

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

**AÇÃO PROTETORA DA QUERCETINA NA SÍNDROME  
HEPATOPULMONAR EXPERIMENTAL**

*Juliana Tieppo*

Porto Alegre – RS, 2009.

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

**AÇÃO PROTETORA DA QUERCETINA NA SÍNDROME  
HEPATOPULMONAR EXPERIMENTAL**

*Juliana Tieppo*

**Orientadora:** Prof. Dra. Norma Possa Marroni

**Co-orientador:** Prof. Dr. Javier González-Gallego

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

Porto Alegre – RS, 2009.

## ***Dedicatória...***

*A concretização deste trabalho resulta de muito apoio e atenção, portanto, retorno meu reconhecimento, dedicando-o a*

***Maucir e Norma**, meus pais, pelo amor incondicional, pela compreensão e estímulo constantes, pela educação, por todos os abraços e palavras sábias nos momentos convívios e, em especial, por serem meus pais que eu amo.*

***Maurício**, meu “mano”, meu melhor amigo, companheiro sem falta e, por ser o melhor irmão do mundo.*

***Ivonny**, a dinda mais especial do mundo, por estar ao “meu lado” em “todos os momentos” dessa caminhada.*

***En especial**, a mi amor, **Arturo**, mi vida, por ser como eres, por haberte encontrado por el camino como un haz de una luz, por ser el gran amor de mi vida por siempre.*

## **Agradecimentos**

- À **Dra. Norma Possa Marroni**, minha orientadora entre tantos outros papéis e por ser pessoa única, ímpar e tão especial. Agradeço a excelente orientação, o incentivo constante, a coragem, o apoio, o exemplo, as oportunidades, os caminhos abertos, os ensinamentos, o estar ao seu lado e sob o seu olhar em mais essa trajetória.
- Ao **Dr. Cláudio Augusto Marroni**, grande idealizador deste trabalho. Obrigada pelo apoio e incentivo, pelos esclarecimentos, por ser exemplo, pelas sugestões sempre tão pertinentes e enriquecedoras ao acompanhar a pesquisa, compartilhando seus conhecimentos.
- Ao **Dr. Javier González-Gallego**, coorientador desta tese. Obrigada por acreditar em mim, por receber-me em sua *Universidad* de braços abertos, pela oportunidade vivenciada e pelos ensinamentos.
- À **Dra. Maria Jesus Tuñon**, exemplar como pessoa e profissional. Obrigada pela oportunidade de desfrutar de seus conhecimentos, pela amizade, compreensão, paciência e sorriso constantes que tornaram meus dias na Unileon produtivos e alegres.
- Ao **Dr. José Luiz Mauriz**, à **Dra. Maria José Cuevas González**, à **Dra. Sonia Sanchez Campos**, à **Dra. Victoria Garcia Mediavilla** e à **Dra. Suzana Martinez**. Meu eterno agradecimento pelo incessante apoio, pela confiança e por me presentearem diariamente com seus conhecimentos e alegre presença.

- Ao **Dr. Alexandre Simões Dias**, à **Dra. Marilene Porawski** e ao **Dr. Henrique Fillmann**. Agradeço por serem meus guias desde o início desta caminhada, por me incentivarem, sendo exemplos constantes como pesquisadores e como amigos.
- À **Dra. Jaqueline Picada**. Obrigada por enriquecer de forma ímpar este trabalho. Agradeço também pelos conhecimentos e técnicas, empenho e dedicação e pelo nosso primeiro artigo referente a esta pesquisa.
- À **Dra. Themis Reverbel da Silveira**. Obrigada pelo carinho, por acreditar e valorar nosso trabalho por meio de interesse, enriquecimento e apoio constante.
- Ao **Dr. Luiz Antonio Rodriguez de Freitas**. Agradeço pela colaboração científica e pela oportunidade ímpar no Laboratório de Patologia Experimental do Instituto Gonçalo Muniz – FIOCRUZ - Bahia.
- Ao amigo **Éder Marcolin**, irmão de alma. Obrigada pelo companheirismo, amizade e força. Agradeço os momentos de descontração, a ajuda imparcial na conclusão de mais esta etapa e a decisão em nos aventurarmos, pois “temos um livro a escrever e a história está ficando cada vez maior”.
- A todos os **verdadeiros amigos** e **amigas** por preencher meus dias de alegria e confiança.
- Ao companheiro de longa data, **Rafael Vercelino**, pelos 10 anos de companheirismo e amizade trabalhando juntos.
- Aos **amigos** e **colegas** do **Laboratório de Hepatologia Experimental – Fisiologia** do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – **Nélson Kretzmann Filho**, **Camila Marques**, **Luis Forgiarini**, **Felipe Forgiarini**, **Darlan Pase da Rosa**, **Sílvia Bona** e **Graziella Rodriguez**. Agradeço a amizade, a ajuda imparcial e a dedicação em todos os momentos desse trabalho.

