

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**PROTEÇÃO ANTIOXIDANTE DA QUERCETINA EM FÍGADO DE RATOS  
CIRRÓTICOS**

**Silvia Bona**

Orientadora Profa. Norma Possa Marroni

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Porto Alegre, 2010.

---

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**PROTEÇÃO ANTIOXIDANTE DA QUERCETINA EM FÍGADO DE RATOS  
CIRRÓTICOS**

**Silvia Bona**

Orientadora Profa. Norma Possa Marroni

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Porto Alegre, 2010.

---

B697p **Bona, Silvia**

Proteção antioxidante da quercetina em fígado de ratos cirróticos / Silvia Bona ; orient. Norma Possa Marroni. – 2010. 64 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. Cirrose hepática 2. Estresse oxidativo 3. Quercetina 4. Tetracloreto de carbono 5. Modelos animais de doenças I. Marroni, Norma Possa II. Título.

NLM: WI 725

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## Dedicatória

*Esta dissertação marca o resultado mais visível de um processo de construção. Se o desafio era enorme, as motivações eram grandiosas, somadas às espontâneas generosidades que fizeram possível a transformação de instantâneos momentos de angústia e sofrimento em uma estrada larga, com flores, frutos e árvores! Uma estrada toda verde, cujo nome é (não é Arvorezinha), mas sim esperança e que tem como base a busca de saberes.*

---

## **AGRADECIMENTOS**

Nada na vida conquistamos sozinhos. Muitas vezes um simples gesto pode mudar a nossa vida e contribuir para o nosso sucesso. Os resultados de um trabalho de pesquisa são adquiridos pela cooperação e pelo esforço de outros antes de nós. Este trabalho não é só meu; portanto, algumas pessoas merecem agradecimentos especiais.

A minha orientadora, Profa. Dra. Norma Marroni, por ser a grande guia, responsável direta pela missão que agora se cumpre. As indicações, as dicas, as correções, as motivações e o bom convívio. Tudo isto compõe uma soma fundamental, não só para a construção do pensamento escrito nas páginas desta dissertação, mas sim para toda uma vida a seguir. Este espaço, antes de tudo, dedica-se com carinho a esta valiosa pessoa.

A Profa. Marilene Porawski, pela paciência quando entrei no lab (2003), inexperiente e meio perdida, agradeço pelo incentivo e constante apoio.

Ao meu marido, Jader, que por vezes deve ter detestado a mim e a este trabalho, mas sempre me incentivou, apoiou e, o melhor de tudo, sempre me cobrou para que eu continuasse e concluísse mais esta etapa de nossas vidas que vamos construindo juntos. TE AMO.

Minha família merece poucas palavras, mas as mais preciosas. Obrigado por vocês existirem. Sei que vocês se orgulham por eu ter atingido mais esta etapa. Mãe, obrigado pela existência que me proporcionou; seu sofrimento a fez forte e muito me ensinou. Manos e manas, um beijo em cada um de vocês.

As amigas Lidiane Filippin e Cintia de David, que se interessaram e se fizeram presentes, foram solidárias, preocuparam-se e torceram por mim.

Ao Dr Henrique Fillmann, pelos comentários e sugestões feitas a esta dissertação.

A amiga Graziella presente nos tantos diálogos e desabafos.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Hepatologia Experimental – Fisiologia do HCPA e do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes da ULBRA, Camila, Francielli, Simone, Felipe, Darlan, Bruna, Éder, Néilson, Renata, Rafael, Juliana, Luiz, Dr. Alexandre e Dra Maria Isabel pelas sugestões e pela alegre convivência.

À CAPES, que me concedeu uma bolsa, fato este que muito contribuiu para viabilização desta dissertação.

Ao Centro de Pesquisa do HCPA, pelo suporte, que foi essencial para que esta dissertação se concluísse.

Todos vocês são coautores deste trabalho.

*“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, sem aprender a refazer, a retocar o sonho, por causa do qual a gente se pôs a caminhar.”*

**Paulo Freire**

---

## RESUMO

O uso de tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) em ratos é um modelo experimental de dano ao tecido hepático, desencadeando fibrose e, a longo prazo, cirrose. Seu metabolismo ocorre no fígado pelo citocromo P450, resultando na produção de radicais livres e estimulação da lipoperoxidação, que induz um processo de necrose, inflamação e maior progressão da fibrose. Vários antioxidantes, entre eles os flavonoides, têm sido referidos como eficazes para diminuir a fibrose em modelos animais. Este estudo pretende avaliar a ação antioxidante da quercetina (Q) em um modelo experimental de cirrose induzida por  $\text{CCl}_4$  inalatório. Foram utilizados 25 ratos Wistar machos, com peso médio de 250g, divididos em 3 grupos: Controle (CO),  $\text{CCl}_4$  e  $\text{CCl}_4$ +Q. Os ratos foram submetidos a inalações de  $\text{CCl}_4$  (2x/semana), durante 16 semanas, recebendo fenobarbital na água de beber na dose de 0,3g/dl, como indutor enzimático. A Q (50mg/Kg) via intraperitoneal foi iniciada na 10ª semana de inalação, perdurando até o final do experimento. A análise estatística foi ANOVA, seguida de Student Newman Keuls (Média $\pm$ SEM), considerando-se diferença estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ . Após o tratamento com quercetina, observamos uma melhora na integridade hepática, diminuição da fibrose, do conteúdo de colágeno e re-estabelecimento nos níveis dos metabólitos do óxido nítrico, comparado ao grupo  $\text{CCl}_4$ . Constatou-se também redução do dano oxidativo, verificada pela diminuição das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), assim como aumento na atividade das enzimas antioxidantes e da relação GSH/GSSG. A partir desses dados, sugerimos que o emprego da quercetina possa ser promissor como terapia antioxidante nas complicações hepáticas.

**Palavras Chaves:** Tetracloreto de carbono, estresse oxidativo e quercetina.



## ABSTRACT

Carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) is a classic experimental model of oxidative damage to liver tissue, causing long-term fibrosis and cirrhosis. Metabolism in the liver via cytochrome P<sub>450</sub> results in the stimulation of lipid peroxidation and production of free radicals, which induce a process of necrosis, inflammation and greater progression of fibrogenesis. Various antioxidants and flavonoids have been identified as effective in reducing fibrosis in animal models. This study aimed to assess the antioxidant activity of quercetin (Q) in an experimental model of cirrhosis induced by CCl<sub>4</sub> inhalation. We used 25 male Wistar rats (250g) that were divided into 3 groups: control (CO), CCl<sub>4</sub> and CCl<sub>4</sub> + Q. The rats were subjected to CCl<sub>4</sub> inhalation (2x/week) for 16 weeks, and they received phenobarbital in their drinking water at a dose of 0.3 g/dl as a P450 enzyme inducer. Q (50 mg/Kg) was initiated intraperitoneally at 10 weeks of inhalation and lasted until the end of the experiment. Statistical analysis was by ANOVA Student-Newman Keuls (mean ± SEM), and differences were considered statistically significant when p <0.05. After treatment with quercetin, we observed an improvement in liver integrity, decreased fibrosis, as analyzed by picrosirius for the quantification of collagen, and restored levels of nitric oxide metabolites compared with the CCl<sub>4</sub> group. It also reduced oxidative stress, as confirmed by the decrease of substances reacting to thiobarbituric acid (TBARS), the increased activity of antioxidant enzymes and the reduced glutathione ratio and glutathione disulfide (GSH/GSSG). From these data, we suggest that the use of quercetin might be promising as an antioxidant therapy in liver complications.

**Keywords:** Carbon tetrachloride, oxidative stress and quercetin.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Arquitetura hepática normal. ....	17
<b>Figura 2:</b> Célula estrelada, forma quiescente e ativada. ....	18
<b>Figura 3:</b> Arquitetura hepática com injúria crônica. ....	20
<b>Figura 4:</b> Ativação das células estreladas no processo de dano hepático. ....	21
<b>Figura 5:</b> Processo de iniciação e progressão para fibrose.....	22
<b>Figura 6:</b> Estresse oxidativo oriundo da hepatotoxicidade do CCl <sub>4</sub> . ....	24
<b>Figura 7:</b> Geração de radicais livres e a injúria hepática pela ação do CCl <sub>4</sub> .....	25
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática da reação da LPO.....	29
<b>Figura 9:</b> Interação entre as enzimas antioxidantes a os radicais livres.....	31
<b>Figura 10:</b> Estrutura básica dos flavonoides.....	33
<b>Figura 11:</b> Estrutura química da quercetina.....	36
<b>Figura 12:</b> Propriedade de quelação da quercetina com metais de transição.....	36

## LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math></b>	alfa	<b>IUPAC</b>	Organização Internacional de Química Pura e Aplicada
<b><math>\beta</math></b>	beta	<b>Kg</b>	kilogramas
<b><math>\mu\text{mol}</math></b>	micromolar	<b>LDL</b>	lipoproteínas de baixa densidade
<b>&lt;</b>	menor	<b>LPO</b>	lipoperoxidação
<b>ALT</b>	aspartato aminotransferase	<b>MEC</b>	matriz extracelular
<b>AST</b>	alanina aminotransferase	<b>mg</b>	miligrama
<b>BT</b>	bilirrubina total	<b>Mn-SOD</b>	superóxido dismutase manganês
<b>CAT</b>	catalase	<b>NADPH</b>	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
<b>CAPES</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	fator de transcrição nuclear kappa B
<b>CEH</b>	célula estrelada hepática	<b>O<sub>2</sub></b>	oxigênio singlet
<b>CCl<sub>4</sub></b>	tetracloroeto de carbono	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	radical ânion superóxido
<b>cGMP</b>	guanosina monofosfato cíclico	<b>OH<sup>•</sup></b>	radical hidroxila
<b>CO</b>	controle	<b><sup>•</sup>CCl<sub>3</sub></b>	triclorometil
<b>CuZn-SOD</b>	superóxido dismutase cobre-zinco	<b>OOCCl<sup>•</sup></b>	triclorometil peroxil
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico	<b>PDGF</b>	fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>ERN</b>	espécie reativa de nitrogênio	<b>Q</b>	quercetina
<b>ERO</b>	espécie reativa de oxigênio	<b>RL</b>	radical livre
<b>FA</b>	fosfatase alcalina	<b>SOD</b>	superóxido dismutase
<b>Fe</b>	ferro	<b>TBARS</b>	substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
<b>GPx</b>	glutaciona peroxidase	<b>TGF <math>\beta</math></b>	fator de crescimento transformante $\beta$
<b>GR</b>	glutaciona redutase	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	fator de necrose tumoral alfa
<b>GSH</b>	glutaciona reduzida	<b><math>\alpha</math></b>	alfa
<b>GSSG</b>	glutaciona oxidada	<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	alfa actina de músculo liso
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peróxido de hidrogênio	<b>UFRGS</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA</b> .....	<b>13</b>
<b>1 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1 FÍGADO</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2 CIRROSE HEPÁTICA</b> .....	<b>19</b>
<b>1.3 TETRACLORETO DE CARBONO</b> .....	<b>23</b>
<b>1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES</b> .....	<b>26</b>
1.4.1 Radicais Livres e as Espécies Reativas de Oxigênio.....	<b>26</b>
1.4.2 Defesas Antioxidantes.....	<b>30</b>
1.4.2.1 Antioxidantes enzimáticos.....	<b>30</b>
1.4.2.2 Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas.....	<b>31</b>
1.4.3 Flavonoides.....	<b>32</b>
1.4.3.1 Quercetina.....	<b>35</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>38</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>38</b>
<b>3 ARTIGO</b> .....	<b>39</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>55</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>58</b>
<b>ANEXOS (Produção Bibliográfica)</b> .....	<b>64</b>

## INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

---

As doenças hepáticas constituem um dos maiores problemas de saúde no mundo. Neste contexto, a fibrose hepática e a cirrose representam as manifestações patológicas mais comuns e figuram entre as maiores causas de mortalidade humana (Elsharkawy et al., 2005; Lotersztajn et al., 2005; Schuppan e Afdhal, 2008).

A cirrose hepática caracteriza-se pela formação de nódulos hepáticos e alteração da função hepática devido à morte dos hepatócitos e alterações anatômicas do fígado. Tais alterações estruturais constituem-se nas principais respostas do tecido hepático às inúmeras agressões de natureza inflamatória, viral, tóxica, metabólica ou congestiva (Friedman, 2003; Heidelbaugh e Sherbondy, 2006; Tsukada et al., 2006).

As apresentações clínicas da doença variam desde a ausência de sintomas até a falência total do órgão, que são determinadas pela natureza e gravidade da hepatopatia subjacente e da magnitude da fibrose estabelecida. Quando as complicações decorrentes da cirrose surgem, a deterioração hepática pode ser irreversível (Friedman, 2003; Tsukada et al., 2006).

Em virtude do grande problema mundial que a cirrose representa, muitas pesquisas acerca desta doença são realizadas em todo mundo, objetivando testar substâncias e técnicas que possam converter-se em tratamento e busca da cura, ou ao menos aumentar a sobrevida do paciente, evitando a progressão da doença.

Considerações éticas limitam procedimentos em seres humanos, reforçando a necessidade de modelos animais que reproduzem o quadro patológico da cirrose (Laleman et al., 2006).

O modelo experimental de cirrose hepática pela administração de tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) é amplamente utilizado para o estudo do desenvolvimento do processo patológico e para pesquisas alternativas de tratamento. Nesse modelo, a fibrose hepática e nódulos regenerativos são proeminentes e o padrão histológico é semelhante à cirrose humana (Cameron, 1936; Perez Tamayo, 1983; Jimenez et al., 1992; Cremonese et al., 2001; Pereira-Filho et al., 2008).

Este modelo é eficaz no desencadeamento da fibrose e, a longo prazo, da cirrose. Seu mecanismo de ação envolve sua metabolização pelo citocromo P450, que estimula a produção de radicais livres (RLs). Estes provocam necrose aos hepatócitos, induzem inflamação e promovem uma maior progressão da fibrose (Basu, 2003). Ligam-se a macromoléculas, aumentando a lipoperoxidação (LPO) e alterando a homeostase do cálcio intracelular (Recknagel et al., 1989).

Existem evidências crescentes de que alterações na homeostase redox podem desempenhar um papel significativo na patogênese de muitas doenças caracterizadas por inflamação crônica, ativação do processo de cicatrização e fibrogenese do tecido hepático (Novo e Parola, 2008). Estudos experimentais e estudos clínicos têm demonstrado que a LPO é frequentemente associada ao desenvolvimento da fibrose hepática (Tsukada et al., 2006; Fang e Lin, 2008).

A utilização de plantas medicinais e seus componentes ativos estão se tornando uma abordagem cada vez mais atraente para o tratamento de várias doenças entre pacientes que não respondem ao tratamento com medicamentos. As plantas contêm um grande número de substâncias de natureza polifenólica com capacidade de reduzir processos inflamatórios, conseqüentemente aumentando a resistência a determinadas enfermidades (Bengmark et al., 2009).

A quercetina (Q), um dos flavonoides mais encontrados, presente em grandes quantidades em vegetais, frutas, chás, vinho tinto, etc., representa um dos antioxidantes de origem vegetal com maior potencial antioxidante. Sua ingestão diária é estimada em até 25mg/dia em uma dieta humana normal (Dajas et al., 2003). Em sua estrutura química, possui grupos hidroxila fenólicos, o que lhes conferem uma ação antioxidante com importante potencial terapêutico, contra muitas doenças, incluindo doenças isquêmicas do coração, aterosclerose, fibrose hepática, lesão

renal e obstrução biliar crônica (Peres et al., 2000; Lee et al., 2003; Singh et al., 2004; Morales et al., 2006; Tokyol et al., 2006).

