotransferases Aspartato (AST) e Alanina (ALT), e da Fosfatase Alcalina (FA);
- ∞ Avaliar os níveis de lipoperoxidação no tecido hepático através das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- ∞ Avaliar a atividade enzimática antioxidante no tecido hepático da Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx).
- ∞ Quantificar o sistema antioxidante Glutathione, através da medida das glutathionas totais.
- ∞ Avaliar o dano oxidativo ao DNA produzido pela HI através da técnica do teste cometa.
- ∞ Verificar os níveis de NO, através das medidas dos seus metabólitos nitritos e nitratos.
- ∞ Analisar, através da histologia pela coloração de hematoxilina & eosina,

os efeitos da HI sobre os tecidos hepáticos.

REFERÊNCIAS

1. Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev.* 2010 Jan;90(1):47-112.
2. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 2000 Jun 1;108(8):652-9.
3. Sen CK. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul.* 2000;36:1-30.
4. Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev.* 2003 Feb;7(1):35-51.
5. Lavie L, Vishnevsky A, Lavie P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep.* 2004 Feb 1;27(1):123-8.
6. Barcelo A, Miralles C, Barbe F, Vila M, Pons S, Agusti AG. Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea. *Eur Respir J.* 2000 Oct;16(4):644-7.
7. Itzhaki S, Dorchin H, Clark G, Lavie L, Lavie P, Pillar G. The effects of 1-year treatment with a Herbst mandibular advancement splint on obstructive sleep apnea, oxidative stress, and endothelial function. *Chest.* 2007 Mar;131(3):740-9.
8. Drazen JM. Sleep apnea syndrome. *N Engl J Med.* 2002 Feb 7;346(6):390.
9. Lavie L. Sleep-disordered breathing and cerebrovascular disease: a mechanistic approach. *Neurol Clin.* 2005 Nov;23(4):1059-75.
10. Suzuki YJ, Jain V, Park AM, Day RM. Oxidative stress and oxidant signaling in obstructive sleep apnea and associated cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med.* 2006 May 15;40(10):1683-92.
11. Lavie L. Oxidative stress--a unifying paradigm in obstructive sleep apnea and comorbidities. *Prog Cardiovasc Dis.* 2009 Jan-Feb;51(4):303-12.
12. Aalto TK, Raivio KO. Nucleotide depletion due to reactive oxygen metabolites in endothelial cells: effects of antioxidants and 3-aminobenzamide. *Pediatr Res.* 1993

Nov;34(5):572-6.

13. Szabo C, Zingarelli B, Salzman AL. Role of poly-ADP ribosyltransferase activation in the vascular contractile and energetic failure elicited by exogenous and endogenous nitric oxide and peroxynitrite. *Circ Res.* 1996 Jun;78(6):1051-63.
14. Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science.* 1994 Feb 4;263(5147):687-9.
15. Singh H, Pollock R, Uhanova J, Kryger M, Hawkins K, Minuk GY. Symptoms of obstructive sleep apnea in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci.* 2005 Dec;50(12):2338-43.
16. Tanne F, Gagnadoux F, Chazouilleres O, Fleury B, Wendum D, Lasnier E, et al. Chronic liver injury during obstructive sleep apnea. *Hepatology.* 2005 Jun;41(6):1290-6.
17. Tatsumi K, Saibara T. Effects of obstructive sleep apnea syndrome on hepatic steatosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res.* 2005 Oct;33(2):100-4.
18. Jouet P, Sabate JM, Maillard D, Msika S, Mechler C, Ledoux S, et al. Relationship between obstructive sleep apnea and liver abnormalities in morbidly obese patients: a prospective study. *Obes Surg.* 2007 Apr;17(4):478-85.
19. Kallwitz ER, Herdegen J, Madura J, Jakate S, Cotler SJ. Liver enzymes and histology in obese patients with obstructive sleep apnea. *J Clin Gastroenterol.* 2007 Nov-Dec;41(10):918-21.
20. Zamora-Valdes D, Mendez-Sanchez N. Experimental evidence of obstructive sleep apnea syndrome as a second hit accomplice in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. *Ann Hepatol.* 2007 Oct-Dec;6(4):281-3.
21. Kheirandish-Gozal L, Sans Capdevila O, Kheirandish E, Gozal D. Elevated serum aminotransferase levels in children at risk for obstructive sleep apnea. *Chest.* 2008 Jan;133(1):92-9.
22. Norman D, Bardwell WA, Arosemena F, Nelesen R, Mills PJ, Loreda JS, et al. Serum

aminotransferase levels are associated with markers of hypoxia in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep*. 2008 Jan 1;31(1):121-6.

23. Savransky V, Nanayakkara A, Vivero A, Li J, Bevans S, Smith PL, et al. Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury. *Hepatology*. 2007 Apr;45(4):1007-13.

24. Savransky V, Reinke C, Jun J, Bevans-Fonti S, Nanayakkara A, Li J, et al. Chronic intermittent hypoxia and acetaminophen induce synergistic liver injury in mice. *Exp Physiol*. 2009 Feb;94(2):228-39.

25. Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. *Sleep*. 1999 Aug 1;22(5):667-89.

26. Muller B, Gabelein WD, Schulz H. A taxonomic analysis of sleep stages. *Sleep*. 2006 Jul 1;29(7):967-74.

27. Punjabi NM. The epidemiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Feb 15;5(2):136-43.

28. Dempsey JA, Skatrud JB. A sleep-induced apneic threshold and its consequences. *Am Rev Respir Dis*. 1986 Jun;133(6):1163-70.

29. Henke KG, Dempsey JA, Kowitz JM, Skatrud JB. Effects of sleep-induced increases in upper airway resistance on ventilation. *J Appl Physiol*. 1990 Aug;69(2):617-24.

30. Lo YL, Jordan AS, Malhotra A, Wellman A, Heinzer RA, Eikermann M, et al. Influence of wakefulness on pharyngeal airway muscle activity. *Thorax*. 2007 Sep;62(9):799-805.

31. Lydic R, Orem J. Respiratory neurons of the pneumotaxic center during sleep and wakefulness. *Neurosci Lett*. 1979 Dec;15(2-3):187-92.

32. Hampl V, Cornfield DN, Cowan NJ, Archer SL. Hypoxia potentiates nitric oxide synthesis and transiently increases cytosolic calcium levels in pulmonary artery endothelial cells. *Eur Respir J*. 1995 Apr;8(4):515-22.