- A todos os componentes do **Departamento de Fisiologia da UFRGS**, em especial, à Dra. Ilma de Brum e à secretária Alice Machado. Obrigada pela atenção, carinho e oportunidade de participar do programa de Pós-Graduação.
- Aos componentes do **Centro de Pesquisa Experimental** do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial, à Unidade de Experimentação Animal, ao serviço de Patologia e ao GPPG. A todos, meu carinho e reconhecimento.
- Aos componentes do **Departamento de Biomedicina da *Universidad de León*** agradeço a acolhida e a confiança.

*"No es sabio el que sabe donde  
está el tesoro, sino el que trabaja y lo  
saca."*

***Francisco de Quevedo***

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	22
<b>1 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	26
<b>1.1 Síndrome Hepatopulmonar (SHP)</b>	27
1.1.1 Definição	27
1.1.2 Fisiopatologia	30
<b>1.2 Cirrose Biliar Secundária</b>	33
<b>1.3 Ligadura de Ducto Biliar Comum e SHP Experimental</b>	34
<b>1.4 Estresse Oxidativo e Antioxidantes</b>	42
1.4.1 Radicais Livres e Espécies Ativas de Oxigênio	42
1.4.2 Defesas Antioxidantes	49
1.4.3 Defesas Antioxidantes Enzimáticas	50
1.4.4 Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas	51
1.4.5 Flavonoides	53
1.4.6 Quercetina	54
<b>1.5 Avaliação de Atividade Genotóxica</b>	56
<b>1.6 Avaliação de Atividade Antigenotóxica</b>	57
<b>1.7 A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo</b>	57
<b>2 OBJETIVOS DO ESTUDO</b>	59
<b>2.1 Objetivo Geral</b>	60
<b>2.2 Objetivos Específicos</b>	60
2.2.1 Experimento I	60
2.2.2 Experimento II	61
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	63
<b>3.1 Experimento I</b>	64
3.1.1 Delineamento da Pesquisa	64
3.1.2 Flavonoide Quercetina	64
3.1.3 Delineamento Experimental	64
3.1.3.1 <i>Animais</i>	64
3.1.3.2 <i>Modelo experimental</i>	65
3.1.4 Análise de Micronúcleos	67



3.1.5 Ensaio Cometa	67
3.1.6 Ensaio em bactérias e leveduras	68
3.1.6.1 Linhagens	68
3.1.7 Ensaio de mutagenicidade e antimutagenicidade em bactérias	69
3.1.8 Ensaio de sensibilidade em linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	69
3.1.9 Análise Estatística	70
<b>3.2 Experimento II</b>	71
3.2.1 Delineamento da Pesquisa	71
3.2.2 Flavonoide Quercetina	71
3.2.3 Delineamento Experimental	71
3.2.3.1 Animais e Tratamento	71
3.2.3.2 Testes hepáticos, mensuração venosa portal e mensuração de gases arteriais	73
3.2.4 Análises histológicas	75
3.2.5 Imuno-histoquímica	76
3.2.6 Análises bioquímicas	76
3.2.6.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	76
3.2.6.2 Superóxido Dismutase (SOD)	77
3.2.6.3 Avaliação dos Metabólitos do Óxido Nítrico	77
3.2.7 Reação em cadeia da polimerase em tempo real – RT-PCR	78
3.2.8 Ensaio de mobilidade eletroforética – EMSA	79
3.2.9 Western Blot	81
3.2.10 Análise Estatística	82
<b>4 RESULTADOS</b>	83
<b>4.1 Experimento I</b>	84
<b>4.2 Experimento II</b>	92
<b>5 DISCUSSÃO GERAL</b>	101
<b>CONCLUSÕES</b>	118
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	121
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	123