O uso de flavonoides como a quercetina, que apresentam uma capacidade antioxidante, pode impedir ou diminuir a progressão da fibrose, reduzindo a ação dos radicais livres de oxigênio e nitrogênio que estão relacionados com o estresse oxidativo e nitrosativo, causando o dano hepático. A quercetina pode tornar-se, no futuro, um elemento terapêutico de grande valia no tratamento de doenças hepáticas.

## 1 REFERENCIAL TEÓRICO

---

### 1.1 FÍGADO

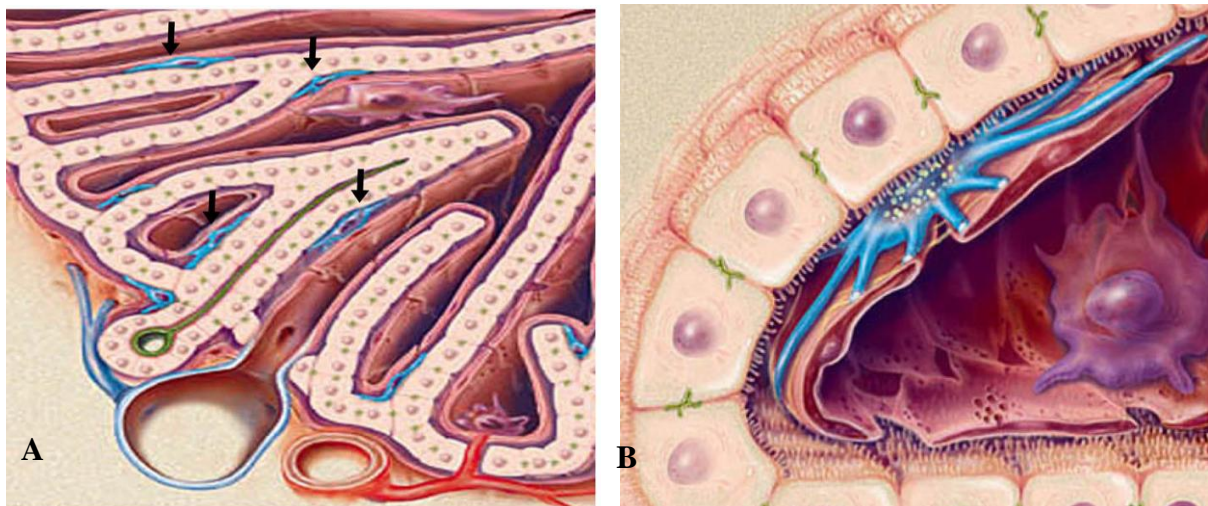
O fígado, um dos maiores órgãos do corpo humano, está situado na cavidade abdominal, abaixo do diafragma. Suas unidades morfológicas, os lóbulos hepáticos direito e esquerdo são separados por uma prega do peritônio denominada ligamento falciforme (Sherlock e Dooley, 2004). É um órgão hematopoético com capacidade regenerativa e que possui microambientes imunológicos exclusivos (Watanabe et al., 2008).

A posição ocupada pelo fígado na cavidade abdominal favorece a captura, transformação, acúmulo e neutralização de substâncias (Junqueira e Carneiro, 2004). Esse órgão desempenha importantes funções para o organismo, tais como: síntese de várias substâncias (proteínas, açúcares); secreção de sais e ácidos biliares; armazenamento (lipídios, vitaminas); biotransformação (substâncias tóxicas, drogas, hormônios, medicamentos) e metabolismo (lipídios, proteínas, carboidratos). As funções do fígado ainda incluem filtragem e armazenamento de sangue, ferro e formação de fatores de coagulação (Guyton, 2002).

No processo de biotransformação, muitos compostos são metabolizados pelo fígado que altera a sua toxicidade, reduz sua atividade e os elimina. A exposição crônica a substâncias tóxicas geralmente resulta em alteração da função orgânica, diminuição do tamanho do órgão e aumento do tecido conjuntivo, causando fibrose intra-hepática (Ramaiah et al., 2001; Friedman e Arthur, 2002).



Nos lóbulos, as células hepáticas ou hepatócitos dispõem-se em placas orientadas radialmente a partir de uma veia central e entrelaçadas de forma ordenada por sinusóides. Os sinusóides são condutos de sangue, que não possuem parede estruturada e são revestidos por dois tipos celulares: a) células endoteliais típicas dos capilares sanguíneos e b) os macrófagos que no fígado são denominados como células de Kupffer. Entre os hepatócitos e os sinusóides, encontra-se um espaço estreito, denominado espaço de Disse, onde se localizam as células estreladas hepáticas (CEHs), (**Figura 1**) (Friedman e Arthur, 2002; Friedman, 2003, 2008a).

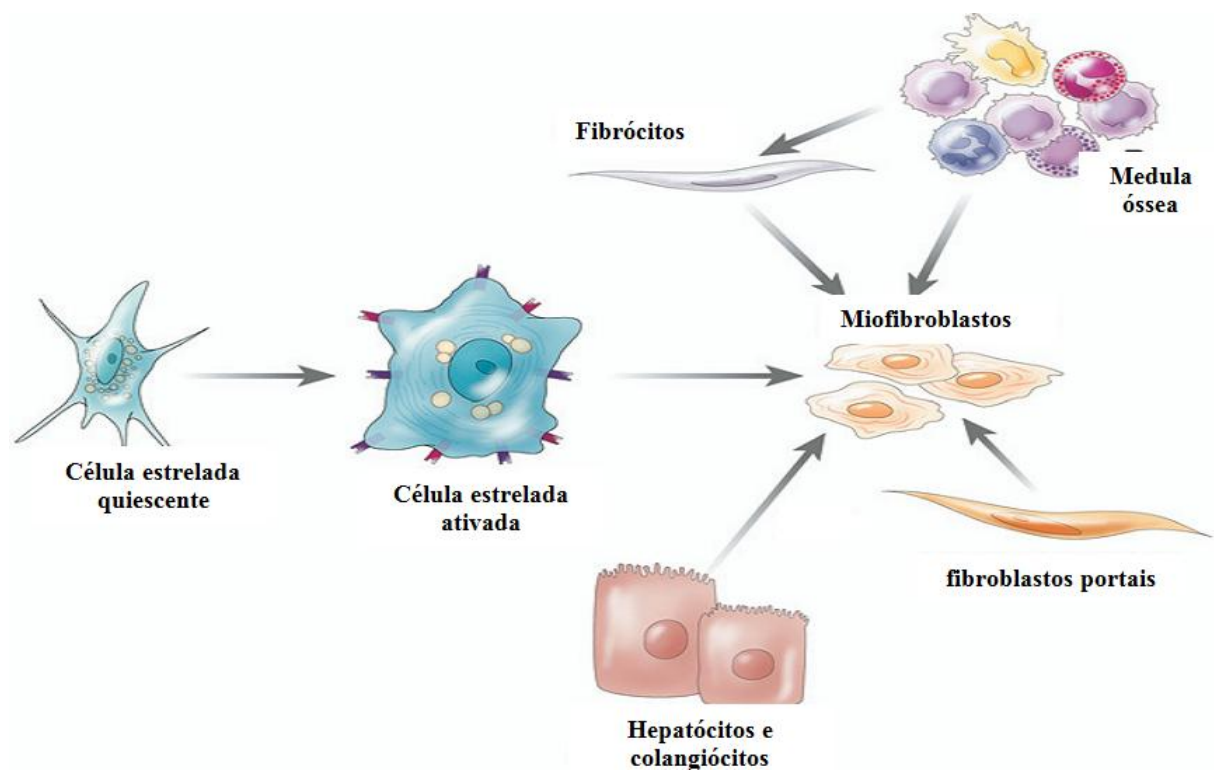


**Figura 1:** Arquitetura hepática normal. Em (A) mostra o sinusóide hepático e a presença de cordões de hepatócitos cercados por epitélio fenestrado, em (B) desenho de alta resolução do espaço subendotelial com a presença de células estreladas quiescentes (em azul) e células de Kupffer (em roxo) (Friedman e Arthur, 2002).

As células de Kupffer são macrófagos altamente móveis inseridos no revestimento do sinusóide, sobretudo na área periportal. Apresentam intensa atividade fagocitária como a fagocitose de hemácias em via de desintegração, e a consequente digestão de hemoglobina e produção de bilirrubina. Como todos os macrófagos, apresentam grande quantidade de lisossomos, que em seu interior contém enzimas necessárias para a digestão intracelular das substâncias fagocitadas, remoção por endocitose de bactérias vírus, parasitas e células tumorais (Toth e Thomas, 1992; Sherlock e Dooley, 2004).

As CEHs, também chamadas de células de Ito, estão localizadas no espaço de Disse. Possuem forma estrelada e são constituídas por longas extensões

citoplasmáticas, onde podem regular o fluxo sanguíneo e a hipertensão portal. Essas células hepáticas possuem propriedades contráteis e fibrogênicas e representam o principal local de produção de matriz extracelular (MEC) (Bataller et al., 2000; Friedman, 2008a). Constituem uma população celular heterogênea que difere na capacidade de armazenamento de lipídeos, na expressão e organização de filamentos do citoesqueleto e no potencial para a produção de MEC. Este aspecto reflete a capacidade de apresentar dois fenótipos: quiescente e ativado (**Figura 2**) (Friedman e Arthur, 2002; Friedman, 2008a, 2008b).



**Figura 2:** Célula estrelada, forma quiescente e ativada, adaptada (Friedman, 2008b).

Atualmente é bem conhecido o papel das CEHs como as principais células produtoras de colágeno em casos de lesão hepática crônica (entre outros tipos celulares como fibrócitos derivados da medula óssea e fibroblastos portais e septais), o que permite relacioná-las estritamente ao aparecimento da fibrose hepática (Li et al., 2008).

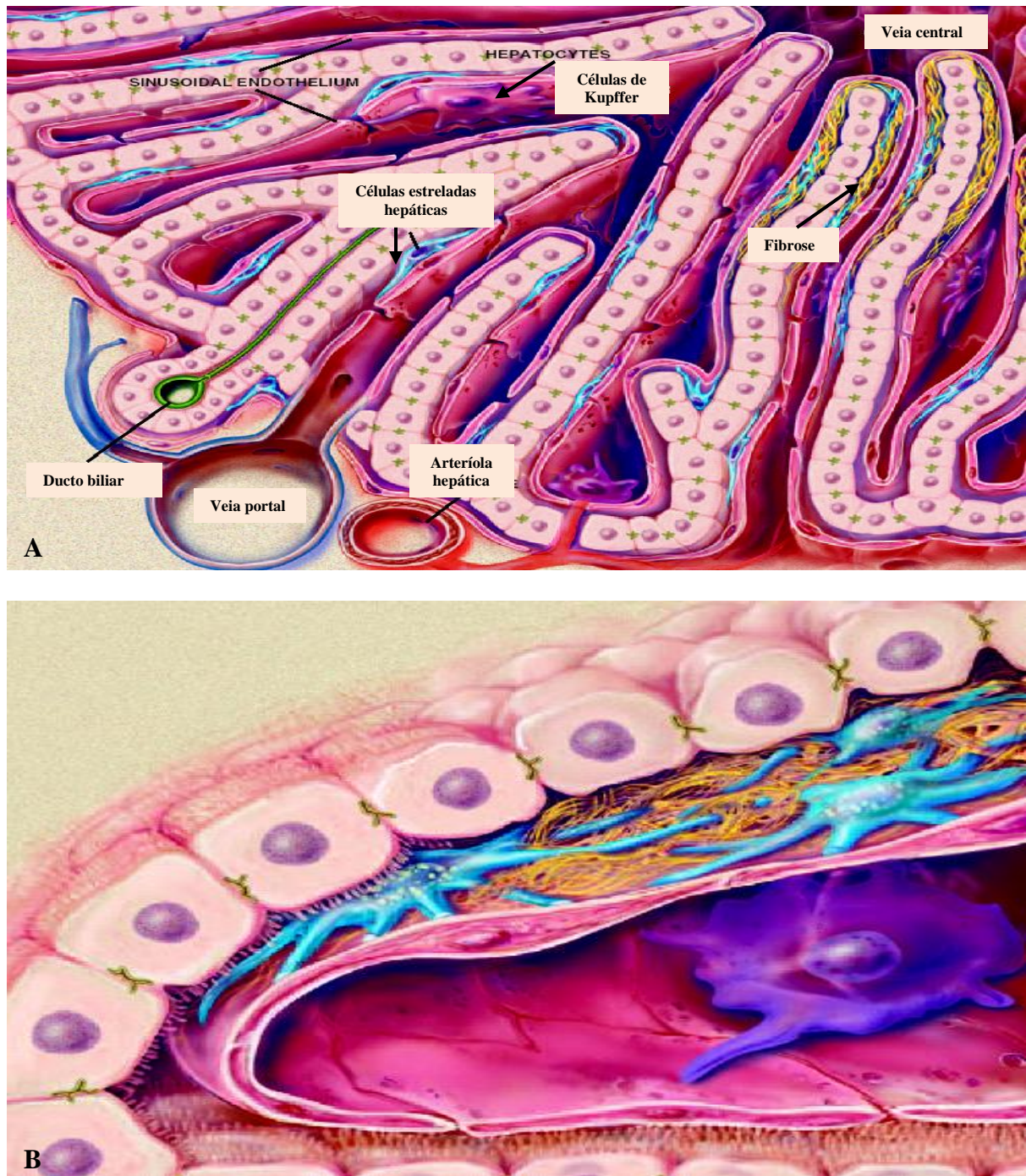
## 1.2 CIRROSE HEPÁTICA

A cirrose é considerada o estágio mais avançado da fibrose, evidenciada pela desestruturação do parênquima hepático. Está associada ao aparecimento de septos e nódulos fibróticos, alterações no fluxo sanguíneo hepático e risco de falência hepática (Friedman, 2008b).

A cirrose é a consequência de uma resposta cicatrizante a uma lesão hepática em resposta às inúmeras agressões de natureza inflamatória, tóxica, metabólica ou congestiva. Mesmo considerando que a fisiopatologia e a histopatologia da cirrose variam de acordo com o agente etiológico, o padrão histológico final é sempre o mesmo, um processo difuso caracterizado pela presença de fibrose e uma conversão da arquitetura normal do fígado em nódulos estruturais. Suas sequelas ocorrem em múltiplos órgãos e sistemas do organismo, principalmente nos sistemas cardiocirculatório, renal, de coagulação, pulmonar, neurológico e metabólico. As principais consequências são: cardiomiopatia cirrótica, varizes de esôfago (hipertensão portal), ascite, síndrome hepatorenal, síndrome hepatopulmonar, encefalopatia hepática, metabolismo de drogas alterado, osteodistrofia hepática e carcinoma hepatocelular (Sherlock e Dooley, 2004; Schuppan e Afdhal, 2008).

Na lesão hepática crônica, uma matriz fibrilar, produzida pela ativação das células estreladas, acumula-se no espaço subendotelial. Isso resulta em perda das microvilosidades dos hepatócitos, reduz o tamanho e o número das fenestrações. A colagenização do espaço de Disse resulta em menor acesso de substâncias ligadas às proteínas, ao hepatócito. Estas alterações podem ser acompanhadas pela ativação das células de Kupffer dentro dos sinusóides (**Figura 3**) (Friedman e Arthur, 2002; Friedman, 2008a, 2008b).