33. Feelisch M, Fernandez BO, Bryan NS, Garcia-Saura MF, Bauer S, Whitlock DR, et al.

Tissue processing of nitrite in hypoxia: an intricate interplay of nitric oxide-generating and -scavenging systems. *J Biol Chem*. 2008 Dec 5;283(49):33927-34.

34. Redline S, Strauss ME, Adams N, Winters M, Roebuck T, Spry K, et al. Neuropsychological function in mild sleep-disordered breathing. *Sleep*. 1997 Feb;20(2):160-7.

35. Xu W, Chi L, Row BW, Xu R, Ke Y, Xu B, et al. Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. *Neuroscience*. 2004;126(2):313-23.

36. Veasey SC, Davis CW, Fenik P, Zhan G, Hsu YJ, Pratico D, et al. Long-term intermittent hypoxia in mice: protracted hypersomnolence with oxidative injury to sleep-wake brain regions. *Sleep*. 2004 Mar 15;27(2):194-201.

37. Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med*. 2000 May 11;342(19):1378-84.

38. Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, et al. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. *JAMA*. 2000 Apr 12;283(14):1829-36.

39. Wolk R, Somers VK. Cardiovascular consequences of obstructive sleep apnea. *Clin Chest Med*. 2003 Jun;24(2):195-205.

40. Fletcher EC. Invited review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *J Appl Physiol*. 2001 Apr;90(4):1600-5.

41. Young JW, McDonald JP. An investigation into the relationship between the severity of obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome and the vertical position of the hyoid bone. *Surgeon*. 2004 Jun;2(3):145-51.

42. Lieberman DE, McCarthy RC. The ontogeny of cranial base angulation in humans and chimpanzees and its implications for reconstructing pharyngeal dimensions. *J Hum Evol*. 1999 May;36(5):487-517.

43. Lieberman DE, McCarthy RC, Hiiemae KM, Palmer JB. Ontogeny of postnatal hyoid and

larynx descent in humans. Arch Oral Biol. 2001 Feb;46(2):117-28.

44. Davidson TM. The Great Leap Forward: the anatomic basis for the acquisition of speech and obstructive sleep apnea. Sleep Med. 2003 May;4(3):185-94.

45. Horner RL, Shea SA, McIvor J, Guz A. Pharyngeal size and shape during wakefulness and sleep in patients with obstructive sleep apnoea. Q J Med. 1989 Aug;72(268):719-35.

46. Morrell MJ, Arabi Y, Zahn B, Badr MS. Progressive retropalatal narrowing preceding obstructive apnea. Am J Respir Crit Care Med. 1998 Dec;158(6):1974-81.

47. Schwab RJ, Gupta KB, Geffer WB, Metzger LJ, Hoffman EA, Pack AI. Upper airway and soft tissue anatomy in normal subjects and patients with sleep-disordered breathing. Significance of the lateral pharyngeal walls. Am J Respir Crit Care Med. 1995 Nov;152(5 Pt 1):1673-89.

48. Schwab RJ, Pasirstein M, Pierson R, Mackley A, Hachadoorian R, Arens R, et al. Identification of upper airway anatomic risk factors for obstructive sleep apnea with volumetric magnetic resonance imaging. Am J Respir Crit Care Med. 2003 Sep 1;168(5):522-30.

49. Hugel DW. Variable site of airway narrowing among obstructive sleep apnea patients. J Appl Physiol. 1986 Oct;61(4):1403-9.

50. Morrison DL, Launois SH, Isono S, Feroah TR, Whitelaw WA, Remmers JE. Pharyngeal narrowing and closing pressures in patients with obstructive sleep apnea. Am Rev Respir Dis. 1993 Sep;148(3):606-11.

51. Watanabe T, Isono S, Tanaka A, Tanzawa H, Nishino T. Contribution of body habitus and craniofacial characteristics to segmental closing pressures of the passive pharynx in patients with sleep-disordered breathing. Am J Respir Crit Care Med. 2002 Jan 15;165(2):260-5.

52. Tufik S, Santos-Silva R, Taddei JA, Bittencourt LR. Obstructive Sleep Apnea Syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. Sleep Med. 2010 Mar 31.

53. Shinohara E, Kihara S, Yamashita S, Yamane M, Nishida M, Arai T, et al. Visceral fat

accumulation as an important risk factor for obstructive sleep apnoea syndrome in obese subjects. *J Intern Med.* 1997 Jan;241(1):11-8.

54. Schwartz AR, Patil SP, Laffan AM, Polotsky V, Schneider H, Smith PL. Obesity and obstructive sleep apnea: pathogenic mechanisms and therapeutic approaches. *Proc Am Thorac Soc.* 2008 Feb 15;5(2):185-92.

55. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998 Oct 22;395(6704):763-70.

56. O'Donnell C P, Schaub CD, Haines AS, Berkowitz DE, Tankersley CG, Schwartz AR, et al. Leptin prevents respiratory depression in obesity. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 May;159(5 Pt 1):1477-84.

57. Phipps PR, Starritt E, Caterson I, Grunstein RR. Association of serum leptin with hypoventilation in human obesity. *Thorax.* 2002 Jan;57(1):75-6.

58. Barcelo A, Barbe F, Llompарт E, de la Pena M, Duran-Cantolla J, Lalaria A, et al. Neuropeptide Y and leptin in patients with obstructive sleep apnea syndrome: role of obesity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Jan 15;171(2):183-7.

59. Minoguchi K, Tazaki T, Yokoe T, Minoguchi H, Watanabe Y, Yamamoto M, et al. Elevated production of tumor necrosis factor-alpha by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest.* 2004 Nov;126(5):1473-9.

60. Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, Oda N, Minoguchi H, Yoshino G, et al. Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation.* 2003 Mar 4;107(8):1129-34.

61. Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol.* 2006 Sep;91(5):807-19.

62. Sohn HY, Krotz F, Gloe T, Keller M, Theisen K, Klauss V, et al. Differential regulation of xanthine and NAD(P)H oxidase by hypoxia in human umbilical vein endothelial cells. Role of

nitric oxide and adenosine. *Cardiovasc Res.* 2003 Jun 1;58(3):638-46.

63. Jones RD, Hancock JT, Morice AH. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? *Free Radic Biol Med.* 2000 Sep 1;29(5):416-24.