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{mol}$	Micromol
$\alpha\text{-SMA}$	$\alpha$ -actina do músculo liso
$\text{AaO}_2$	Diferença alvéolo-arterial de oxigênio
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALT	Alanina-aminotransferase
AST	Aspartato-aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
BDL	Ligadura de ducto biliar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\text{Ca}^{++}$	Cálcio
CAT	Catalase
CBDL	Ligadura de ducto biliar comum
CBS	Cirrose biliar secundária
$\text{CCl}_4$	Tetracloroeto de carbono
Cdna	DNA complementar
Cm	Centímetros
CO	Controle
$\text{Cu}^{2+}$	Cobre
Cu-ZnSOD	SOD cobre-zinco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPM	Desvio padrão da média
DTT	Ditiotreitol
EAO	Espécies ativas de oxigênio
EAN	Espécies ativas de nitrogênio
EC	Ensaio cometa
ED1	Marcador celular de ativação de macrófagos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido etileno-glicol tetra-acético
EMSA	Ensaio de mobilidade eletroforética
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ENC	Eritrócitos normocromáticos
EPC	Eritrócitos policromáticos

EPM	Erro padrão da média
ETBr	Receptores de endotelina tipo B
ET-1	Endotelina-1
FA	Fosfatase alcalina
FD	Frequência de dano
Fe <sup>2+</sup>	Ferro
FeSOD	SOD ferro
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSH	Glutaciona oxidada
GPx	Glutaciona peroxidase
HCl	Ácido clorídrico
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HSP-32	Proteína de choque térmico-32
HO-1	Heme oxigenase 1
HPRT	Hipoxantina fosforibotransferase
ID	Índice de dano
IKB	inibidor kappa-B
IKK	Inibidor kappa quinase
IM	Índice mutagênico
iNOS	Óxido nítrico sintase indúzível
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Di-hidrogeno fosfato de potássio monobásico
LDBC	Ligadura de ducto biliar comum
LPO	Liperoxidação
M	Molar
mA	Miliamperes
MEC	Matriz extracelular
MG	Miligramas
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
MMPs	Metaloproteinases
MnSOD	SOD manganês
NaCl	Cloreto de sódio 0,9%
NADPH	Fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio di-básico
NaOH	Hidróxido de sódio
NFκB	Fator de transcrição nuclear Kappa B
nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	Ânion superóxido
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio Singlet
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxil
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PaCO <sub>2</sub>	Pressão parcial de gás carbônico arterial
PaO <sub>2</sub>	Pressão parcial de oxigênio arterial
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas

pH	Potencial de hidrogênio
PMSF	Fenilmetilsulfonil de flúor
POD	Piruvato oxidase
PVDF	Polifluorofuro de vinilideno
Q	Quercetina
RL	Radicais livres
RNA	Ácido ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
RO•	Radical Alcoxil
SatO <sub>2</sub> /Hb	Saturação de oxigênio da hemoglobina
SOD	Superóxido dismutase
SHP	Síndrome hepatopulmonar
SP1	Proteína específica 1
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
<i>t</i> -BOOH	terc-butil-hidroperóxido
TGFβ	Fator de crescimento transformador β
TNFα	Fator de necrose tumoral α
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TIMP-1	Inibidore tecidual de metaloproteinase-1
V	Volts
W	Watts