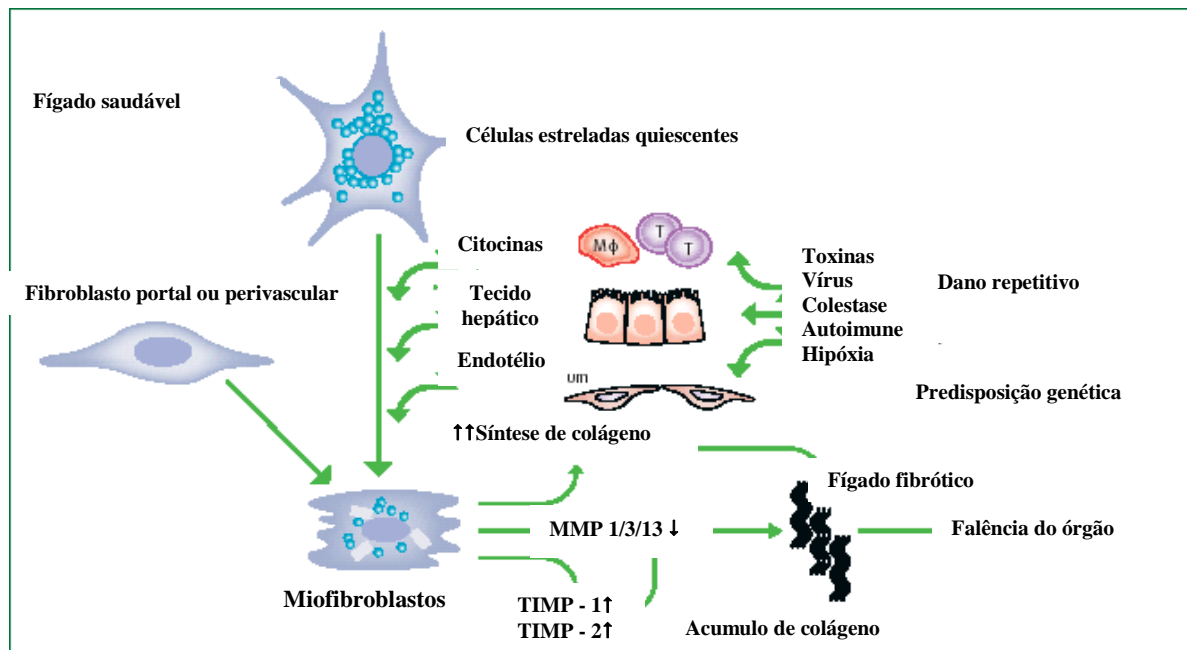




**Figura 3:** Arquitetura hepática com injúria crônica. Em (A) mostra o sinusóide hepático e a presença de cordões de hepatócitos e o acúmulo de MEC, em (B) desenho de alta resolução do espaço subendotelial com a ativação das CEHs e células de Kupffer e perda das fenestrações (Friedman e Arthur, 2002).

As células estreladas hepáticas quando ativadas, seja por qual for a etiologia, apresentam maior capacidade de proliferação, motilidade, contratilidade, síntese de colágeno e componentes da matriz extracelular. Possuem processos citoplasmáticos

aderidos aos sinusóides e podem afetar o fluxo sanguíneo sinusoidal (**Figura 4**) (Friedman, 2003; Schuppan e Afdhal, 2008).



**Figura 4:** Ativação das células esteladas no processo de dano hepático, adaptada (Schuppan e Afdhal, 2008).

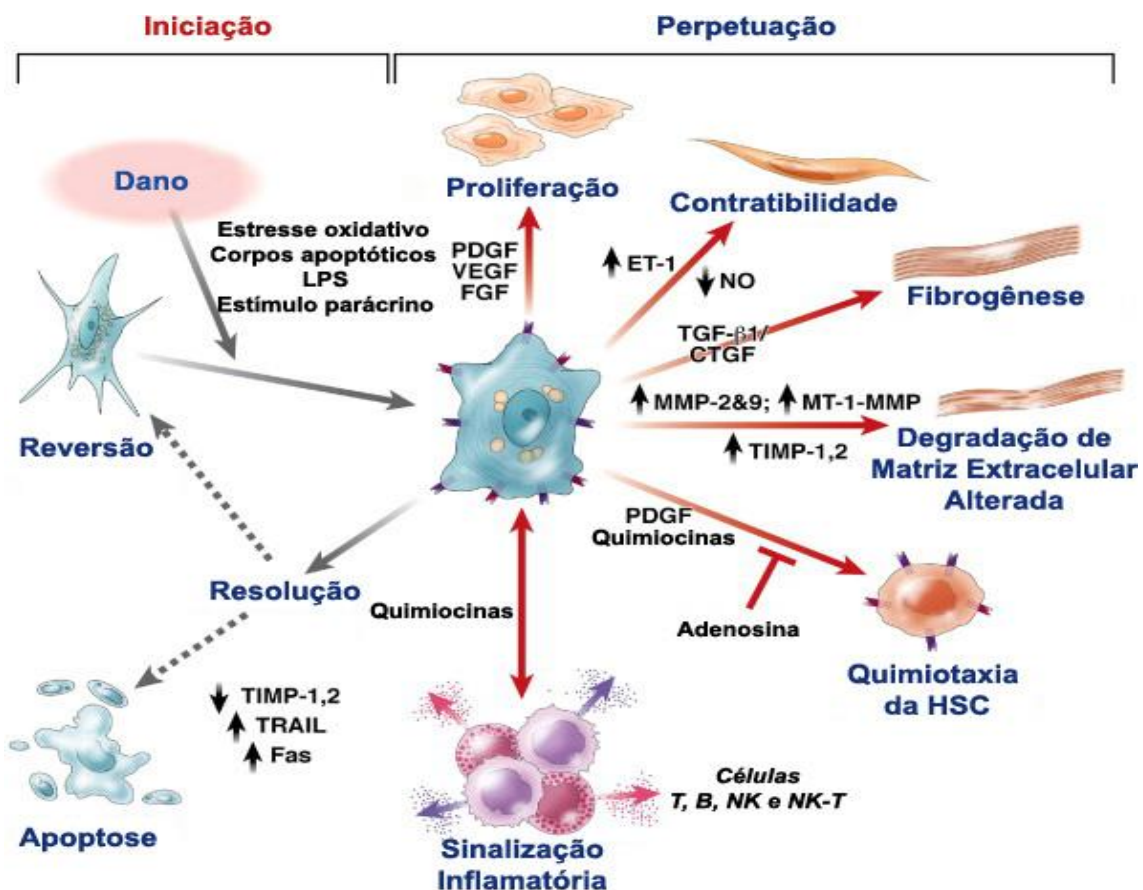
O fígado tem vários elementos celulares capazes de sintetizar e depositar os componentes da matriz extracelular (fibroblastos, miofibroblastos e até os próprios hepatócitos). Todavia, vários estudos têm demonstrado que a célula chave na produção da fibrose no fígado é a célula estrelada, sob a ação de citocinas fibrogênicas como do fator de crescimento tumoral beta (TGF- $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e outras. Diferencia-se em miofibroblasto e fibroblasto, engajando-se na ativa síntese dos elementos da matriz (colágenos, elastina, proteoglicanos e proteínas de constituição) (Friedman, 2008b).

A ativação das células esteladas consiste em duas fases: iniciação e perpetuação. A iniciação, também chamada de estágio pré-inflamatório, refere-se a alterações iniciais na expressão gênica e no fenótipo, que tornarão as células aptas a responder às citocinas e outros estímulos. A segunda fase resulta dos efeitos desses estímulos sobre a manutenção do fenótipo ativado e a produção de fibrose.

A fase de perpetuação compreende a proliferação, contratilidade, fibrogenese, perda de retinóides, infiltração de células inflamatórias e degradação de MEC.

Neste ultimo caso, ocorre uma substituição da MEC normal por tecido cicatricial, com efeitos deletérios para a função celular (**Figura 5**) (Friedman, 2008b). Essa ativação é fonte de mediadores de moléculas da matriz, proteases e seus inibidores que juntos levam à formação da cicatriz hepática. As células estreladas, bem como as de Kupffer e as plaquetas, secretam TGF- $\beta$ , o fator fibrogênico mais potente para as células estreladas (Albanis e Friedman, 2006).

Produtos da lipoperoxidação e as espécies reativas de oxigênio (EROs) são estímulos importantes na ativação das CEHs, assim como no recrutamento de células inflamatórias. Uma vez ativadas, as células estreladas secretam substâncias inflamatórias que levam à geração de um ciclo vicioso, no qual células fibrogênicas e inflamatórias estimulam-se umas às outras, fazendo perpetuar o processo hepático de dano e reparo (**Figura 5**) (Guimaraes et al., 2006).



**Figura 5:** Processo de iniciação e progressão para fibrose, adaptada (Friedman, 2008b).

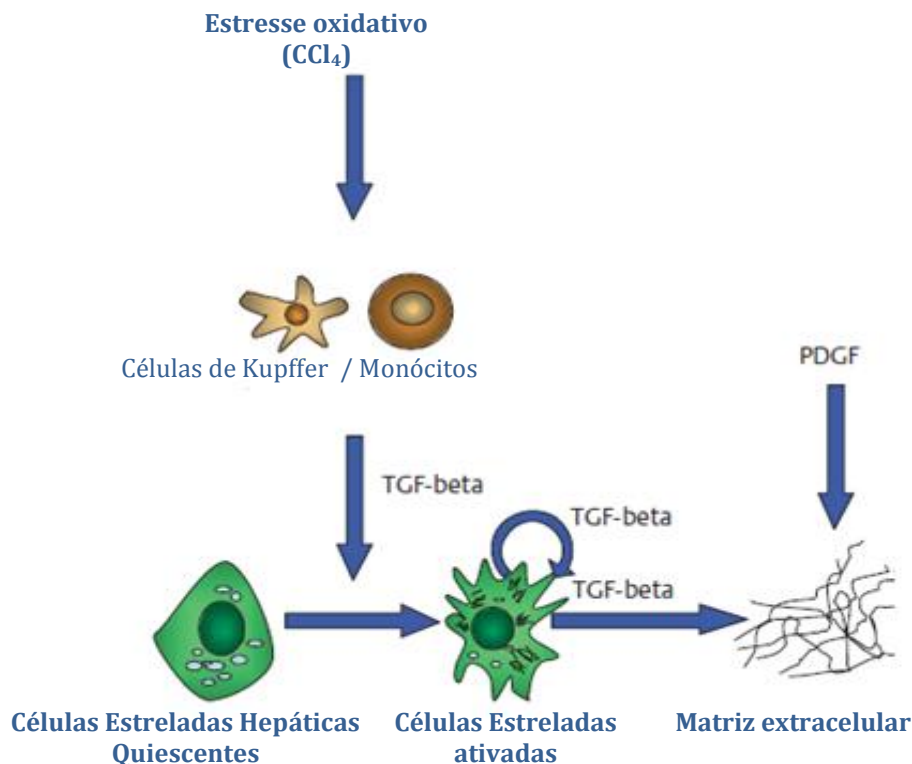
Como causa de agressão tóxica existem várias drogas capazes de reproduzir a lesão hepática experimentalmente, entre elas o CCl<sub>4</sub>, (Cameron, 1936; Jimenez et al., 1992; Cremonese et al., 2001; Pavanato et al., 2003; Pereira-Filho et al., 2008), dimethylnitrosamine (Veal, *et al.*, 2001) e a tioacetamida (Hori, *et al.*, 1993).

### 1.3 TETRACLORETO DE CARBONO

Tetracloroeto de carbono é uma hepatotóxina que causa lesão ao fígado, mediada pelo aumento de RLs e, quando administrado repetidamente com uma dose baixa, induz fibrose hepática e posteriormente cirrose (Muriel e Escobar, 2003; Weber et al., 2003). Diversos estudos utilizaram o CCl<sub>4</sub> com objetivo de estabelecer a cirrose experimental, sendo administrado por diversas vias como via inalatória (Jimenez et al., 1992; Cremonese et al., 2001; Pereira-Filho et al., 2008; da Rosa et al., 2010), intraperitoneal (Pavanato et al., 2003; del Carmen Garcíade León et al., 2006; Amalia et al., 2007), intragástrica (Goldani et al., 2007) e *in vitro* (Marumoto et al., 2008).

É um modelo experimental de cirrose que se assemelha à presença de fibrose em fígado humano causado por diferentes etiologias reproduz fielmente alterações histológicas, bioquímicas, hemodinâmicas, renais e neurohumorais. Este modelo é eficaz no desencadeamento da fibrose e a longo prazo da cirrose, servindo como um modelo de lesão hepática crônica com consequências a nível celular e molecular (**Figura 6**) (Perez Tamayo, 1983; Jimenez et al., 1992; Weiler-Normann et al., 2007).





**Figura 6:** Estresse oxidativo oriundo da hepatotoxicidade do tetracloreto de carbono, levando à ativação de células do sistema imune no fígado. Adaptada (Weiler-Normann et al., 2007).

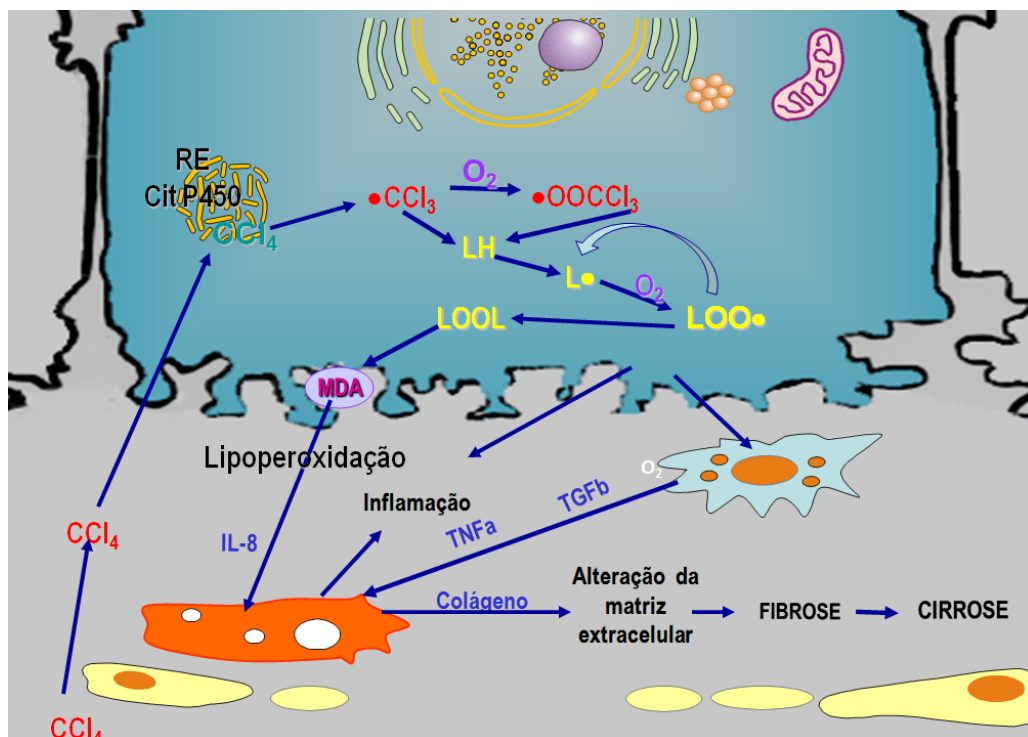
Conforme demonstrado na **figura 6**, o estresse oxidativo leva à ativação de células do sistema imune no fígado como as células Kupffer, monócitos e trombócitos. Estas células podem ser diretamente ativadas pelo tetracloreto de carbono. Qualquer ativação dessas células leva à secreção de citocinas como o TGF- $\beta$ , entre outros. TGF- $\beta$  conduzirá para uma ativação de células estreladas hepáticas que estavam quiescentes, desencadeando a ativação de várias alterações morfológicas como a expressão da alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e perda de vitamina A. Com as células estreladas ativas, ocorre produção de matriz extracelular, contribuindo para o processo de fibrose hepática. De maneira independente, o PDGF pode levar a um aumento da matriz extracelular (Weiler-Normann et al., 2007).