64. Neidlinger NA, Hirvela ER, Skinner RA, Larkin SK, Harken AH, Kuypers FA. Postinjury serum secretory phospholipase A2 correlates with hypoxemia and clinical status at 72 hours. *J Am Coll Surg.* 2005 Feb;200(2):173-8.

65. Farber JL, Chien KR, Mittnacht S, Jr. Myocardial ischemia: the pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J Pathol.* 1981 Feb;102(2):271-81.

66. Kono Y, Ozawa K, Tanaka J, Ukikusa M, Takeda H, Tobe T. Significance of mitochondrial enhancement in restoring hepatic energy charge after revascularization of isolated ischemic liver. *Transplantation.* 1982 Feb;33(2):150-5.

67. Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1980;492:153-68.

68. Meneghini F, Stellin L, Taraborrelli M, Parisio U. [Adenocarcinoma of the ampicrine cells of the pancreas. Histopathology and pathogenetic hypotheses]. *Ann Ital Chir.* 1987;59(1-6):249-57.

69. Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol.* 1989 Dec;70(6):737-57.

70. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of iron in oxygen radical reactions. *Methods Enzymol.* 1984;105:47-56.

71. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc.* 1988 Apr;63(4):381-9.

72. Meerson FZ, Kagan VE, Kozlov Yu P, Belkina LM, Arkhipenko Yu V. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. *Basic Res Cardiol.* 1982 Sep-Oct;77(5):465-85.

73. Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant

nutrients. *FASEB J.* 1987 Dec;1(6):441-5.

74. Chance B, Schoener B, Oshino R, Itshak F, Nakase Y. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem.* 1979 Jun 10;254(11):4764-71.

75. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):315-424.

76. Ignarro LJ, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1985;25:171-91.

77. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1987 Nov;92(3):639-46.

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

79. Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Aug 2;91(16):7583-7.

80. Butler AR, Megson IL, Wright PG. Diffusion of nitric oxide and scavenging by blood in the vasculature. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Sep 16;1425(1):168-76.

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

82. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.

83. Picada JN, Flores DG, Zettler CG, Marroni NP, Roesler R, Henriques JA. DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003 May 26;114(1):80-5.

84. Speit G, Hartmann A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol.* 1999;113:203-12.

85. Greenberg HE, Sica A, Batson D, Scharf SM. Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. *J Appl Physiol.* 1999 Jan;86(1):298-305.
86. Patt S, Danner S, Theallier-Janko A, Breier G, Hottenrott G, Plate KH, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor in severe chronic brain hypoxia of the rat. *Neurosci Lett.* 1998 Aug 21;252(3):199-202.
87. Brooks D, Horner RL, Kozar LF, Render-Teixeira CL, Phillipson EA. Obstructive sleep apnea as a cause of systemic hypertension. Evidence from a canine model. *J Clin Invest.* 1997 Jan 1;99(1):106-9.
88. Fagan KA. Selected Contribution: Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia. *J Appl Physiol.* 2001 Jun;90(6):2502-7.
89. McGuire M, Bradford A. Chronic intermittent hypoxia increases haematocrit and causes right ventricular hypertrophy in the rat. *Respir Physiol.* 1999 Sep 1;117(1):53-8.
90. Schwartz JE, Kovach A, Meyer J, McConnell C, Iwamoto HS. Brief, intermittent hypoxia restricts fetal growth in Sprague-Dawley rats. *Biol Neonate.* 1998;73(5):313-9.
91. Hermans RH, Hunter DE, McGivern RF, Cain CD, Longo LD. Behavioral sequelae in young rats of acute intermittent antenatal hypoxia. *Neurotoxicol Teratol.* 1992 Mar-Apr;14(2):119-29.
92. Row BW, Liu R, Xu W, Kheirandish L, Gozal D. Intermittent hypoxia is associated with oxidative stress and spatial learning deficits in the rat. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Jun 1;167(11):1548-53.
93. Goldbart A, Cheng ZJ, Brittan KR, Gozal D. Intermittent hypoxia induces time-dependent changes in the protein kinase B signaling pathway in the hippocampal CA1 region of the rat. *Neurobiol Dis.* 2003 Dec;14(3):440-6.
94. Goldbart A, Row BW, Kheirandish L, Schurr A, Gozal E, Guo SZ, et al. Intermittent hypoxic exposure during light phase induces changes in cAMP response element binding

- protein activity in the rat CA1 hippocampal region: water maze performance correlates. *Neuroscience*. 2003;122(3):585-90.
95. Alberghina M, Giuffrida AM. Effect of hypoxia on the incorporation of [2-3H] glycerol and [1-14C]-palmitate into lipids of various brain regions. *J Neurosci Res*. 1981;6(3):403-19.
96. McNamara MC, Gingras-Leatherman JL, Lawson EE. Effect of hypoxia on brainstem concentration of biogenic amines in postnatal rabbits. *Brain Res*. 1986 Mar;390(2):253-8.
97. Shpirer I, Copel L, Broide E, Elizur A. Continuous Positive Airway Pressure Improves Sleep Apnea Associated Fatty Liver. *Lung*. 2010 Jan 12.
98. Satoh K, Kagaya Y, Nakano M, Ito Y, Ohta J, Tada H, et al. Important role of endogenous erythropoietin system in recruitment of endothelial progenitor cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Circulation*. 2006 Mar 21;113(11):1442-50.
99. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996 Sep;16(9):4604-13.
100. Savransky V, Bevans S, Nanayakkara A, Li J, Smith PL, Torbenson MS, et al. Chronic intermittent hypoxia causes hepatitis in a mouse model of diet-induced fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Oct;293(4):G871-7.
101. Kalaria RN, Spoor L, Laude EA, Emery CJ, Thwaites-Bee D, Fairlie J, et al. Hypoxia of sleep apnoea: cardiopulmonary and cerebral changes after intermittent hypoxia in rats. *Respir Physiol Neurobiol*. 2004 Apr 20;140(1):53-62.
102. Sakao S, Taraseviciene-Stewart L, Wood K, Cool CD, Voelkel NF. Apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells stimulates vascular smooth muscle cell growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Sep;291(3):L362-8.
103. Demiryurek AT, Wadsworth RM. Superoxide in the pulmonary circulation. *Pharmacol Ther*. 1999 Dec;84(3):355-65.

ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo submetido à "Sleep Medicine" enviado dia 04 de maio de 2010 registrado pelo número SLEEP-D-10-00183.