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Efeito <i>shunt</i> relacionando a hipoxemia com as dilatações vasculares pulmonares	32
<b>Figura 2</b>	Modelo experimental de Ligadura de Ducto Biliar Comum	35
<b>Figura 3</b>	Célula estrelada em um processo de dano hepático	36
<b>Figura 4</b>	Efeito da ET-1 na microvasculatura normal	37
<b>Figura 5</b>	Efeito da ET-1 na microvasculatura na SHP	37
<b>Figura 6</b>	Papel do Óxido Nítrico no sistema imune e transcrição da iNOS	40
<b>Figura 7</b>	Esquema da produção das EAO	43
<b>Figura 8</b>	Esquema da redução do O <sub>2</sub> em H <sub>2</sub> O, na respiração mitocondrial e a redução das EAO	46
<b>Figura 9</b>	Esquema da interação entre as enzimas antioxidantes	52
<b>Figura 10</b>	Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração	55
<b>Figura 11</b>	Estrutura química da quercetina	56
<b>Figura 12</b>	Posicionamento do animal para cirurgia; Laparotomia e LDBC; Sutura em planos	73
<b>Figura 13</b>	Mensuração da pressão venosa portal; Polígrafo Lettica	74
<b>Figura 14</b>	Coleta de sangue da Aorta Abdominal para Gasometria Arterial	74

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Hepatologia Experimental – Fisiologia – no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Instituto de Biomedicina da Universidade de Leon – Espanha. Foi subvencionado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA), Programa de Pós-graduação em Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (UFRGS) e Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd).

O trabalho apresenta-se organizado da seguinte forma: a introdução aborda os aspectos mais importantes referentes à Síndrome Hepatopulmonar, clínica e experimentalmente, e revisão sobre estresse oxidativo e antioxidantes endógenos e exógenos -quercetina- que foi utilizada em nossas investigações como possível tratamento pela sua potente atividade antioxidante. Em seguida, apresenta nossos objetivos gerais e específicos referentes ao experimento I e ao experimento II separadamente. Em continuação, têm-se materiais e métodos referentes aos experimentos I e II, também colocados separadamente. Na seção de resultados, encontram-se os artigos científicos publicados (Experimento I e Experimento II), durante o período de execução do doutorado, referentes aos temas desta tese. Logo, uma discussão geral busca integrar os achados descritos anteriormente nos experimentos. Na sequência, são descritas as conclusões, as perspectivas futuras e, como anexo final, as demais publicações obtidas.

---

## **RESUMOS**

---



## RESUMOS

### (ARTIGO I)

A Síndrome hepatopulmonar (SHP) decorre de doenças hepáticas quando há extensa vasodilatação pulmonar com alteração na difusão de gases, levando à hipoxemia. Os radicais livres podem ter um papel significativo, contribuindo para a progressão da SHP, e flavonoides poderiam proteger contra os efeitos deletérios daqueles. Neste estudo, utilizamos o flavonoide quercetina em modelo experimental de cirrose biliar secundária induzida pela ligadura de ducto biliar comum em ratos. A quercetina foi administrada na dose de 50 mg / kg durante quatorze dias em ratos cirróticos e controles. Foi extraída a medula óssea do osso fêmur para análises de micronúcleos. O pulmão, o fígado e o sangue foram coletados para detectar danos do DNA, utilizando o teste cometa. Os resultados mostraram que os danos ao DNA e dos micronúcleos no pulmão e no fígado foram aumentados em ratos BDL. A quercetina não causou dano ao DNA, diminuiu a ocorrência de células micronucleadas na medula óssea, bem como reduziu danos nos tecidos estudados nos animais cirróticos tratados. Ela mostrou atividade antimutagênica contra hidropéroxidos, quando avaliada sua ação sobre o estresse oxidativo em linhagens sensíveis TA102 (*Salmonella typhimurium*) e IC203 (*Escherichia coli*), sugerindo proteção pela varredura de radicais livres. Nas análises com levedura *Saccharomyces cerevisie* deficientes de superóxido dismutase citosólica e mitocondrial, os resultados indicaram que a quercetina protegeu as células por indução de enzimas antioxidantes. O presente estudo é o relato de efeitos genotóxicos / antígenotóxicos da quercetina em um modelo animal de cirrose. Neste modelo, ela não foi capaz de induzir a genotoxicidade e vice-versa, o que aumentou a estabilidade no genoma dos ratos cirróticos, sugerindo efeitos benéficos, provavelmente por suas propriedades antioxidantes.