O mecanismo de toxicidade do CCl<sub>4</sub> (**Figura 7**) se dá pela sua conversão em metabólitos tóxicos reativos, por um complexo enzimático oxidativo, o citocromo P450 presente no retículo endoplasmático liso do fígado (Recknagel et al., 1989; Jimenez et al., 1992; Sherlock e Dooley, 2004). O metabolismo do CCl<sub>4</sub> no fígado, pelo complexo enzimático citocromo P450, resulta na produção de radicais livres



como triclorometil ( $\bullet\text{CCl}_3$ ) e triclorometil peroxil ( $\bullet\text{OCCl}_3$ ) que provocam necrose nos hepatócitos, induzem inflamação e promovem uma maior progressão da fibrose (Jimenez et al., 1992; Basu, 2003).

Estes metabólitos tóxicos reativos danificam as células através da ligação covalente direta às proteínas e aos lipídios de membrana, ou mais comumente pela formação de RLs, os quais causam auto-oxidação dos ácidos graxos poliênicos presentes dentro dos fosfolipídios da membrana (Cremonese et al., 2001). A seguir, inicia-se uma série de processos bioquímicos e fisiológicos secundários, que serão as últimas causas para o desdobramento das consequências patológicas do metabolismo do  $\text{CCl}_4$  (Cremonese et al., 2001; Lee et al., 2001). Essas alterações lesam a célula, provocando sua morte e consequente fibrose tecidual que, organizada em nódulos, caracterizará a cirrose hepática (Lee et al., 2001).



**Figura 7:** Geração de radicais livres e a injúria hepática pela ação do  $\text{CCl}_4$  Citado por (Pavanato, 2004).

A lesão hepática induzida por um metabólito tóxico é dependente da monooxigenase do citocromo P450, onde o efeito é exacerbado por indutores enzimáticos como o fenobarbital e pela redução protéica, que deprime as enzimas metabolizadoras de drogas (Calfee-Mason et al., 2002).

Foi proposto que o fenobarbital medeia a lesão hepática pelo aumento do estresse oxidativo como resultado da ativação crônica do citocromo P450 e do citocromo NADPH redutase (Waxman e Azaroff, 1992). O fator de transcrição nuclear é o responsável por alterações metabólicas em resposta à indução de isoformas do citocromo P450, o que resulta no aumento da produção de radicais livres e ERO (Torres et al., 1981; Calfee-Mason et al., 2002).

O citocromo P450 é o principal produtor de EROs nas células hepáticas. Durante seu ciclo catalítico, ocorrem diferentes reações que podem gerar espécies altamente reativas, como, por exemplo, o radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), formado durante a primeira redução monoeletrônica. O mesmo ocorre com o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), formado depois da protonação do oxi-P450 ou pela dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  (Bayol-Denizot et al., 2000).

A indução enzimática, ao aumentar a atividade das enzimas do citocromo P450, provoca aumento da produção de metabólitos tóxicos, além de estimular células estreladas hepáticas, gerando aumento na produção de colágeno, sendo que ratos previamente tratados com fenobarbital apresentam necrose de zona 3 mais intensa quando expostos ao tetracloreto de carbono, pois o principal mecanismo de toxicidade do tetracloreto de carbono ocorre através de sua metabolização pelo sistema do citocromo P450 que biotransforma o tetracloreto de carbono em um radical triclorometil. Esse radical pode combinar-se diretamente com distintas moléculas biológicas como são os lipídios da membrana, gerando a LPO (Guengerich et al., 1991; Nieto et al., 2002).

## **1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES**

### **1.4.1 Radicais Livres e as Espécies Reativas de Oxigênio**

As propriedades tóxicas do oxigênio permaneceram obscuras até a publicação do Gershman sobre a teoria da toxicidade dos RLs de oxigênio em 1954 que afirma que a toxicidade do oxigênio é parcial devido às formas reduzidas de

oxigênio (Gerschman et al., 1954). A presença de RLs em sistemas biológicos foi explorada em 1956, por Denham Harman, que propôs o conceito de que os radicais livres participam no processo de envelhecimento (Harman, 1956).

A segunda fase de pesquisas sobre RLs em sistemas biológicos foi explorada em 1969 quando McCord e Fridovich descobriram a enzima superóxido dismutase (SOD), surgindo evidências claras sobre a importância dos radicais livres em sistemas vivos (McCord e Fridovich, 1969). Uma terceira era de estudos sobre radicais livres em sistemas biológicos, ocorreu em 1977, quando Mittal e Murad apresentaram provas de que o radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ) estimula a ativação da guanilato ciclase e a formação do segundo mensageiro a guanosina monofosfato cíclico (cGMP) (Mittal e Murad, 1977).

Desde então, um grande conjunto de evidências acumulou-se de que os sistemas vivos têm, não apenas uma adaptada convivência com os RLs, mas têm desenvolvido vários mecanismos para o vantajoso uso dos RLs em várias funções fisiológicas (Valko et al., 2007).

Os radicais livres de oxigênio ou, mais genericamente, as ERO, bem como espécies reativas de nitrogênio (ERNs), são produtos do metabolismo celular normal. ERO e ERN são bem conhecidas, pois desempenham um duplo papel, uma vez que podem ser deletérias/nocivas ou benéficas para os sistemas vivos (Valko et al., 2007).

Efeitos benéficos das EROs ocorrem em baixas concentrações envolvendo funções fisiológicas como respostas celulares, por exemplo na defesa contra agentes infecciosos e na sinalização celular em diversos sistemas. O efeito nocivo dos radicais livres que causam potencial dano biológico em diversos sistemas é denominado estresse oxidativo e ou estresse nitrosativo (Valko et al., 2007).

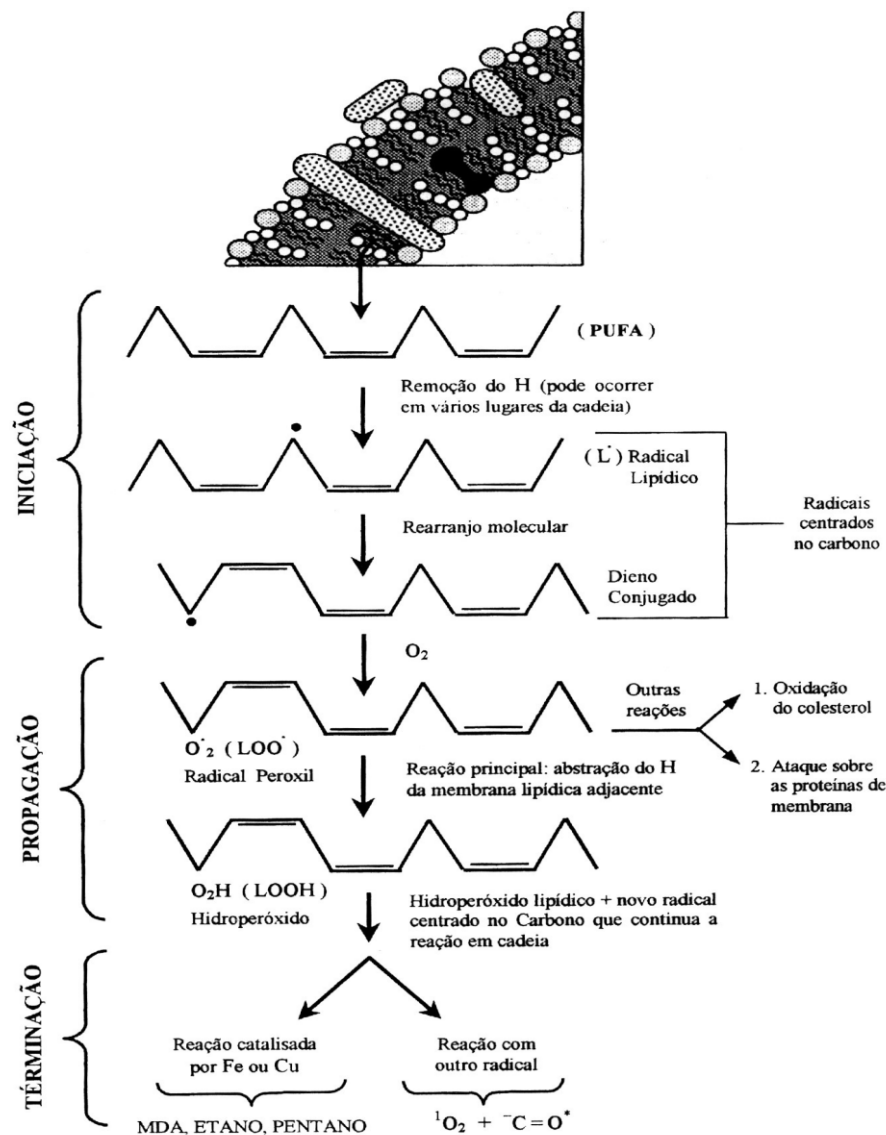
Isso ocorre em sistemas biológicos quando há de um lado uma superprodução de ERO/ERN e de outro uma deficiência de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Em outras palavras, o estresse oxidativo resulta de reações metabólicas que usam oxigênio e representa alteração no equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes em organismos vivos. O excesso de ERO pode causar danos celulares a lipídios, proteínas, ou ao DNA, inibindo a sua função normal. Devido a isso, o estresse oxidativo tem implicado um grande número de doenças em

humanos, assim como no processo de envelhecimento. O equilíbrio entre efeitos benéficos e nocivos dos radicais livres é um aspecto importante para os organismos vivos. Este equilíbrio se dá através de mecanismos chamados de "regulação redox". O processo de "regulação redox" protege do estresse oxidativo a vida de diversos organismos e mantém a "homeostase redox" (Halliwell, 1994; Halliwell e Gutteridge, 1999; Halliwell, 2000; Droge, 2002).

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons não pareados em orbitais atômicos ou moleculares (Halliwell e Gutteridge, 1999). Esse elétron não pareado(s) geralmente ocasiona um considerável grau de reatividade aos radicais livres. Radicais derivados do oxigênio representam a classe mais importante de espécies radicais geradas em sistemas vivos (Miller et al., 1990).

Os radicais livres e as EROs são consideradas hepatotóxicas em altas concentrações, devido ao seu potencial de reação com a maioria das macromoléculas celulares e enzimas inativas, causando danos ao DNA, modificando proteínas e induzindo reações de LPO (Bienert et al., 2006; Urtasun e Nieto, 2007).

A lipoperoxidação consiste numa reação em cadeia, onde é necessário que espécies reativas de oxigênio ataquem uma molécula orgânica, abstraindo um átomo de hidrogênio de um agrupamento químico (Halliwell e Gutteridge, 1999). As reações de lipoperoxidação ocorrem numa série de etapas, das quais se destacam: iniciação, propagação e terminação, conforme **(Figura 8)**.



**Figura 8:** Representação esquemática da reação da LPO (modificada de Halliwell e Gutteridge, 1999).

Os hepatócitos são uma potente fonte de RLs, quando lesados. As células de Kupffer também geram RLs em resposta à lesão hepática. Estes RLs exercem estimulação parácrina sobre as células estreladas. Além disso, sua atividade é amplificada pelo esgotamento de antioxidantes como normalmente ocorre no fígado doente (Friedman e Arthur, 2002).

### 1.4.2 Defesas Antioxidantes

A exposição aos RLs e ou as ERO tem levado os organismos a desenvolver uma série de mecanismos de defesa (Cadenas, 1997). Os mecanismos de defesa contra estresse oxidativo induzido por radicais livres envolvem: (i) mecanismos preventivos, (ii) mecanismos de reparo, (iii) defesas físicas, e (iv) as defesas antioxidantes. As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas e não enzimáticas (Masella et al., 2005).

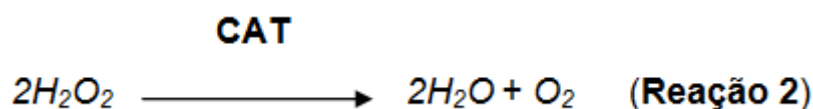
#### 1.4.2.1 Antioxidantes enzimáticos

O sistema enzimático encarregado da detoxificação das ERO é formado por várias enzimas, das quais se pode destacar: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), sendo que cada uma delas desempenha papel específico no controle do balanço oxidativo (**Figura 9**).

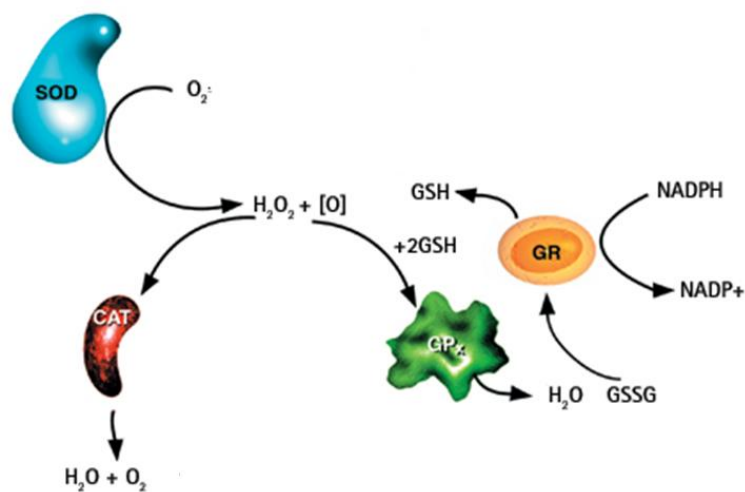
A SOD tem por principal função atuar na dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , sendo que o primeiro é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas (**Reação 1**) (Chance et al., 1979).



Os produtos finais da dismutação são o peróxido de hidrogênio e o oxigênio. O  $H_2O_2$ , apesar de não ser um radical, facilmente reage, originando o radical hidroxil. A remoção dos peróxidos ocorre por meio das enzimas CAT e da GPx, tendo a CAT mais afinidade ao peróxido de hidrogênio, peróxido de metila e etila, enquanto a GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos (Harris, 1992). A ação da CAT sobre o peróxido é apresentada na **Reação 2**.



Entre as peroxidases que geralmente usam o grupo heme sobressai-se a atividade da GP<sub>x</sub>, que se localiza no citosol e na matriz mitocondrial. Ela catalisa a redução do peróxido de hidrogênio, através da oxidação da glutathiona reduzida (GSH). Para reestabelecer a glutathiona reduzida à oxidada (GSSG), é necessário que a glutathiona redutase (GR) promova a regeneração da GSSG, consumindo NADPH, conforme demonstrado na **Figura 9** (Halliwell, 1999).



**Figura 9:** Interação entre as enzimas antioxidantes e os radicais livres.

#### 1.4.2.2 Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas

Assim como as enzimas antioxidantes, que removem radicais livres ou ERO antes que esses causem dano à membrana, existem substâncias que atuam como antioxidantes, evitando reações em cadeia como a LPO. Elas são conhecidas como defesas antioxidantes não enzimáticas, sendo as mais conhecidas a glutathiona, o ácido ascórbico (vitamina C), o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -carotenos e flavonóides (Halliwell, 1994, 2000; Masella et al., 2005).

Essas substâncias, quando atuam, podem evitar a formação de radicais livres ou ERO, inibem a cadeia de peroxidação na fase de propagação e reparam ou reconstróem a membrana.