HEPATIC OXIDATIVE STRESS IN AN ANIMAL MODEL OF SLEEP

APNOEA: EFFECT OF DIFFERENT DURATIONS OF EXPOSURE

¹Darlan Pase da Rosa*

Porto Alegre/RS – Brasil; CEP 90670-001; telefone: +55 (55) 51-34079135; fax: +55 (51) 3308-5606; e-mail: darlanpr@yahoo.com.br

¹Denis Martinez

Porto Alegre/RS – Brasil; CEP 90670-001; telefone: +55 (55) 51-84027273; fax: +55 (51) 3308-5606; e-mail: denis@sono.com.br

²Jaqueline Nascimento Picada

Canoas/RS – Brasil; CEP 90670-001; telefone: +55 (55) 51-99589266; e-mail: jnpicada@cpovo.net

²Juliane Garcia Semedo

Canoas/RS – Brasil; CEP 90670-001; telefone: +55 (55) 51-91731427; e-mail: juliane_semedo@hotmail.com

^{1,2}Norma Anair Possa Marroni

Porto Alegre/RS – Brasil; CEP 91760-470; telefone: +55 (55) 51-32483202; fax: +55 (51) 3308-5606; e-mail: nmarroni@terra.com.br

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil;

²Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Universidade Luterana do Brasil, Rio Grande do Sul, Brasil.

ABSTRACT

Introduction: Repeated apnoea events cause intermittent hypoxia (IH), which alters the function of various systems and produces free radicals and oxidative stress.

Methods: We investigated hepatic oxidative stress in CF-1 mice subjected to intermittent hypoxia, simulating sleep apnoea. Three groups were submitted to 21 days of IH (IH-21), 35 days of IH (IH-35), or 35 days of sham IH. We assessed the oxidative damage to lipids by TBARS and to DNA by comet assay; hepatic tissue inflammation was assessed in HE-stained slides. Antioxidants were gauged by catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase activity and by total glutathione.

Results: After IH-21, no significant change was observed in hepatic oxidative stress. After IH-35, significant oxidative stress, lipid peroxidation, DNA damage and reduction of endogenous antioxidants were detected.

Conclusion: In an animal model of sleep apnoea, intermittent hypoxia causes liver damage due to oxidative stress after 35 days, but not after 21 days.

KEYWORDS

Intermittent hypoxia, oxidative stress, sleep apnoea, liver

INTRODUCTION

In obstructive sleep apnoea (OSA), pharyngeal occlusion occurs, typically for 10 to 40 seconds, causing a decrease of PaO₂ and an increase in PaCO₂, ending with an arousal (1). OSA is associated with male gender, age, obesity, smoking, physical inactivity, and menopause (2). OSA is accompanied by characteristic symptoms, such as excessive daytime sleepiness, chronic fatigue, neurocognitive decline, and cardiovascular disease. Most of the consequences of OSA have been attributed to the repeated arousals and to the intermittent episodes of hypoxia (1).

Intermittent hypoxia (IH) increases liver damage (3). During hypoxia, activation of xanthine oxidase (4), NAPDH oxidase (5), and phospholipase A₂ (6) occurs, forming reactive oxygen species (ROS). Increased ROS and decreased antioxidant capacity (7-9) induce oxidative stress (10). In hypoxia, superoxide anions are formed, which, together with nitric oxide (NO), the main vasodilator, produce peroxynitrite (11-13). This reaction reduces the bioavailability of NO, attenuating NO-dependent vasodilation, capillary perfusion and expression of adhesion molecules (14-17).

The formation of ROS in OSA is similar to what occurs in ischemia–reperfusion (18). Oxidative stress leads to inflammation, recognised as a mechanism of the pathophysiology of OSA (19). Excessive formation of ROS leads to lipid peroxidation in cell membranes, protein oxidation and DNA damage (20-22). Several ROS are formed in hepatocytes through the activation of Kupffer cells and inflammatory cells (23).

Another group has exposed mice to IH and a high-cholesterol diet for 6

months, revealing the involvement of OSA in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) (3). IH aggravates paracetamol-induced liver damage after 21 days (24). There are, however, no studies specifically investigating the duration of IH exposure that causes liver damage in an animal model of sleep apnoea. This knowledge will be relevant to help design future studies.

OBJECTIVES

To establish the duration of exposure to intermittent hypoxia necessary and sufficient to trigger liver damage and oxidative stress in mice.

METHODS

The experimental procedures complied with the rules established by the “Research in Health and Animal Rights” according to the Commission of Research and Ethics in Health of the Research and Postgraduate Group of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Thirty-six male CF-1 mice (8–11 weeks old) from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa (FEPPS) were employed. They were kept at the Animal Experimentation Unit of the Research Center of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre in plastic boxes measuring 30x19x13 cm lined with wood chips, in a 12-hour dark/light cycle (light from 7 a.m. to 7 p.m.) at a temperature of 22 ± 4 °C. The mice were given food (Purina-Nutripal, Porto Alegre, RS, Brazil) and water *ad libitum*.

The animals were divided into three groups: group SO, sham operated, which suffered the simulation procedure; group IH-21, which suffered hypoxia for 21 days; and group IH-35, which suffered hypoxia for 35 days.

Animals were grouped six per cage. The flow of the mixture 90% N₂ and 10% CO₂ (eucapnic hypoxia) was controlled by a solenoid valve coupled to a timer that releases the CO₂/N₂ mixture in cycles, subjecting the animals to 480 cycles of hypoxemia. This procedure was performed daily for 21 days in the first experiment. As there was no liver change during this period, we repeated the experiment for 35 days in different mice.

On the 21st or 35th day, the animals were killed. They were first anaesthetised with ketamine hydrochloride (100 mg/kg) and xylazine hydrochloride (50 mg/kg ip). Blood was collected from the retro-orbital vein with the aid of a heparinised glass capillary (25) to complete the hepatic integrity (AST, ALT and ALP) test and comet assay. The abdomen was shaved, followed by a laparotomy, and we removed the liver of these animals for histological analysis to evaluate the test segment; the rest were frozen -80°C for later biochemical analysis. The animals were euthanised by exsanguination under deep anaesthesia (26-27).

The livers were cut with scissors and weighed. Nine millilitres of phosphate buffer (140 mM KCL, 20 mM phosphate, pH 7.4) per tissue gram was added, and tissue was homogenised in an Ultra Turrax (IKA-WERK) for 40 seconds at 4°C. Next, it was centrifuged for 10 minutes at 4,000 rpm (2150,4 x g) (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge). The supernatant was pipetted into Eppendorf flasks, and the precipitate was discarded. The

samples were stored again at -80°C for posterior analyses.