## **RESUMOS**

### **(ARTIGO II)**

A síndrome hepatopulmonar (SHP) é complicação comum da cirrose hepática na qual ocorre a superexpressão de receptores endoteliais pulmonares tipo B (ETB), reforçando a ação da óxido nítrico endotelial (eNOS) e, conseqüentemente, aumentando a produção de NO. Além disso, também ocorre aumento da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e da heme oxigenase-1 (HO-1) que são importantes mediadores no desenvolvimento da vasodilatação. Tais mudanças podem ser influenciadas pelo estado redox, que influencia na ação de fatores de transcrição como o NFκB. Neste estudo, nosso objetivo foi avaliar os efeitos antioxidantes do flavonoide quercetina sobre o desenvolvimento do SHP em ratos com ligadura do ducto biliar comum (CBDL). Os ratos foram divididos em quatro grupos: ratos Sham (ratos submetidos à simulação CBDL), ratos Sham submetidos ao tratamento com quercetina, ratos submetidos à CBDL e ratos CBDL submetidos ao tratamento com quercetina. A quercetina (50 mg / kg) foi administrada durante duas semanas, com início em quatorze dias após a cirurgia. No tecido pulmonar de ratos CBDL, observamos aumento na produção de NO, superexpressão de iNOS, eNOS, HO-1, e receptores ETB, além de ativação do NFκB. Logo, a quercetina inibiu o estresse oxidativo, a ativação NFκB e a expressão de diferentes mediadores pulmonares envolvidos na SHP. Ela também melhorou as lesões hepáticas e reduziu significativamente a expressão da endotelina-1 e HO-1 no tecido hepático dos animais CBDL tratados em relação aos cirróticos não tratados. Nossos achados sugerem que a administração da quercetina após o aparecimento da lesão hepática melhora significativamente as complicações pulmonares em ratos após a CBDL e contribui para limitação da evolução da cirrose, possivelmente devido a suas propriedades antioxidantes.

---

## ABSTRACTS

---

## **ABSTRACTS**

### **(ARTICLE I)**

The hepatopulmonary syndrome (HPS) occurs when intrapulmonary dilatation causes hypoxemia in cirrhosis. The free radicals may play a significant contributory role in the progression of HPS, and flavonoid agents could protect against deleterious effects of free radicals. The flavonoid quercetin was evaluated in an experimental model of biliary cirrhosis induced by bile duct ligation (BDL) in rats. Quercetin was administered at 50 mg/kg for 14 days to cirrhotic and non-cirrhotic rats. Bone marrow was extracted from animals to analyze micronuclei. Lung, liver and blood were extracted to detect DNA damage using the comet assay. The results showed that the micronuclei and DNA damages to lung and liver were increased in BDL rats. Quercetin caused no damage to the DNA while decreasing the occurrence of micronucleated cells in bone marrow as well as DNA damage to lung and liver in cirrhotic rats. Quercetin showed antimutagenic activity against hydroperoxides as evaluated by the oxidative stress sensitive bacterial strains TA102 *Salmonella typhimurium* and IC203 *Escherichia coli*, suggesting protection by free radical scavenging. In *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains lacking mitochondrial or cytosolic superoxide dismutase, these results indicate that quercetin protects cells by induction of antioxidant enzymes. The present study reports the genotoxic/antigenotoxic effects of quercetin in a model of animal cirrhosis. In this model, quercetin was not able to induce genotoxicity and, conversely, it increased the genomic stability in the cirrhotic rats, suggesting beneficial effects, probably by its antioxidant properties.