A Glutathiona, um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular. Em particular, problemas na síntese e metabolismo da glutathiona estão associados a algumas doenças, nas quais os níveis de glutathiona e das enzimas que atuam no seu metabolismo podem ser bastante significativos no diagnóstico de alguns tipos de câncer, bem como em outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Logo, uma alta concentração de GSH intracelular protege a célula contra a ação de ERO, reagindo por via não enzimática com essas espécies. A sua ação deve-se à presença de um grupamento sulfidríla, que atua como doador de elétrons (Halliwell, 2006).

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

A forma da vitamina E com maior atividade química é o  $\alpha$ -tocoferol, que é um composto lipossolúvel, presente em altas concentrações em muitos tecidos em nível intracelular e está presente nas membranas celulares e nas lipoproteínas. Sua ação, como antioxidante, está associada à inibição da peroxidação de lipídios. Após reagir com radicais peroxil, retorna à forma de  $\alpha$ -tocoferol pela ação do ascorbato (Landvik, 2004).

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

#### 1.4.3 Flavonoides

Um grupo de antioxidantes que muitas vezes é sugerido em terapias devido ao seu potencial papel no apoio à saúde são os flavonoides. Muitos trabalhos têm mostrado a redução da fibrose em diferentes modelos experimentais de cirrose após

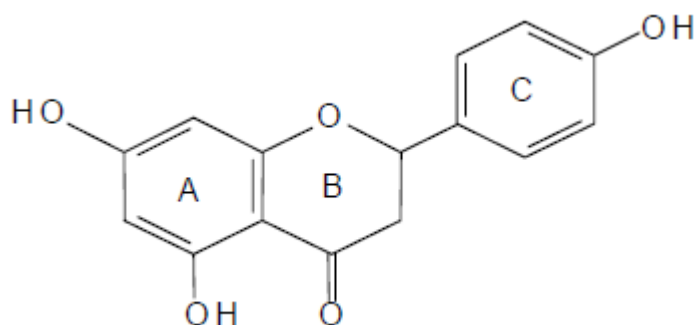


tratamento com flavonoides (Peres et al., 2000; Pavanato et al., 2003; Pereira-Filho et al., 2008; da Rosa et al., 2010), assim como da redução da hipertensão portal, uma das complicações da cirrose (Moreira et al., 2004).

Como o estresse oxidativo desempenha um papel central na patogênese e progressão de doenças hepáticas, o uso de antioxidantes tem sido proposto como agente terapêutico, bem como de drogas coadjuvantes, para compensar os danos ao fígado (Moreira et al., 2004; Vitaglione et al., 2004; Pereira-Filho et al., 2008; Tieppo et al., 2009; da Rosa et al., 2010).

Flavonoides são metabólitos secundários sintetizados pelas plantas e pertencem ao grupo dos compostos fenólicos (Rice-Evans e Miller, 1996; Huber e Rodriguez-Amaya, 2008). Atualmente, são descritos mais de 4000 tipos de flavonoides com estruturas conhecidas (Silberberg et al., 2006). A hipótese da grande diversidade estrutural dos flavonoides é a quantidade de modificações que estes compostos podem sofrer, tais como: hidroxilação, metilação, glicosilação, entre outras (Koes et al., 1994).

Sua estrutura é baseada no núcleo que consiste de dois anéis fenólicos A e B e um anel C (**Figura 10**), que pode ser um pirano heterocíclico, como no caso de flavanóis (catequinas) e antocianidinas, ou pirona, como nos flavonóis, flavonas, isoflavonas e flavanonas, que possuem um grupo carbonila na posição C-4 do anel C, compreendendo as principais classes dos flavonoides (Rice-Evans e Miller, 1996).



**Figura 10:** Estrutura básica dos flavonoides (Rice-Evans e Miller, 1996).

Com base em sua estrutura molecular, eles estão divididos em quatro grupos fundamentais: flavonas, flavanonas, flavanóis e antocianinas. A quercetina, um dos flavonoides mais estudados, pertence ao grupo das flavonas, juntamente com

kaempferol, e é encontrada em abundância em maçãs, cebolas, couves de Bruxelas ou de frutos cítricos (Nijveldt et al., 2001).

Os flavonoides (exceto as catequinas) são encontrados em plantas principalmente na forma glicosilada, ou seja, ligados a moléculas de açúcares, sendo normalmente *o*-glicosídeos, com a molécula de açúcar ligada ao grupo hidroxila na posição C3 ou C7 (Hertog et al., 1997).

Os açúcares mais comuns são D-glicose e L-ramnose; porém, pelo menos 8 monossacarídeos diferentes ou combinações destes podem ligar-se aos diferentes grupos hidroxilas do flavonóide, resultando em um grande número de glicosídeos conhecidos. As moléculas desprovidas de açúcares são denominadas agliconas (Huber e Rodriguez-Amaya, 2008) onde a presença de açúcar na estrutura molecular dos flavonoides é determinante para o sítio de absorção destes compostos (Tapiero et al., 2002).

A propriedade fundamental dessas moléculas, responsáveis por muitos dos seus efeitos benéficos é a capacidade antioxidante, vinculada a presença de uma série de características estruturais que possibilitam, entre outros, quelar íons metálicos de transição tais como  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , catalisar o transporte de elétrons e depurar RLs como o ânion superóxido, oxigênio singlet, ou para estabilizar ERO (Martinez-Florez et al., 2002).

Para que um flavonoide apresente potente ação antioxidante, ou seja, atue como um varredor de radicais livres ou ERO, é necessário que a molécula consiga doar elétrons para estabilizar um radical livre e que, ao ceder esses elétrons, rapidamente se estabilize (Carlioni et al., 2002). Acredita-se que essa capacidade de doar elétrons, com maior ou menor facilidade, potencializa ou reduz a ação antioxidante dos flavonoides e está associada à relação estrutura-atividade de cada molécula.

Para entender tal relação, é importante recordar a estrutura básica deles, pois são compostos por quinze carbonos, distribuídos em dois anéis fenólicos, conectados à unidade do carbono 3 e, normalmente, acoplados a uma molécula de açúcar, a qual incrementa sua solubilidade em água (Carlioni et al., 2002). A capacidade antioxidante dos flavonoides confere-lhe um potencial terapêutico em muitas doenças entre as quais doenças cardiovasculares (Yao et al., 2004),

hipertensão portal (Moreira et al., 2004), diabetes mellitus (Dias et al., 2005), câncer (Yang et al., 2000). Possuem também importantes efeitos antivirais e antialérgicos, bem como ação anti-trombótica e anti-inflamatória (Nijveldt et al., 2001).

São capazes de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e inibir enzimas como as prostaglandinas, lipoxigenase e ciclooxigenase, por quelar íons metálicos divalentes, reduzindo, assim, a formação de radicais livres produzidos pela reação de Fenton (Cook e Karmazyn, 1996; Rauha et al., 2000).

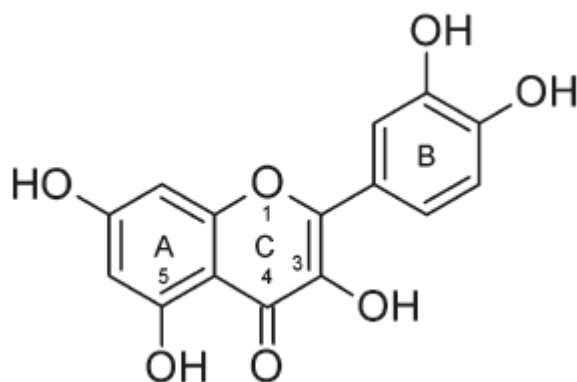
São referidos como eficazes para diminuir a fibrose em modelos experimentais de cirrose biliar secundária (Peres et al., 2000; Vercelino et al., 2008; Tieppo et al., 2009), cirrose por álcool (Pastor et al., 1997) e lesão hepática pela administração de tetracloreto de carbono (Pavanato et al., 2003; Pereira-Filho et al., 2008; da Rosa et al., 2010). Outros modos de ação também têm sido atribuídos aos flavonoides, como inibição da proliferação celular, atividade estrogênica, antiinflamatória, anticoagulante, antibacteriana (Miksicek, 1995; Wenzel et al., 2000; Orsolic et al., 2004; Gonzalez-Gallego et al., 2007).

Além da propriedade antioxidante, os flavonoides podem também agir como pró-oxidante na presença do ácido nítrico ou quando administrado em altas doses (Ferguson, 2001).

#### 1.4.3.1 Quercetina

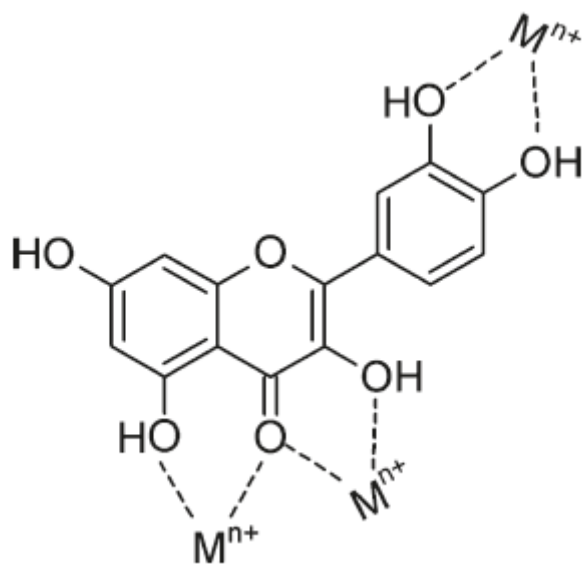
A quercetina (Q) é um flavonoide aglicona mais difundida na natureza, presente em grandes quantidades em vegetais, frutas, chás, vinho tinto, etc. Representa um dos antioxidantes de origem vegetal com maior potencial antioxidante, protegendo as células contra as ERO (Hertog e Hollman, 1996). Sua ingestão diária é estimada de até 25mg/dia em uma dieta normal humana (Dajas et al., 2003). Cientificamente a quercetina é classificada como um flavonol típico, cuja denominação é 2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxil-4H-1-benzo-piran-4-ona, também chamada de 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona pela Organização Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) (Rice-Evans e Miller, 1996).

Em sua estrutura química (**Figura 11**), possui grupos hidroxila fenólicos, o que lhe conferem uma ação antioxidante com importante potencial terapêutico contra muitas doenças, incluindo doenças hepáticas, isquêmicas do coração, aterosclerose, câncer e lesão renal (Formica e Regelson, 1995; Singh et al., 2004; Morales et al., 2006; Tokyol et al., 2006; Erdman et al., 2007).



**Figura 11:** Estrutura química da quercetina (Chobot, 2010).

A quercetina possui cinco grupos hidroxilas e um grupo ceto. Os grupos o-hidroxilas do anel B são geralmente a meta inicial de oxidantes, sendo que a atividade antioxidante dos flavonóides depende da sua propriedade redox e quelação de metais de transição (**Figura 12**) (Chobot, 2010).



**Figura 12:** Propriedade de quelação da quercetina com íons de metais de transição (Chobot, 2010).

Muitos mecanismos antioxidantes têm sido propostos para os flavonóides. Tais mecanismos incluem: a) opressão da formação de ERO pela inibição do sistema enzimático responsável pela geração de RLs; b) quelação de íons metálicos que podem iniciar a produção de radicais hidroxil pela Reação de Fenton ou Harber-Weis; c) seqüestro de radicais livres; d) regulação positiva ou proteção das defesas antioxidantes por induzir a fase II de enzimas como glutathione transferase que aumenta a excreção de espécies oxidadas ou e) indução de enzimas antioxidantes como a metalotioneína que é uma proteína queladora de metais, com propriedades antioxidantes (Pietta, 2000).

A quercetina pode inibir o processo de formação de radicais livres em três etapas diferentes, na iniciação (pela interação com íons superóxido), na formação de radicais hidroxil (por quelar íons de ferro) e na lipoperoxidação (por reagir com radicais peroxil) (Afanas'ev et al., 1989; Kahraman et al., 2003).

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

Tieppo e colaboradores em seus estudos, verificaram que o flavonóide quercetina, através de seu potencial antioxidante, exerce uma ação protetora sobre o fígado dos animais cirróticos, podendo atenuar as alterações pulmonares presentes na síndrome hepatopulmonar, caracterizando qualidades de um agente terapêutico promissor nesta doença (Tieppo et al., 2007; Tieppo et al., 2009).

Inúmeras pesquisas têm demonstrado, através de ensaio cometa, que a quercetina e outros flavonóides são capazes de proteger contra o dano ao DNA, induzido quimicamente em linfócitos humanos *in vivo* (Anderson et al., 1994; da Silva et al., 2002; Wilms et al., 2005).

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 Objetivo Geral

Verificar os efeitos do flavonoide quercetina sobre o estresse oxidativo no tecido hepático, utilizando o modelo experimental de cirrose por tetracloreto de carbono inalatório.

### 2.2 Objetivos Específicos

- 1) Verificar a integridade hepática através da análise das enzimas séricas, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e bilirrubina total (BT);
  - 2) Avaliar a histologia hepática através da coloração picrossírius;
  - 3) Quantificar o conteúdo de colágeno hepático por hidroxiprolina;
  - 4) Avaliar os metabólitos do óxido nítrico através da medida de nitritos e nitratos no fígado;
  - 5) Avaliar a lipoperoxidação hepática através do método das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
  - 6) Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx);
  - 7) Quantificar a atividade hepática da GSH e GSSG, bem como verificar a relação GSH/GSSG.
-

ANTIOXIDANT PROTECTION OF QUERCETIN IN CIRRHOTIC RATS

A ser publicado na

**Nutrición  
Hospitalaria**

---

## ANTIOXIDANT PROTECTION OF QUERCETIN IN CIRRHOTIC RATS

Silvia Bona<sup>1</sup>, Cintia de David<sup>2</sup>, Lidiane Isabel Fillipin<sup>3</sup>, Bruna Valiatti<sup>4</sup>, Ricardo Machado Xavier<sup>7</sup>, Norma Possa Marroni<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Post-Graduation Medical Sciences Program, Medical School/Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

<sup>2</sup>Post-Graduation Physiology Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

<sup>3</sup>Laboratory of Experimental Physiology and Hepatology, Laboratory of Molecular Biology of Autoimmune and Infectious Diseases, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

<sup>4</sup>Academic Course of Medicine, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Brazil.

<sup>7</sup>Rheumatology Service of HCPA/UFRGS, Laboratory of Molecular Biology of Autoimmune and Infectious Diseases, HCPA, Brazil.

<sup>8</sup>Laboratory of Experimental Physiology and Hepatology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Luterana do Brasil, Brazil

### Abstract

Carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) is a classic experimental model of oxidative damage to liver tissue, causing long-term fibrosis and cirrhosis. Metabolism in the liver via cytochrome P<sub>450</sub> results in the stimulation of lipid peroxidation and production of free radicals, which induce a process of necrosis, inflammation and greater progression of fibrogenesis. Various antioxidants and flavonoids have been identified as effective in reducing fibrosis in animal models. This study aimed to assess the antioxidant activity of quercetin (Q) in an experimental model of cirrhosis induced by CCl<sub>4</sub> inhalation. We used 25 male Wistar rats (250g) that were divided into 3 groups: control (CO), CCl<sub>4</sub> and CCl<sub>4</sub> + Q. The rats were subjected to CCl<sub>4</sub> inhalation (2x/week) for 16 weeks, and they received phenobarbital in their drinking water at a dose of 0.3 g/dl as a P450 enzyme inducer. Q (50 mg/Kg) was initiated intraperitoneally at 10 weeks of inhalation and lasted until the end of the experiment. Statistical analysis was by ANOVA Student-Newman Keuls (mean ± SEM), and differences were considered statistically significant when p <0.05. After treatment with quercetin, we observed an improvement in liver integrity, decreased fibrosis, as analyzed by picrosirius for the quantification of collagen, and restored levels of nitric oxide metabolites compared with the CCl<sub>4</sub> group. It also reduced oxidative stress, as confirmed by the decrease of substances reacting to thiobarbituric acid (TBARS), the increased activity of antioxidant enzymes and the reduced glutathione ratio and glutathione disulfide (GSH/GSSG). From these data, we suggest that the use of quercetin might be promising as an antioxidant therapy in liver complications.