We used the Bradford method to quantify protein, with bovine albumin as the standard (SIGMA[®]). The samples were measured spectrophotometrically at 595 nm, and values expressed in mg/mL (28) were used to calculate values of TBARS (thiobarbituric acid–reactive substances) and antioxidant enzymes.

The amount of aldehydes generated by lipid peroxidation is measured by the TBARS method, which measures the amount of substances reacting with thiobarbituric acid. The samples were incubated at 100°C for 30 minutes after addition of 500 μL of 0.37% thiobarbituric acid in 15% trichloroacetic acid and centrifuged at 3000 rpm ($1612.8 \times g$) for 10 minutes at 4°C . Absorbance was determined spectrophotometrically at 535 nm (29).

The analysis of superoxide dismutase (SOD) is based on the inhibition of the reaction of the superoxide radical with adrenaline (30). The analysis of catalase (CAT) activity is based on measuring the decrease in hydrogen peroxide (31). The activity of glutathione peroxidase (GPx) is based on the consumption of NADPH in the reduction of oxidised glutathione (32). Glutathione concentration indicates the total oxidation–reduction reaction between reduced glutathione and oxidised glutathione. We measured glutathione as described previously, with a reaction medium consisting of a solution of 300 mM phosphate buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$) and a solution of dithionitrobenzoic acid (DTNB). The reaction products were read at 412 nm (33).

We used a version of the alkaline comet assay, using whole blood and liver tissue of animals. A piece of tissue was placed in tube Eppendorf

containing phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, frozen, and fragmented with forceps to obtain a cell suspension. After coating slides with agarose, cell lysis, electrophoresis, and DNA staining were subsequently quantified. The results are expressed as a damage index (DI) and frequency of damage (FD). The DI was obtained by visual assessment of damage classes (0–4), using an index that expresses the general damage suffered by a population of cells. Intact nuclei appear round (class 0, no damage), while for the damaged cells, the free DNA migrates from the nucleus toward the anode during electrophoresis, showing a "tail" of fragments sedimented, and is classified from 1 (minimal damage) to 4 (maximum damage). The FD was calculated as the ratio of cells with tails to those without tails (34-35).

The levels of nitrates and nitrites were measured by the reaction of the samples with Griess reagent. Aliquots of 50 μ L were incubated with enzyme cofactors and nitrate reductase for 30 minutes at room temperature for the conversion of nitrate to nitrite. The nitrite formed was then analysed by reaction with the Griess reagent, forming a coloured compound that was measured by spectrophotometer at a wavelength of 540 nm (36).

For histological evaluation, part of the liver was preserved in 10% formalin for 24 hours, embedded in paraffin, and cut into 6- μ m sections with a microtome. Hematoxylin & eosin staining was done for visualisation and quantification by histological scoring.

The results are expressed as mean \pm standard error. We used Fisher's exact test to evaluate the histological scores, ANOVA and Student's t-test for comparing groups. The significance level was 5% ($p < 0.05$).

RESULTS

The circulating levels of the liver enzymes aspartate aminotransferase (AST), alanine amino transferase (ALT), and alkaline phosphatase (ALP), all markers of liver damage, showed no significant difference between the IH-21 group and the SO. The IH-35 group showed significantly increased levels ($p < 0.05$) compared to the sham operated group (Table 1).

Serum lipid peroxidation measured by the TBARS technique showed no oxidative damage in group IH-21 compared to SO. However, there was significant damage in the lipid membrane of hepatocytes in mice subjected to hypoxia for 35 days (Figure 1). Evaluation of the antioxidant enzymes showed a significant decrease in the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) in liver tissue with intermittent hypoxia for 35 days (Table 2). The quantification of total endogenous glutathione in the liver showed a significant decrease in the 35-day hypoxia group compared with the sham operated (Figure 2). These results demonstrate that IH induced a decrease in the endogenous antioxidant defence.

The assessment of DNA damage by the comet test showed that the damage in blood did not differ between groups, but the liver tissue exhibited a significant increase in DNA damage in group IH-35 compared with SO (Table 3).

In the assessment of metabolites of nitric oxide in liver tissue of mice subjected to IH for 35 days, we noted a significant increase in NO in these

animals compared with SO (Table 4).

Several histological liver changes were also observed: ballooning, steatosis, necrosis and the presence of neutrophils (Figure 3A and 3B). However, when we assessed damage scores, no statistical difference existed between the sham operated and hypoxia groups after 35 days.

DISCUSSION

We report for the first time that 35 but not 21 days of exposure to IH, simulating an OSA of 60 events per hour, causes hepatic damage. This is also the first report to combine the description of enzyme, lipid, DNA, oxidative, and nitrosative hepatic damage. We used an experimental model that suffers comparable amounts of apnoea to those observed in patients with severe OSA (24, 37). Although our findings cannot be immediately translated to the clinical setting, they are in agreement with the literature indicating an OSA-NASH association (38-39).

Two mechanisms are proposed for the morbidity caused by OSA: the activation of inflammatory factors and oxidative stress (40-41), which also can be modulated by genetic, lifestyle and environmental factors (41-42). Oxidative stress plays an important role in various diseases as well as in OSA, which causes an effect similar to ischemia–reperfusion (18) in which there is activation of xanthine oxidase, leading to the formation free radicals and further imbalance between oxidants and antioxidants (4-6).

The analysis of liver integrity showed that the liver tissue of mice

subjected to intermittent hypoxia was damaged, but only after 35 days, as demonstrated by the significant increase in circulating AST, ALT and alkaline phosphatase. This damage was confirmed by histological examination, which indicated ballooning, steatosis, necrosis and the presence of neutrophils in the liver.

In the evaluation of hepatic lipid peroxidation, we observed a significant increase in lipid oxidative damage in animals that were subjected to hypoxia for 35 days, as indicated by the TBARS test, but not in group IH-21. This damage can be caused by the increase of free radicals in the liver tissue. Similar data have been reported in other studies of intermittent hypoxia (43-45) and by our lab in other experimental models of hepatic oxidative damage (46-51).

As we did not observe liver damage in animals exposed to IH for 21 days, by the liver enzyme, histological, or lipid peroxidation assays, we concluded that this duration of IH causes no damage to the organ, and this group was therefore excluded from additional assessments, which were only conducted on the IH-35 and sham operated groups.

Quantification of DNA damage by the comet test revealed a significant increase in group IH-35 over the sham operated mice. Therefore, oxidative damage caused by hypoxia–reoxygenation induces damage to both lipids and DNA. Previous comet assay and TBARS data have demonstrated increased formation of free radicals in sleep apnoea patients (11). Possibly, the formation of superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2), which appear to be increased in individuals with OSA, is due to the conversion of xanthine dehydrogenase (type D) into its oxidase (type O) form in hypoxia, followed by the activation of the oxidase form during reoxygenation (normoxia) by the

Excluido: ¶

hypoxanthine formed during hypoxia. This xanthine oxidase activity generates O_2^- , H_2O_2 , and uric acid (4, 11).

Our evaluation of the endogenous antioxidant liver enzymes SOD, GPx and CAT showed that their activities were significantly decreased in mice after 35 days under intermittent hypoxia. Quantification of total glutathione revealed significant decreases in the group exposed to intermittent hypoxia compared to SO, demonstrating a reduced hepatic antioxidant defence in these animals.

The increase in TBARS and decrease in endogenous antioxidants promote oxidative stress, contributing to the deterioration of liver tissue, as evidenced in other experimental models of liver damage induced by xenobiotic agents such as carbon tetrachloride (46-47, 49, 51-52) and toluene or by surgical procedures such as ligation of the common bile duct (48, 50), developed in our laboratory.

The increased nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in the livers of IH-35 mice confirms findings by other authors, who demonstrated a significant increase of nitric oxide in animals exposed to IH simulating OSA (6min/6min) during 120 days (45), and to hypobaric hypoxia during 32 days (53). The increase of NO, along with increased free radicals, may generate nitrosative stress caused by the reaction products of these two substances, such as peroxide nitrite ($OONO^*$) formed by the reaction between NO and O_2^- (11). Much evidence indicates that oxidative and nitrosative stress have important roles in the complication of hypoxia (54). OSA is usually accompanied by arterial hypertension, pulmonary hypertension, myocardial infarction and stroke, which may be due to changes in nitric oxide production (55). Veasey et al. have

demonstrated irreversible basal forebrain nitrosative damage as a possible cause for residual sleepiness in OSA (56).

CONCLUSION

We have shown that intermittent hypoxia causes oxidative and nitrosative tissue damage in the mouse liver, as demonstrated by elevated circulating levels of liver enzymes, NO, increased damage to lipids and DNA, and reduced endogenous antioxidant defences.

In mouse models of intermittent hypoxia, exposure during 21 days to IH may be insufficient to produce hepatic oxidative damage, but during 35 days seems to be effective for the simulation of OSA as cause of oxidative and nitrosative stress.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Research Incentive Fund of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA-FIPE), the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) and the Lutheran University of Brazil (ULBRA).

Excluido:

BIBLIOGRAPHY

1. Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev.* 2010 Jan;90(1):47-112.
2. Young T, Shahar E, Nieto FJ, Redline S, Newman AB, Gottlieb DJ, et al. Predictors of sleep-disordered breathing in community-dwelling adults: the Sleep Heart Health Study. *Archives of internal medicine.* 2002 Apr 22;162(8):893-900.
3. Savransky V, Bevans S, Nanayakkara A, Li J, Smith PL, Torbenson MS, et al. Chronic intermittent hypoxia causes hepatitis in a mouse model of diet-induced fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Oct;293(4):G871-7.
4. Sohn HY, Krotz F, Gloe T, Keller M, Theisen K, Klauss V, et al. Differential regulation of xanthine and NAD(P)H oxidase by hypoxia in human umbilical vein endothelial cells. Role of nitric oxide and adenosine. *Cardiovascular research.* 2003 Jun 1;58(3):638-46.
5. Jones RD, Hancock JT, Morice AH. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? *Free radical biology & medicine.* 2000 Sep 1;29(5):416-24.
6. Neidlinger NA, Hirvela ER, Skinner RA, Larkin SK, Harken AH, Kuypers FA. Postinjury serum secretory phospholipase A2 correlates with hypoxemia and clinical status at 72 hours. *Journal of the American College of Surgeons.* 2005 Feb;200(2):173-8.
7. Christou K, Moulas AN, Pastaka C, Gourgoulianis KI. Antioxidant

capacity in obstructive sleep apnea patients. *Sleep medicine*. 2003 May;4(3):225-8.

8. Lavie L, Vishnevsky A, Lavie P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep*. 2004 Feb 1;27(1):123-8.

9. Barcelo A, Barbe F, de la Pena M, Vila M, Perez G, Pierola J, et al. Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment. *Eur Respir J*. 2006 Apr;27(4):756-60.

10. Pialoux V, Mounier R, Brown AD, Steinback CD, Rawling JM, Poulin MJ. Relationship between oxidative stress and HIF-1 alpha mRNA during sustained hypoxia in humans. *Free radical biology & medicine*. 2009 Jan 15;46(2):321-6.

11. Lavie L, Hefetz A, Luboshitzky R, Lavie P. Plasma levels of nitric oxide and L-arginine in sleep apnea patients: effects of nCPAP treatment. *J Mol Neurosci*. 2003;21(1):57-63.

12. Jordan W, Cohrs S, Degner D, Meier A, Rodenbeck A, Mayer G, et al. Evaluation of oxidative stress measurements in obstructive sleep apnea syndrome. *J Neural Transm*. 2006 Feb;113(2):239-54.

13. Phillips SA, Olson EB, Lombard JH, Morgan BJ. Chronic intermittent hypoxia alters NE reactivity and mechanics of skeletal muscle resistance arteries. *J Appl Physiol*. 2006 Apr;100(4):1117-23.

14. Bertuglia S, Giusti A. Microvascular oxygenation, oxidative stress, NO suppression and superoxide dismutase during postischemic reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Sep;285(3):H1064-71.

15. Bertuglia S, Giusti A, Del Soldato P. Antioxidant activity of nitro derivative

of aspirin against ischemia-reperfusion in hamster cheek pouch microcirculation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 Mar;286(3):G437-43.

16. Manukhina EB, Downey HF, Mallet RT. Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006 Apr;231(4):343-65.

17. Bertuglia S. Intermittent hypoxia modulates nitric oxide-dependent vasodilation and capillary perfusion during ischemia-reperfusion-induced damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Apr;294(4):H1914-22.

18. Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev.* 2003 Feb;7(1):35-51.