**Keywords:** Carbon tetrachloride, oxidative stress and quercetin.



## Introduction

Cirrhosis is an advanced stage of liver fibrosis characterized by septae and nodule formation and altered blood flow. It occurs because of the synthesis and excessive deposition of extracellular matrix (ECM) in the space of Disse along with insufficient ECM degradation, leading to a distortion of the architecture and a progressive reduction of hepatic function <sup>1</sup>.

Wound healing is the normal response of tissue to an injury, and liver fibrosis occurs as a result of repeated cycles of injury and repair. Moreover, chronic persistent inflammation typically precedes fibrosis. Chronic liver injuries activate and transform quiescent hepatic stellate cells (HSCs) into activated myofibroblasts, which is the central pathogenic mechanism of fibrotic disorders <sup>2</sup>.

The development of cirrhosis is usually associated with oxidative stress and lipid peroxidation (LPO) <sup>3</sup>. In this study, we used the carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) inhalation model of cirrhosis in the rat because it has several similarities with human cirrhosis <sup>4</sup>. CCl<sub>4</sub>, a widely used solvent in chemical industries, is one of the main pathways for the exposure and absorption of volatile chemicals that may be environmental contaminants, and it is well-known for its hepatic and renal toxic actions. The metabolism of CCl<sub>4</sub> into trichloromethyl (CCl<sub>3</sub>•) and peroxy trichloromethyl (•OOCCl<sub>3</sub>) free radicals has been reported to cause hepatotoxic effects, like fibrosis, steatosis, necrosis and hepatocarcinoma <sup>3</sup>.

Much effort has been devoted to developing new treatments for this disease. The only treatment currently available for severe end-stage liver disease is orthotopic liver transplantation <sup>5</sup>.

Some compounds that have been studied as possible protectors against liver cirrhosis are known for their anti-inflammatory and antioxidant properties. Plants contain numerous polyphenols, which have been shown to reduce inflammation and thereby to increase resistance to disease <sup>6</sup>. Quercetin (Q), a polyphenolic flavonoid compound present in large amounts in vegetables, fruits and tea, exhibits its therapeutic potential against many diseases, including hepatoprotection and the inhibition of liver fibrosis <sup>7-9</sup>. It contains a number of phenolic hydroxyl groups, which

have strong antioxidant activity<sup>10-11</sup>. The average intake varies between countries but is approximately 23 mg/day; quercetin is predominant at 16 mg/day<sup>10</sup>.

By increasing the endogenous antioxidant defenses, flavonoids can modulate the redox state of organisms. The major endogenous antioxidant systems include superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), and glutathione peroxidase (GPx), which is essential for the detoxification of lipid peroxides<sup>8, 12</sup>.

Therefore, using the carbon tetrachloride-induced liver injury model, we investigated the protective actions of the flavonoid quercetin on the progression of fibrosis and on parameters of oxidative stress.

## **Materials and methods**

### **Animal experiments and drug treatment**

Male Wistar rats weighing 250–300 g were used. The animals were caged at 22°C with 12-hour light-dark cycles and free access to food and water until the experiments were performed. All experiments were performed according to the Guiding Principles for Research Involving Animals (NAS) and the Committee of Research and Ethics in Health of the Research and Postgraduate Group of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Experimental animals were randomly divided into a control group (n=5), a cirrhotic group treated with CCl<sub>4</sub> for 16 weeks (n=10), and a CCl<sub>4</sub> + quercetin group treated with CCl<sub>4</sub> for 16 weeks and with quercetin from the 10<sup>th</sup> to 16<sup>th</sup> week (n=10). A control group treated with quercetin was not necessary because previous studies by our group had demonstrated that it does not produce a significant difference compared to control animals<sup>13</sup>.

For P450 enzymatic induction, phenobarbital (0.3 g/L) was added to the animal's drinking water seven days before the first inhalation and throughout the experiment. The CCl<sub>4</sub> group was exposed to inhaled CCl<sub>4</sub> twice a week (on Mondays and Fridays) inside an inhalation chamber that measured 65x26x21 cm. CCl<sub>4</sub> was

placed in a glass container (humidifier) attached to an air compressor and released into the chamber at a flow rate of 1 L/min. In the first three sessions, the length of gas exposure was 30 s, and the animals remained inside the chamber for another 30 s while the compressor was turned off (waiting time). In the fourth session, the length of gas administration was increased to 1 minute, followed by another minute in the waiting mode. Subsequently, the length of gas administration and the waiting period in the chamber were increased by 30 s every three sessions, up to a peak of 5 min at 16 weeks, according to the method adapted from Cremonese et al.<sup>14</sup>.

Quercetin (Sigma ®) was administered i.p. at a dose of 50 mg/kg/day<sup>9, 13</sup>. It was initiated at the 10<sup>th</sup> week, when histological analyses and liver function tests indicated that the animals were already cirrhotic, and was carried out until the date of sacrifice.

After 24 hours from the last CCl<sub>4</sub> inhalation, the animals were anesthetized with 1% xylazine and 10% cetamine, and then we collected blood samples from the retro-orbital plexus. Later, the livers were removed, washed with saline, and divided into sections. A portion was preserved in 4% formalin for histological examination. The rest was frozen at -80°C for later analysis.

### **Serum biochemical analysis**

Serum activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (AP) and total bilirubin (BT) were measured with routine laboratory methods of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **Histological analysis**

For histological examination, a piece of the liver from all animals was trimmed and fixed by immersion in 10% buffered formalin for 24 hours. The blocks were dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in paraffin wax. Serial 3-mm

sections were stained with hematoxylin and eosin or picrosirius. Five sections from each sample were analyzed by two independent pathologists who had no prior knowledge of the animal groups.

### **Collagen quantification**

Collagen was determined by estimating the hydroxyproline content, an amino acid characteristic of collagen. Liver sections of 100 mg were hydrolyzed in 6 mol/L HCl for 16h at 110°C and evaporated to dryness to remove the acid. The residue, dissolved in distilled water, was mixed with 50% isopropanol and chloramine-T solution and left for 10 min at room temperature. Finally, p-dimethylaminobenzaldehyde in 60% perchloric acid was added and heated to 60°C for 25 min <sup>15</sup>. The absorbance was measured at 560 nm. Hydroxyproline levels were calculated based on standard curves of 4-hydroxy-1-proline and expressed as µg/mg protein.

### **Nitric oxide metabolites**

Nitric oxide production in muscle tissue was measured indirectly using a quantitative colorimetric assay based on a Griess reaction <sup>16</sup>. The method for NO determination involves spectrophotometric measurement of its stable decomposition products  $\text{NO}_3^-$  and then  $\text{NO}_2^-$  as determined by the Griess reaction. The reaction was measured at an absorbance of 546 nm using a sodium nitrate solution as a standard.

### **Oxidative damage determination**

Frozen tissue from each rat was homogenized in ice-cold phosphate buffer (140 mM KCl, 20 mM phosphate, pH 7.4) and centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes. Oxidative stress was determined by measuring the concentration of

aldehydic products (MDA) by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) <sup>17</sup>. Spectrophotometric absorbance of the supernatant at 535 nm was determined.

## **Antioxidant enzyme activity**

### **Superoxide dismutase (SOD)**

Cytosolic superoxide dismutase (SOD) (EC 1.5.1.1) was assayed at 30°C according to Misra and Fridovich <sup>18</sup>. The auto-oxidation rate of epinephrine, which is progressively inhibited by increasing amounts of SOD in the homogenate, was monitored spectrophotometrically at 560 nm. The amount of enzyme that inhibited 50% of epinephrine auto-oxidation was defined as 1 U of SOD activity.

### **Catalase (CAT)**

Catalase activity was determined by measuring the decrease in absorption at 240 nm in a reaction medium containing 50 mM phosphate buffer saline (pH 7.2) and 0.3 M hydrogen peroxide <sup>19</sup>. The enzyme activity was assayed spectrophotometrically at 240 nm.

### **Glutathione peroxidase (GPx)**

The glutathione peroxidase (GPx) activity was determined by the oxidation rate of NADPH in the presence of reduced glutathione and glutathione reductase <sup>20</sup>. Sodium azide was added to inhibit catalase activity. The GPx activity was measured with a spectrophotometer at 340 nm.

## **Measurement of intracellular reduced glutathione/oxidized glutathione (GSH/GSSG)**

GSH and GSSG measurements were made according to the method adapted method from Kolberg et al.<sup>21</sup>. Liver sections were rinsed twice with PBS and disrupted in 200 ml of 5% (w/v) metaphosphoric acid on ice. After centrifugation (16,000 x g, 2 min at room temperature), cell lysates were spectrophotometrically (415 nm) assayed on a microplate reader by modification of the 5,50-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)/GSSG reductase recycling method using the N-ethylmaleimide conjugating technique for GSSG sample preparation. Samples (10 ml) for both GSH and GSSG determinations were assayed in a 105- $\mu$ l final volume in 96-well polystyrene plates at 37°C in the presence of 10 mM DTNB, 0.17 mM  $\beta$ -NADPH (dissolved in 0.5% (w/v) NaHCO<sub>3</sub> as a stabilizing agent) and 0.5 U/ml GSSG reductase.

## **Statistical analysis**

The results were expressed as mean  $\pm$  SEM. The data were compared by analysis of variance (ANOVA); when the analysis indicated the presence of a significant difference, the means were compared with the Student Newmann Keuls test. Significance was accepted at  $p < 0.05$ .

## **Results**

### **Serum biochemical analysis**

After 16 weeks of CCl<sub>4</sub> exposure, the animals showed important alterations in enzyme markers of hepatic injury (Table 1). The CCl<sub>4</sub>-treated group showed a significant increase in serum total bilirubin and hepatic marker enzymes. However,

the intraperitoneal administration of quercetin at 50 mg/kg attenuated this elevation of AST, ALT, ALP and BT.

**Table 1** – Effect of quercetin on hepatic enzymes in CCl<sub>4</sub>-induced hepatic injury.

Parameters	Experimental Groups		
	CO	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> +Q
AST (U/L)	119.2 ± 10.1	488.6 ± 61.7 <sup>a</sup>	256.5 ± 34.3
ALT (U/L)	35.7 ± 3.6	235.2 ± 17.4 <sup>a</sup>	165.9 ± 38.7 <sup>b</sup>
ALP (U/L)	66.7 ± 5.0	237.6 ± 18.5 <sup>a</sup>	167.6 ± 17.7 <sup>b</sup>
BT (U/L)	0.3 ± 0.0	0.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.08

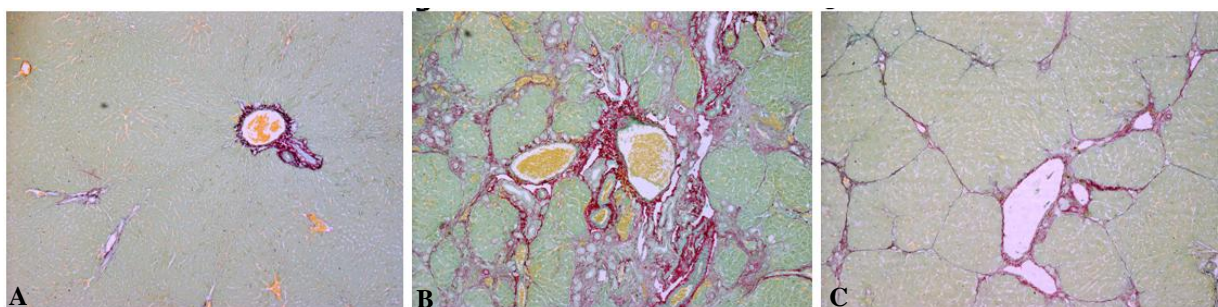
Results represent mean ± S.E.

<sup>a</sup> Significant difference between CCl<sub>4</sub> group and groups CO and CCl<sub>4</sub>+Q, considering p < 0.05.

<sup>b</sup> Significant difference between the CCl<sub>4</sub>+Q group and group CO, considering p < 0.05.

### Histological analysis

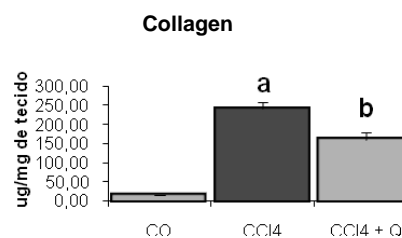
The histological analysis of liver tissue from animals in the control group (CO) showed a normal architecture of the parenchyma (Fig. 1A). Animals with CCl<sub>4</sub> exposure showed a loss of the normal architecture with the presence of regenerative nodules, cellular necrosis and fibrosis (Fig. 1B). In contrast, necrosis and fibrosis were minimal in animals from groups treated with quercetin (Fig. 1C).



**Fig. 1:** **A.** Control rat liver section (100x); **B.** Cirrhotic rat (CCl<sub>4</sub>) liver section (100x); **C.** Cirrhotic rat treated with Q (CCl<sub>4</sub> + Q) liver section (100x). Picrosirius red staining.

## Collagen

Fibrosis, which is the final result of prolonged liver injury, was quantified by hydroxyproline analysis and expressed as liver collagen content (Figure 2). The collagen content was significantly higher in the CCl<sub>4</sub> treated group. This effect was partially but significantly reduced by quercetin.



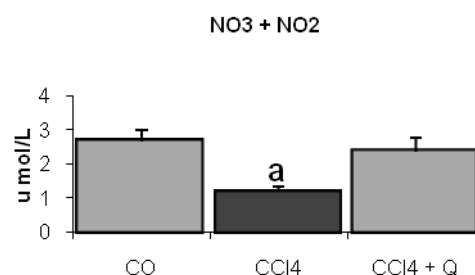
**Figure 2.** Medium values of collagen in the liver from different groups.

<sup>a</sup> Significant difference between the CCl<sub>4</sub> group and the CO and CCl<sub>4</sub>+Q groups ( $p < 0.01$ ).

<sup>b</sup> Significant difference between the CCl<sub>4</sub>+Q group and the CO group ( $p < 0.05$ ).

## Nitric oxide metabolite

Serum levels of NO<sub>3</sub>+NO<sub>2</sub> were found to be reduced in the livers of the animals that had inhaled CCl<sub>4</sub> compared with healthy controls. Quercetin treatment significantly increased these levels (Figure 3).



**Figure 3:** Medium values of liver nitrites/nitrates (NO<sub>3</sub>+NO<sub>2</sub>) from the different studied groups.

<sup>a</sup> Significant difference between the CCl<sub>4</sub> group and the CO and CCl<sub>4</sub>+Q groups ( $p < 0.05$ ).

## Lipid peroxidation

Oxidative stress resulting from the metabolism of CCl<sub>4</sub> in the liver plays a critical role in damaging the liver and promoting hepatic fibrogenesis. The MDA level



was significantly higher in liver homogenates of CCl<sub>4</sub>-intoxicated rats compared with the control group (Table 2). Treatment with quercetin significantly reduced these levels.

**Table 2** - Effects of quercetin (Q) on lipid peroxidation and on antioxidant enzyme activities in CCl<sub>4</sub>-induced hepatic injury.

Parameters	Experimental Groups		
	CO	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> +Q
<b>TBARS</b> (nmol/mg protein)	0,19±0,001	0,37±0,02 <sup>a</sup>	0,28±0,02 <sup>b</sup>
<b>SOD</b> (U SOD/mg protein)	3,86±0,28	1,41±0,22 <sup>a</sup>	3,36±0,29
<b>CAT</b> (p mol/mg protein)	0.62±0.04	0.27±0.02 <sup>a</sup>	0.55±0.02
<b>GPx</b> (mmol/min/mg protein)	0.27±0.02	0,19±0,01 <sup>a</sup>	0.23±0.01
<b>GSH</b> (mmol / mg protein)	362.1±46.63	230.66±35.09 <sup>a</sup>	371.6±33.8
<b>GSSG</b> (nmol / mg protein)	40.63 ±1.87	84.46±3.45 <sup>a</sup>	49.96±3,74
<b>GSH/GSSG</b> (Ratio)	8.91±1.06	2.74±0.42 <sup>a</sup>	7.43±0.80

Results represent mean ± S.E.

<sup>a</sup> Significant difference between CCl<sub>4</sub> group and groups CO, CCl<sub>4</sub>+Q, considering p < 0,05.

<sup>b</sup> Significant difference between CCl<sub>4</sub>+Q group and groups CO, considering p < 0,05.

### Antioxidant enzymes

CCl<sub>4</sub> toxicity resulted in a marked reduction of SOD, CAT and GPx activities in liver tissues compared with the control group (Table 2). Treatment with quercetin significantly reestablished the levels of these antioxidant enzymes.

The hepatic GSH concentration decreased significantly after CCl<sub>4</sub> treatment, and this decrease was attenuated by quercetin. Concomitantly, the GSSG concentration increased in the livers of CCl<sub>4</sub>-treated animals. The ratio of GSH to GSSH decreased when compared with the control group after CCl<sub>4</sub> injection, and quercetin significantly restored this decrease at a dose of 50 mg/kg for 16 weeks (Table 2).

## Discussion

CCl<sub>4</sub> is widely used to induce hepatic fibrosis and cirrhosis in animal models. Furthermore, the liver signs observed in rats due to chronic stimulation with CCl<sub>4</sub> are similar to those found in cirrhotic patients<sup>4</sup>. Oxidative stress plays an important role in the development of hepatic fibrosis acting on different cell types and in different signaling pathways. Consequently, antioxidants, particularly those of plant origin, have emerged as potent antifibrotic agents<sup>8-9</sup>. In this study, hepatic fibrosis was successfully induced by CCl<sub>4</sub> inhalation for 16 weeks. Through this hepatic fibrosis model, the effects of quercetin on hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub> in rats were examined, and the treatment was initiated 8 weeks after the initiation of CCl<sub>4</sub> inhalation. The flavonoid was administered at a dose previously described to have beneficial effects in rats with biliary obstruction<sup>9, 13</sup>. Quercetin spreads in the cell membrane and acts as a scavenger or obstructs the chain reaction of free radicals formed, thereby decreasing lipid peroxidation<sup>22</sup>. Similar effects were also obtained after the use of the flavonoid quercetin in rats in models of cirrhosis induced by intraperitoneal carbon tetrachloride<sup>7</sup> and by biliary obstruction<sup>13</sup>.

AST and ALT are enzymes that are sensitive to hepatocellular injury. The release of large quantities of these enzymes in the bloodstream is associated with centrilobular necrosis, degeneration and reduced performance status of the liver<sup>23</sup>. In this study, we observed a significant increase in the serum levels of AST, ALT, ALP and BT after CCl<sub>4</sub> inhalation. The decrease of the serum enzymes AST, ALT, ALP and BT after treatment with quercetin demonstrated its antioxidant potential and its hepatoprotective effect.

The histological findings revealed severe liver cell damage in rats after the inhalation of CCl<sub>4</sub>, supporting the observed changes in biochemical assays. The presence of necrotic foci, fibrotic nodules, infiltration of lymphocytes, steatosis and changes in liver cells are characteristics after intoxication with CCl<sub>4</sub><sup>24</sup>. Treatment with quercetin decreased necrosis and fibrosis. This can be considered an expression of the functional improvement of hepatocytes. These data are consistent with other studies of cirrhosis that used substances with antioxidant power, like quercetin<sup>13</sup>, silmarim<sup>25</sup> and curcumin<sup>6</sup>.

In this study, traditional methods of assessing hepatic fibrosis, such as the quantification of hydroxyproline content and histological analysis, were performed to determine the effects of quercetin on liver cirrhosis induced by CCl<sub>4</sub>. The determination of hydroxyproline content in liver tissue is regarded as a good method to quantify fibrosis and to evaluate the efficacy of new antifibrotic agents<sup>26</sup>. In this study, the exposure to CCl<sub>4</sub> significantly increased the hydroxyproline content in the liver. This increase in collagen deposition was reduced after treatment with quercetin, demonstrating its effectiveness on liver fibrogenesis.

The reduction of nitric oxide (NO) has been implicated as a cause of intrahepatic vasoconstriction in cirrhosis<sup>27</sup>. In the evaluation of nitrates in the total liver homogenate, we observed a significant decrease in the production of NO metabolites in the cirrhotic group compared with the other groups. This result is consistent with another study in which the nitrite accumulation decreased in cirrhotic livers<sup>28</sup>. The dose-dependent decrease of total nitrates, end products of the oxidation of NO, and NO has also been reported in a study of liver damage induced by different doses of CCl<sub>4</sub> in mice<sup>29</sup>. Quercetin administration augmented the production of nitric oxide metabolites, raising the levels similar to those in controls, suggesting a reduction in peroxynitrite formation. Quercetin was cited as the most active flavonoid in sequestering peroxynitrite<sup>30</sup>. We can infer that the decrease in the total levels of nitrate was related to the continued use of NO or other free radicals formed by the reduction of its cofactor NADPH after injury caused by the inhalation of CCl<sub>4</sub>.

MDA is the main product of lipid peroxidation, and its concentration is generally presented as the total level of lipid peroxidation products<sup>31</sup>. It has been shown that MDA can activate stellate cells that produce collagen. MDA was analyzed by the TBARS assay, and its level was significantly higher in the CCl<sub>4</sub>-intoxicated group compared with the others. The increase in LPO could have caused the loss of structure and integrity of the cell membrane. Quercetin treatment significantly reduced the TBARS levels in liver homogenates.

Several studies have found increased LPO in rats treated with CCl<sub>4</sub>, whereas the activities of enzymes in the liver were decreased<sup>7, 32</sup> similarly to those found in this study. Free-radical scavenging enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), protect the biological systems from oxidative stress. The current study showed a

significant decrease in SOD activity in rats with CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis. On the other hand, there was a significant increase in SOD activity in rats treated with quercetin. Our results indicate that treatment with quercetin acts against free radicals formed during the metabolism of CCl<sub>4</sub> by restoring the levels of the antioxidant enzymes SOD, CAT and GPx and reducing LPO.

While there are several biochemical markers of oxidative stress, the ratio of reduced GSH/GSSG has been widely used as a marker of the redox state because of its sensitivity, reliability and abundance. GSH is the main endogenous antioxidant and is responsible for the maintenance of the intracellular redox balance, detoxification of xenobiotics and reactive oxygen species<sup>33</sup>. The reduction of GSH in the liver, observed in this study, may be caused by the direct requisition of GSH by GPx to scavenge the production of free radicals formed by the metabolism of CCl<sub>4</sub>. In this study, the administration of quercetin not only increased the levels of total hepatic GSH but also significantly improved the ratio of GSH/GSSG in the liver. Several studies indicate that quercetin has the ability to increase the GSH/GSSG and, consequently, decreases cellular oxidative damage<sup>34</sup>.

A possible explanation for these findings is that quercetin not only acts as a direct scavenger of reactive oxygen species but may also exert actions on endogenous antioxidant defenses by modulating the intracellular signaling systems. This protection may be the result of a variety of mechanisms, including decreasing oxidative stress due to the sequestration of free radicals, promoting cell survival by modulating intracellular signals, and decreasing the toxicity of xenobiotics and carcinogens by regulating gene expression or the activity of the cytochrome P<sub>450</sub> enzymes<sup>35</sup>.

In summary, administration of quercetin seems to have a protective role in liver of rats with experimentally induced cirrhosis, as demonstrated by the reduction of fibrosis and oxidative stress.

## References

1. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 2003;38 Suppl 1:S38-53.

2. Ebrahimkhani MR, Elsharkawy AM, Mann DA. Wound healing and local neuroendocrine regulation in the injured liver. *Expert Rev Mol Med* 2008;10:e11.
3. Fang HL, Lin WC. Lipid peroxidation products do not activate hepatic stellate cells. *Toxicology* 2008;253:36-45.
4. Perez Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl<sub>4</sub> and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology* 1983;3:112-20.
5. Henderson NC, Forbes SJ. Hepatic fibrogenesis: from within and outwith. *Toxicology* 2008;254:130-5.
6. Bengmark S, Mesa MD, Gil A. Plant-derived health: the effects of turmeric and curcuminoids. *Nutr Hosp* 2009;24:273-81.
7. Amalia PM, Possa MN, Augusto MC, Francisca LS. Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. *Dig Dis Sci* 2007;52:2616-21.
8. Gonzalez-Gallego J, Sanchez-Campos S, Tunon MJ. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr Hosp* 2007;22:287-93.
9. Tieppo J, Cuevas MJ, Vercelino R, Tunon MJ, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J. Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats. *J Nutr* 2009;139:1339-46.
10. Martinez-Florez S, Gonzalez-Gallego J, Culebras JM, Tunon MJ. [Flavonoids: properties and anti-oxidizing action]. *Nutr Hosp* 2002;17:271-8.
11. Tokyol C, Yilmaz S, Kahraman A, Cakar H, Polat C. The effects of desferrioxamine and quercetin on liver injury induced by hepatic ischaemia-reperfusion in rats. *Acta Chir Belg* 2006;106:68-72.
12. Abiles J, Moreno-Torres R, Moratalla G, et al. [Effects of supply with glutamine on antioxidant system and lipid peroxidation in patients with parenteral nutrition]. *Nutr Hosp* 2008;23:332-9.
13. Peres W, Tunon MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, Gonzalez-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol* 2000;33:742-50.
14. Cremonese RV, Pereira-Filho AA, Magalhaes R, et al. [Experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride inhalation: adaptation of the technique and evaluation of lipid peroxidation]. *Arq Gastroenterol* 2001;38:40-7.
15. Rojkind M, Gonzalez E. An improved method for determining specific radioactivities of proline-<sup>14</sup>C and hydroxyproline-<sup>14</sup>C in collagen and in noncollagenous proteins. *Anal Biochem* 1974;57:1-7.
16. Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol* 1999;301:49-61.
17. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302-10.
18. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170-5.
19. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973;134:707-16.
20. Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984;105:114-21.
21. Kolberg A, Rosa TG, Puhl MT, et al. Low expression of MRP1/GS-X pump ATPase in lymphocytes of Walker 256 tumour-bearing rats is associated with

cyclopentenone prostaglandin accumulation and cancer immunodeficiency. *Cell Biochem Funct* 2006;24:23-39.

22. Pawlikowska-Pawlega B, Gruszecki WI, Misiak L, et al. Modification of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group. *Biochim Biophys Acta* 2007;1768:2195-204.

23. Rajesh MG, Latha MS. Preliminary evaluation of the antihepatotoxic activity of Kamilari, a polyherbal formulation. *J Ethnopharmacol* 2004;91:99-104.

24. Yuan LP, Chen FH, Ling L, et al. Protective effects of total flavonoids of *Bidens bipinnata* L. against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *J Pharm Pharmacol* 2008;60:1393-402.

25. Tsai JH, Liu JY, Wu TT, et al. Effects of silymarin on the resolution of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *J Viral Hepat* 2008;15:508-14.

26. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology* 2002;36:850-60.

27. Shah V, Toruner M, Haddad F, et al. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999;117:1222-8.

28. Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998;114:344-51.

29. Zhu W, Fung PC. The roles played by crucial free radicals like lipid free radicals, nitric oxide, and enzymes NOS and NADPH in CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury of mice. *Free Radic Biol Med* 2000;29:870-80.

30. Choi JS, Chung HY, Kang SS, et al. The structure-activity relationship of flavonoids as scavengers of peroxyxynitrite. *Phytother Res* 2002;16:232-5.

31. Drewa G, Krzyzyska-Malinowska E, Wozniak A, et al. Activity of superoxide dismutase and catalase and the level of lipid peroxidation products reactive with TBA in patients with psoriasis. *Med Sci Monit* 2002;8:BR338-43.

32. da Rosa DP, Bona S, Simonetto D, Zettler Z, Marroni CA, Marroni NP. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats *Arquivos de Gastroenterologia* 2010;47.

33. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1191-212.

34. Seufi AM, Ibrahim SS, Elmaghraby TK, Hafez EE. Preventive effect of the flavonoid, quercetin, on hepatic cancer in rats via oxidant/antioxidant activity: molecular and histological evidences. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28:80.

35. Moskaug JO, Carlsen H, Myhrstad M, Blomhoff R. Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mech Ageing Dev* 2004;125:315-24.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

O modelo experimental de cirrose hepática, pela inalação de tetracloreto de carbono, é reconhecido como modelo experimental capaz de reproduzir as alterações clínicas observadas na cirrose em humanos. A disponibilidade de um modelo animal para estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da cirrose é de suma importância para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da doença, além do que, atualmente, não existem terapias eficazes para o tratamento da cirrose hepática, sendo o único tratamento de sucesso o transplante de fígado. Portanto, é essencial desenvolver novas estratégias terapêuticas e avaliar prováveis mecanismos patogênicos nessa doença.

Pelos dados obtidos, concluiu-se que a administração de quercetina:

- 1) diminui os níveis séricos das enzimas hepáticas marcadoras de lesão no fígado, a AST, ALT, FA, e BT, demonstrando a ação hepatoprotetora da quercetina.
- 2) diminui o dano causado pela inalação de  $\text{CCL}_4$  aos hepatócitos, reduzindo a presença de focos de necrose e de nódulos fibróticos, considerando-se uma melhora funcional dos hepatócitos.
- 3) diminui o colágeno hepático observado pela diminuição do conteúdo de hidroxiprolina, demonstrando sua eficácia sobre a redução da fibrose hepática.
- 4) aumenta a produção dos metabólitos do NO, avaliada pela medida de nitritos e nitratos no fígado, sugerindo uma redução na formação de peroxinitrito.
- 5) diminui a LPO, conseqüentemente ocorrendo a diminuição da formação excessiva de radicais livres formados durante o metabolismo do  $\text{CCl}_4$ , o que foi avaliado pelo teste de TBARS.

6) reestabelece os níveis das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx), assemelhando-se aos níveis dos animais controles.

7) aumenta os níveis de GSH e diminui a GSSG.

Devido às evidências apresentadas nos resultados deste trabalho, podemos sugerir que o modelo desenvolvido é realmente efetivo, onde a cirrose foi estabelecida, e que a quercetina reverteu o dano hepático, podendo ser uma terapia de escolha em doenças hepáticas. Dessa forma, o fato nos estimula a maiores investigações, havendo a necessidade do seguimento de estudos mais avançados sobre a ação da quercetina em doenças hepáticas, a fim de aproximar cada vez mais nossos estudos à realidade clínica.