19. Lavie L. Oxidative stress--a unifying paradigm in obstructive sleep apnea and comorbidities. *Progress in cardiovascular diseases.* 2009 Jan-Feb;51(4):303-12.

20. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical journal.* 1984 Apr 1;219(1):1-14.

21. Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *The Biochemical journal.* 1987 Jul 1;245(1):243-50.

22. Meneghini R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free radical biology & medicine.* 1997;23(5):783-92.

23. McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, Hill D. Cytokines in

alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis.* 1999;19(2):205-19.

24. Savransky V, Reinke C, Jun J, Bevans-Fonti S, Nanayakkara A, Li J, et al. Chronic intermittent hypoxia and acetaminophen induce synergistic liver injury in mice. *Exp Physiol.* 2009 Feb;94(2):228-39.

25. Halpern BN, Pacaud A. [Technique of obtaining blood samples from small laboratory animals by puncture of ophthalmic plexus.]. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales.* 1951 Oct;145(19-20):1465-6.

26. [Anon]. AVMA updates its euthanasia guidelines. *VETERINARY RECORD.* 2007 OCT 13 2007;161(15):502-.

27. [Anon]. AVMA releases updated euthanasia guidelines. *JAVMA-JOURNAL OF THE AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION.* 2007 SEP 15 2007;231(6):827-.

28. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

29. Buege J, Aust S. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.

30. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry.* 1972 May 25;247(10):3170-5.

31. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.

32. Flohé L, Günzler W. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114-21.
33. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *The Journal of laboratory and clinical medicine.* 1963 May;61:882-8.
34. Speit G, Hartmann A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol.* 1999;113:203-12.
35. Picada JN, Flores DG, Zettler CG, Marroni NP, Roesler R, Henriques JA. DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003 May 26;114(1):80-5.
36. Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol.* 1999;301:49-61.
37. Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. *Sleep.* 1999 Aug 1;22(5):667-89.
38. Tanne F, Gagnadoux F, Chazouilleres O, Fleury B, Wendum D, Lasnier E, et al. Chronic liver injury during obstructive sleep apnea. *Hepatology.* 2005 Jun;41(6):1290-6.
39. Tatsumi K, Saibara T. Effects of obstructive sleep apnea syndrome on hepatic steatosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res.* 2005 Oct;33(2):100-4.

40. Gozal D, Crabtree VM, Sans Capdevila O, Witcher LA, Kheirandish-Gozal L. C-reactive protein, obstructive sleep apnea, and cognitive dysfunction in school-aged children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Jul 15;176(2):188-93.
41. Capdevila OS, Kheirandish-Gozal L, Dayyat E, Gozal D. Pediatric obstructive sleep apnea: complications, management, and long-term outcomes. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Feb 15;5(2):274-82.
42. Gozal D, Kheirandish L. Oxidant stress and inflammation in the snoring child: confluent pathways to upper airway pathogenesis and end-organ morbidity. *Sleep Med Rev*. 2006 Apr;10(2):83-96.
43. Park AM, Suzuki YJ. Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice. *J Appl Physiol*. 2007 May;102(5):1806-14.
44. Dutta A, Ray K, Singh VK, Vats P, Singh SN, Singh SB. L-carnitine supplementation attenuates intermittent hypoxia-induced oxidative stress and delays muscle fatigue in rats. *Exp Physiol*. 2008 Oct;93(10):1139-46.
45. Bertuglia S, Reiter RJ. Melatonin reduces microvascular damage and insulin resistance in hamsters due to chronic intermittent hypoxia. *J Pineal Res*. 2009 Apr;46(3):307-13.
46. Cremonese RV, Pereira-Filho AA, Magalhaes R, de Mattos AA, Marroni CA, Zettler CG, et al. [Experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride inhalation: adaptation of the technique and evaluation of lipid peroxidation]. *Arquivos de gastroenterologia*. 2001 Jan-Mar;38(1):40-7.
47. Pavanato A, Tunon MJ, Sanchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, Gonzalez-Gallego J, et al. Effects of quercetin on liver damage in rats with

carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 2003 Apr;48(4):824-9.

48. Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Marroni CA, Marroni N. [Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress].

Arquivos de gastroenterologia. 2005 Oct-Dec;42(4):244-8.

49. Pavanato A, Marroni N, Marroni CA, Llesuy F. Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. *Dig Dis Sci.* 2007 Oct;52(10):2616-21.

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

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

52. Pavanato MA. Ação protetora da quercetina no fígado de ratos cirróticos. Porto Alegre 2004. p. 115.

53. Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Fik and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest.* 1995 Apr;95(4):1798-807.

54. Suzuki YJ, Jain V, Park AM, Day RM. Oxidative stress and oxidant signaling in obstructive sleep apnea and associated cardiovascular diseases. *Free radical biology & medicine.* 2006 May 15;40(10):1683-92.

55. Haight JS, Djupesland PG. Nitric oxide (NO) and obstructive sleep apnea

(OSA). Sleep Breath. 2003 Jun;7(2):53-62.

56. Veasey SC, Davis CW, Fenik P, Zhan G, Hsu YJ, Pratico D, et al. Long-term intermittent hypoxia in mice: protracted hypersomnolence with oxidative injury to sleep-wake brain regions. Sleep. 2004 Mar 15;27(2):194-201.

TABLE 1. Enzymes indicating hepatic integrity: AST, ALT and alkaline phosphatase.

	SO	IH-21	IH-35	p value
AST _(U/L)	124.4 ± 6.5	94.36 ± 7.05	145.8 ± 7.2*	p=0.04
ALT _(U/L)	45.5 ± 4.0	48.50 ± 2.85	55.6 ± 1.3*	p=0.03
AP _(UL)	97.7 ± 3.1	84.25 ± 1.98	122.6 ± 2.4***	p<0.0001

Data are presented as mean ± standard error of the mean.

SO: sham operated group; IH-21: intermittent hypoxia for 21 days; IH-35: intermittent hypoxia for 35 days; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; ALP: alkaline phosphatase.