## PERSPECTIVAS FUTURAS

---

A partir das evidências apresentadas, o flavonoide quercetina desperta grande interesse e abre-nos perspectivas de investigar, de forma mais aprofundada, seus efeitos sobre as células estreladas hepáticas, as quais têm envolvimento vital no desenvolvimento da cirrose e nas conseqüentes complicações sistêmicas. Além disso, viabilizando essas investigações, podemos prosseguir com estudos envolvendo as modificações da matriz extracelular no processo cirrótico e pesquisar os efeitos da quercetina nesses parâmetros, adentrando, assim, no mundo das metaloproteinases e seus inibidores. Tais estudos poderiam ser realizados em modelo animal ou até mesmo em cultura de células estreladas, fazendo-se um estudo comparativo e verificando-se os efeitos da quercetina nesses mediadores.

Do mesmo modo, poderíamos abordar também o envolvimento de outros fatores de transcrição além do NF $\kappa$ B e outras citocinas envolvidas nos processos de ativação e proliferação das células estreladas como o PDGF. Ele é um potente mitógeno para proliferação e ativação de uma variedade de sinalizadores moleculares, pois o papel de demais fatores de transcrição entre outros mediadores na ativação e proliferação das células estreladas permanece ainda indefinido, despertando-nos, portanto, imenso interesse quanto ao estudo de mecanismos e de efeito terapêutico da quercetina nesses mediadores.

Como perspectivas futuras, objetivamos prosseguir com investigações sobre os efeitos da quercetina em níveis moleculares, e aperfeiçoar a forma de administração, e possivelmente associar a quercetina com outro antioxidante como a melatonina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* 1989 Jun 1;38(11):1763-9.
- Albanis E, Friedman SL. Antifibrotic agents for liver disease. *Am J Transplant.* 2006 Jan;6(1):12-9.
- Amalia PM, Possa MN, Augusto MC, Francisca LS. Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. *Dig Dis Sci.* 2007 Oct;52(10):2616-21.
- Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat Res.* 1994 May 1;307(1):261-71.
- Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2003 Jul 15;189(1-2):113-27.
- Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbic MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, et al. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology.* 2000 Jun;118(6):1149-56.
- Bayol-Denizot C, Daval JL, Netter P, Minn A. Xenobiotic-mediated production of superoxide by primary cultures of rat cerebral endothelial cells, astrocytes, and neurones. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Jun 2;1497(1):115-26.
- Bengmark S, Mesa MD, Gil A. Plant-derived health: the effects of turmeric and curcuminoids. *Nutr Hosp.* 2009 May-Jun;24(3):273-81.
- Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Aug;1758(8):994-1003.
- Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors.* 1997;6(4):391-7.
- Calfee-Mason KG, Spear BT, Glauert HP. Vitamin E inhibits hepatic NF-kappaB activation in rats administered the hepatic tumor promoter, phenobarbital. *J Nutr.* 2002 Oct;132(10):3178-85.
- Cameron TW. Parasites of Animals and the Public Health in North America. *Am J Public Health Nations Health.* 1936 Jan;26(1):46-50.
- Carloni V, Defranco RM, Caligiuri A, Gentilini A, Sciammetta SC, Baldi E, et al. Cell adhesion regulates platelet-derived growth factor-induced MAP kinase and PI-3 kinase activation in stellate cells. *Hepatology.* 2002 Sep;36(3):582-91.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979 Jul;59(3):527-605.
- Chobot V. Simultaneous detection of pro- and antioxidative effects in the variants of the deoxyribose degradation assay. *J Agric Food Chem.* 2010 Feb 24;58(4):2088-94.

- Cook MA, Karmazyn M. Cardioprotective actions of adenosine and adenosine analogs. *EXS*. 1996;76:325-44.
- 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]. *Arq Gastroenterol*. 2001 Jan-Mar;38(1):40-7.
- da Rosa DP, Bona S, Simonetto D, Zettler Z, Marroni CA, Marroni NP. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats *Arquivos de Gastroenterologia*. 2010;47.
- da Silva J, Herrmann SM, Heuser V, Peres W, Possa Marroni N, Gonzalez-Gallego J, et al. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol*. 2002 Jul;40(7):941-7.
- Dajas F, Rivera-Megret F, Blasina F, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Costa G, et al. Neuroprotection by flavonoids. *Braz J Med Biol Res*. 2003 Dec;36(12):1613-20.
- del Carmen García León M, Montfort I, Tello Montes E, López Vancell R, Olivos García A, González Canto A, et al. Hepatocyte production of modulators of extracellular liver matrix in normal and cirrhotic rat liver. *Experimental and Molecular Pathology*. 2006;80(1):97-108.
- Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr*. 2005 Oct;135(10):2299-304.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002 Jan;82(1):47-95.
- Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis*. 2005 Oct;10(5):927-39.
- Erdman JW, Jr., Balentine D, Arab L, Beecher G, Dwyer JT, Folts J, et al. Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. *J Nutr*. 2007 Mar;137(3 Suppl 1):718S-37S.
- Fang HL, Lin WC. Lipid peroxidation products do not activate hepatic stellate cells. *Toxicology*. 2008 Nov 20;253(1-3):36-45.
- Ferguson LR. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res*. 2001 Apr 18;475(1-2):89-111.
- Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*. 1995 Dec;33(12):1061-80.
- Friedman SL, Arthur MJP. Reversing Hepatic Fibrosis. *Science & Medicine*. 2002.
- Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 2008 Jan;88(1):125-72.
- Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol*. 2003;38 Suppl 1:S38-53.
- Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008 May;134(6):1655-69.
- Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*. 1954 May 7;119(3097):623-6.
- Goldani HA, Matte US, Ramos AR, Costa TG, Winkelmann LV, Meurer L, et al. The role of food restriction on CCl4-induced cirrhosis model in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2007 Apr;58(5):331-7.

- Gonzalez-Gallego J, Sanchez-Campos S, Tunon MJ. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr Hosp*. 2007 May-Jun;22(3):287-93.
- Guengerich FP, Kim DH, Iwasaki M. Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol*. 1991 Mar-Apr;4(2):168-79.
- Guimaraes EL, Franceschi MF, Grivicich I, Dal-Pizzol F, Moreira JC, Guaragna RM, et al. Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. *Liver Int*. 2006 May;26(4):477-85.
- Guyton H. *Tratado de Fisiologia Médica*. 10 ed. Rio de Janeiro 2002.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3 ed 1999.
- Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*. 1999 Oct;31(4):261-72.
- Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994 Sep 10;344(8924):721-4.
- Halliwell B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovasc Res*. 2000 Aug 18;47(3):410-8.
- Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. 2006 Jun;141(2):312-22.
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956 Jul;11(3):298-300.
- Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *Faseb J*. 1992 Jun;6(9):2675-83.
- Heidelbaugh JJ, Sherbondy M. Cirrhosis and chronic liver failure: part II. Complications and treatment. *Am Fam Physician*. 2006 Sep 1;74(5):767-76.
- Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet*. 1997 Mar 8;349(9053):699.
- Hertog MG, Hollman PC. Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur J Clin Nutr*. 1996 Feb;50(2):63-71.
- Huber LS, Rodriguez-Amaya DB. *Flavonóis e flavonas: Fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos* 2008.
- Jimenez W, Claria J, Arroyo V, Rodes J. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 1992 Jan-Feb;7(1):90-7.
- Junqueira L, Carneiro J. *Histologia Básica*. 10 ed. Rio de Janeiro 2004.
- Kahraman A, Erkasap N, Koken T, Serteser M, Aktepe F, Erkasap S. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology*. 2003 Feb 1;183(1-3):133-42.
- Koes RE, Quattrocchio F, Mol JNM. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays*. 1994;16:9.
- Krinsky NI. Carotenoids as chemopreventive agents. *Prev Med*. 1989 Sep;18(5):592-602.
- Laleman W, Vander Elst I, Zeegers M, Servaes R, Libbrecht L, Roskams T, et al. A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: thioacetamide revisited. *Eur J Clin Invest*. 2006 Apr;36(4):242-9.
- Landvik S. Vitamin E from supplements has good bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004 Sep;80(3):784-5.
- Lee ES, Lee HE, Shin JY, Yoon S, Moon JO. The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2003 Aug;55(8):1169-74.

- Lee KS, Lee SJ, Park HJ, Chung JP, Han KH, Chon CY, et al. Oxidative stress effect on the activation of hepatic stellate cells. *Yonsei Med J.* 2001 Feb;42(1):1-8.
- Li JT, Liao ZX, Ping J, Xu D, Wang H. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. *J Gastroenterol.* 2008;43(6):419-28.
- Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, Grenard P, Mallat A. Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:605-28.
- Maris AF, Assumpcao AL, Bonatto D, Brendel M, Henriques JA. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Curr Genet.* 2001 May;39(3):137-49.
- Martinez-Florez S, Gonzalez-Gallego J, Culebras JM, Tunon MJ. [Flavonoids: properties and anti-oxidizing action]. *Nutr Hosp.* 2002 Nov-Dec;17(6):271-8.
- Marumoto Y, Terai S, Urata Y, Matsumoto T, Mizunaga Y, Yamamoto N, et al. Continuous high expression of XBP1 and GRP78 is important for the survival of bone marrow cells in CCl4-treated cirrhotic liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Mar 14;367(3):546-52.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.* 2005 Oct;16(10):577-86.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin. *J Biol Chem.* 1969 Nov 25;244(22):6049-55.
- Miksicek RJ. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1995 Jan;208(1):44-50.
- Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med.* 1990;8(1):95-108.
- Mittal CK, Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Oct;74(10):4360-4.
- Morales AI, Vicente-Sanchez C, Sandoval JM, Egidio J, Mayoral P, Arevalo MA, et al. Protective effect of quercetin on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is based on its antioxidant properties. *Food Chem Toxicol.* 2006 Dec;44(12):2092-100.
- Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zetler C, Marroni C, et al. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol.* 2004 Nov 15;68(10):1939-46.
- Muriel P, Escobar Y. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *J Appl Toxicol.* 2003 Mar-Apr;23(2):103-8.
- Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species mediate paracrine stimulation of collagen I protein synthesis by hepatic stellate cells. *J Biol Chem.* 2002 Mar 22;277(12):9853-64.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001 Oct;74(4):418-25.
- Novo E, Parola M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2008;1(1):5.

- Orsolic N, Knezevic AH, Sver L, Terzic S, Basic I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J Ethnopharmacol.* 2004 Oct;94(2-3):307-15.
- Pastor A, Collado PS, Almar M, Gonzalez-Gallego J. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *J Hepatol.* 1997 Aug;27(2):363-70.
- 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.
- Pavanato MA. Ação protetora da quercetina no fígado de ratos cirróticos. Porto Alegre: UFRGS; 2004.
- Pereira-Filho G, Ferreira C, Schwengber A, Marroni C, Zettler C, Marroni N. Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats. *Arq Gastroenterol.* 2008 Apr-Jun;45(2):156-62.
- Peres W, Tunon MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, Gonzalez-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol.* 2000 Nov;33(5):742-50.
- Perez Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl<sub>4</sub> and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology.* 1983 Jan-Feb;3(1):112-20.
- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000 Jul;63(7):1035-42.
- Ramaiah SK, Apte U, Mehendale HM. Cytochrome P450E1 induction increases thioacetamide liver injury in diet-restricted rats. *Drug Metab Dispos.* 2001 Aug;29(8):1088-95.
- Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kahkonen M, Kujala T, et al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol.* 2000 May 25;56(1):3-12.
- Recknagel RO, Glende EA, Jr., Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther.* 1989;43(1):139-54.
- Rice-Evans CA, Miller NJ. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans.* 1996 Aug;24(3):790-5.
- Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet.* 2008 Mar 8;371(9615):838-51.
- Sherlock S, Dooley J. Doenças do fígado e do sistema biliar. Rio de Janeiro 2004.
- Silberberg M, Morand C, Mathevon T, Besson C, Manach C, Scalbert A, et al. The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. *Eur J Nutr.* 2006 Mar;45(2):88-96.
- Singh D, Chander V, Chopra K. The effect of quercetin, a bioflavonoid on ischemia/reperfusion induced renal injury in rats. *Arch Med Res.* 2004 Nov-Dec;35(6):484-94.
- Tapiero H, Tew KD, Ba GN, Mathe G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother.* 2002 Jun;56(4):200-7.
- Tieppo J, Cuevas MJ, Vercelino R, Tunon MJ, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J. Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats. *J Nutr.* 2009 Jul;139(7):1339-46.
- Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Marroni CA, Marroni N. Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress. *Arq Gastroenterol.* 2005 Oct-Dec;42(4):244-8.

- 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.
- Tokyol C, Yilmaz S, Kahraman A, Cakar H, Polat C. The effects of desferrioxamine and quercetin on liver injury induced by hepatic ischaemia-reperfusion in rats. *Acta Chir Belg.* 2006 Jan-Feb;106(1):68-72.
- Torres M, Jarvisalo J, Hakim J. The liver-protective enzymes against reduced forms of oxygen in phenobarbital-treated rats. *Enzyme.* 1981;26(3):129-35.
- Toth CA, Thomas P. Liver endocytosis and Kupffer cells. *Hepatology.* 1992 Jul;16(1):255-66.
- Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta.* 2006 Feb;364(1-2):33-60.
- Urtasun R, Nieto N. [Hepatic stellate cells and oxidative stress]. *Rev Esp Enferm Dig.* 2007 Apr;99(4):223-30.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
- van Acker SA, van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJ, et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med.* 1996;20(3):331-42.
- Vercelino R, Tieppo J, Dias AS, Marroni CA, Garcia E, Meurer L, et al. N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008 Apr;102(4):370-6.
- Vitaglione P, Morisco F, Caporaso N, Fogliano V. Dietary antioxidant compounds and liver health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004;44(7-8):575-86.
- Watanabe T, Kudo M, Chiba T, Wakatsuki Y. Molecular mechanisms of portal vein tolerance. *Hepatol Res.* 2008 Apr 22;38(5):441-9.
- Waxman DJ, Azaroff L. Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem J.* 1992 Feb 1;281 ( Pt 3):577-92.
- Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol.* 2003;33(2):105-36.
- Weiler-Normann C, Herkel J, Lohse AW. Mouse models of liver fibrosis. *Z Gastroenterol.* 2007 Jan;45(1):43-50.
- Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 2000 Jul 15;60(14):3823-31.
- Wilms LC, Hollman PC, Boots AW, Kleinjans JC. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutat Res.* 2005 Apr 4;582(1-2):155-62.
- Yang K, Lamprecht SA, Liu Y, Shinozaki H, Fan K, Leung D, et al. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis.* 2000 Sep;21(9):1655-60.
- Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomas-Barberan FA, Datta N, Singanusong R, et al. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum Nutr.* 2004 Summer;59(3):113-22.

Produção bibliográfica durante a vigência da bolsa



- 1) Rosa DP, Bona S, Simonetto D, Zettler C, Marroni CA, Marroni NP. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. *Arq Gastroenterol.* 2010 Mar;47(1):72-8.
- 2) Rodrigues G, Marcolin E, Bona S, Porawski M, Lehmann M, Marroni NP. Hepatic alterations and genotoxic effects of *Croton cajucara* benth (sacaca) in diabetic rats. *Arq Gastroenterol.* *in press* 2010.



- 1) Di Naso FC, Mello RN, Bona S, Dias AS, Porawski M, Ferraz AF, Richter MF, Marroni NP. Effect of *Agaricus blazei* Murill on the Pulmonary Tissue of Animals with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Experimental Diabetes Research* Volume 2010, Article ID 543926, 8 pages. doi:10.1155/2010/543926



- 1) Marroni NP, Pavanatto M A, Bona S, Marroni CA. Fígado: Estresse oxidativo e inflamação. In: Norma Possa Marroni. (Org.). *Estresse Oxidativo e Inflamação: Dos modelos experimentais à clínica.* 1 ed. Canoas - RS: ULBRA, 2008, v. 1, p. 61-80.