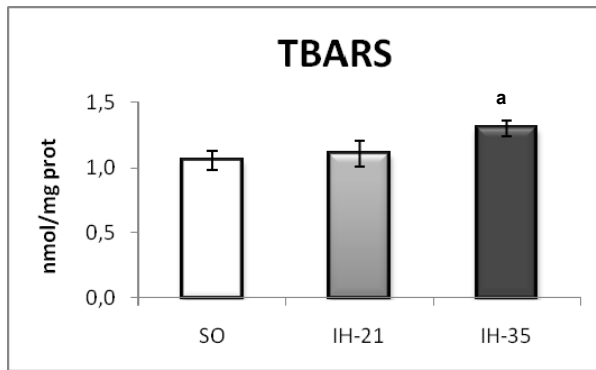


FIGURE 1. EFFECT OF INTERMITTENT HYPOXIA ON HEPATIC LIPID PEROXIDATION, EVALUATED USING THE TBARS ASSAY.

Data are mean \pm standard error of the mean.

^a, $p = 0.0182$ vs. SO.

SO: sham operated group; IH-21: intermittent hypoxia for 21 days; IH-35: intermittent hypoxia for 35 days.

TABLE 2. Activities of liver antioxidant enzymes.

	SO	IH-35	p value
SOD (USOD/mg prot)	4.63 ± 0.26	3.16 ± 0.25	0.0005
GPx (mmol/min/mg prot)	1.00 ± 0.11	0.52 ± 0.06	0.0028
CAT (pmol/mg prot)	1.06 ± 0.04	0.79 ± 0.03	0.0003

Data are mean ± standard error of the mean.

SO: sham operated group; IH-35: intermittent hypoxia for 35 days. SOD: superoxide dismutase; GPx: glutathione peroxidase; CAT: catalase.

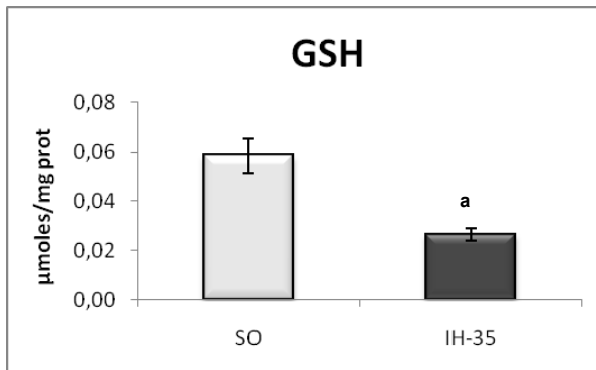


FIGURE 2. EFFECT OF INTERMITTENT HYPOXIA ON TOTAL LIVER GLUTATHIONE.

Data are mean \pm standard error of the mean.

^a, $p = 0.0008$ vs. SO.

SO: sham operated group; IH-35: intermittent hypoxia for 35 days.

TABLE 3. Comet assay on peripheral blood and liver tissues from mice subjected to hypoxia.

Tissue	SO		IH-35	
	Damage index ^a	Damage frequency ^b	Damage index	Damage frequency
Blood	15.3±4.4	7.6±1.3	19.3±4.1	8.0±1.4
Liver	38.1±5.1	14.8±1.8	114.7±32.3**	43.2±11.3**

n = 6 animals/group.

SO: sham operated group; IH-35: intermittent hypoxia for 35 days.

^a, Damage index: can range from 0 (completely undamaged, 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage, 100 x 4).

^b, Damage frequency: calculated based on the number of cells with tails versus those with no tail.

**, p<0.01, statistically significant difference from sham operated group (t-test).

TABLE 4. Quantification of nitric oxide metabolites in liver tissue.

	SO	IH-35	p value
Total Nitrate ($\mu\text{mol/L}$)	2.128 \pm 0.202	3.405 \pm 0.112	0.0001
Nitrites ($\mu\text{mol/L}$)	0.018 \pm 0.002	0.050 \pm 0.003	0.0001

Data are mean \pm standard error of the mean.

SO: sham operated group; IH-35: intermittent hypoxia for 35 days; NO₂: total nitrate; NO₃: nitrites.

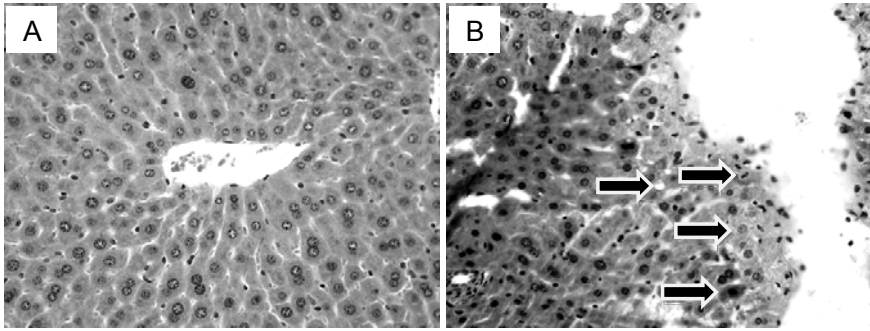


FIGURE 3. PHOTOMICROGRAPH OF MOUSE LIVER TISSUES. A. SHAM OPERATED LIVER (SO). B. INTERMITTENT HYPOXIA FOR 35 DAYS (IH-35). HEMATOXYLIN & EOSIN (40X).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ∞ Verificamos aumento significativo nas análises das enzimas séricas hepáticas (AST, ALT e FA) no grupo de animais expostos durante 35 dias à HI, não sendo encontrada diferença até os 21 dias. Esses dados demonstram dano hepático nos animais do grupo HI-35.
- ∞ Avaliando a lipoperoxidação, demonstramos que há dano oxidativo lipídico nos animais do grupo HI-35, não sendo encontrada alteração no grupo exposto durante 21 dias.
- ∞ Diminuiu significativamente a atividade das enzimas antioxidantes hepáticas (SOD, CAT e GPx), nos animais expostos por 35 dias, diminuindo assim a principal linha de defesa antioxidante endógena.
- ∞ Observamos redução na quantidade de glutathione total nos animais expostos por 35 dias.
- ∞ Verificamos, também, que o tecido hepático além de sofrer dano oxidativo lipídico, há, também, dano oxidativo ao DNA, verificado pelo teste cometa. Esses dados, juntamente com a diminuição das defesas antioxidantes, demonstram que há estresse oxidativo no tecido hepático desses animais.
- ∞ Houve aumento significativo nos metabólitos do NO nos animais do grupo HI-35, demonstrando que há um aumento de produção de NO. Podendo contribuir com estresse oxidativo, com a formação de radicais nitrativos.
- ∞ Nas histologia hepática foi confirmado os danos sugeridos pelas análises

das enzimas séricas hepáticas, onde foi encontrado necrose, balonização, esteatose e presença de neutrófilos.

ANEXOS