## **ABSTRACTS**

### **(ARTICLE II)**

In the hepatopulmonary syndrome (HPS), a common complication of liver cirrhosis, pulmonary endothelial endothelin B (ETB) receptor overexpression, enhanced endothelial nitric oxide (NO) synthase (eNOS)-derived NO production, and increases in pulmonary inducible NO synthase (iNOS) and heme oxygenase (HO-1) are important factors in the development of vasodilatation. These changes may be influenced by redox-sensitive signaling pathways, including nuclear factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). In this study, our aim was to evaluate the effects of the flavonoid antioxidant quercetin on the development of HPS in rats with common bile duct ligation (CBDL). Rats were divided into the following 4 groups: rats subjected to CBDL, Sham (rats subjected to simulated CBDL), quercetin-treated sham, and quercetin-treated CBDL. Quercetin (50 mg/kg) was administered for 2 wk starting on d 14 after surgery. Increased NO production, overexpression of iNOS, eNOS, HO-1, and ETB-receptor and activation of NF-kB were observed in lung of CBDL rats. Quercetin inhibited oxidative stress, NF-kB activation, and the expression of different pulmonary mediators involved in HPS. Quercetin also ameliorated liver injury and reduced the expression of hepatic endothelin-1 and HO-1 in untreated cirrhotic rats. Our findings suggest that quercetin administered after the onset of hepatic injury significantly ameliorates pulmonary complications in CBDL rats and that limitation of cirrhotic evolution contributes to this effect.

## **INTRODUÇÃO**

## **INTRODUÇÃO**

A associação entre doença hepática crônica e alterações respiratórias foi reconhecida há mais de cem anos, entretanto, somente nos últimos quinze anos, a detecção de alterações vasculares pulmonares associadas com a presença de cirrose e/ou de hipertensão portal tem sido submetida a maiores investigações (Ling et al., 2004).

As alterações vasculares pulmonares relacionadas com doenças hepáticas crônicas compreendem duas síndromes distintas: a Síndrome Hepatopulmonar (SHP), caracterizada pela dilatação da microvasculatura pulmonar, e a Hipertensão Portopulmonar, caracterizada pela constrição, remodelamento das artérias pulmonares e aumento da sua resistência vascular (Ling et al., 2004).

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

A SHP é conceituada como relação clínica existente entre a disfunção hepática e a existência de dilatações vasculares pulmonares e/ou alterações da difusão de gases, e definida pela tríade que compreende a presença de doença hepática, aumento do gradiente alvéolo-

capilar e dilatações vasculares intrapulmonares, na ausência de doença pulmonar ou cardíaca coexistente, as quais podem resultar em concentrações arteriais de oxigênio abaixo da normalidade, levando a alterações sistêmicas (Rodriguez-Roisin and Krowka, 2008).

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

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

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

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

Na cirrose biliar secundária, há alterações nos mecanismos antioxidantes, que levam a desequilíbrio entre os processos oxidativos e antioxidativos, o que estimula o processo de peroxidação lipídica, provocando lesões hepáticas (Schattenberg et al., 2005). Também está demonstrada a participação dos radicais livres na fisiopatologia da cirrose causada por estase biliar (Forestier et al., 1997).

Estudos realizados por Tieppo e colaboradores, em 2005, demonstram que ratos cirróticos por ligadura de ducto biliar comum apresentam hipoxemia e aumento da lipoperoxidação em



homogeneizado de tecido pulmonar, provavelmente devido à ação oxidativa de radicais livres em altas concentrações na circulação pulmonar.

Compostos antioxidantes e flavonoides são considerados eficazes para diminuir fibrose em modelos animais de cirrose biliar secundária por ligadura do ducto biliar comum, de cirrose por álcool ou por administração de tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) (Muriel et al., 1994).

Os estudos prévios levaram-nos a considerar a hipótese de que a melhora da função hepática, através do uso de antioxidantes, poderia amenizar as complicações pulmonares, características da SHP (Tieppo et al., 2005, Tieppo et al., 2007, Vercelino et al., 2008a).

Avaliando as alterações causadas pela SHP e a atual existência de um modelo específico para se estudar em mudanças hepáticas e pulmonares, características dessa doença, inclusive o envolvimento do estresse oxidativo, o presente trabalho tem como objetivo verificar os efeitos do flavonoide quercetina como agente genotóxico e mutagênico em estudos *in vitro*. Também objetiva a verificação de seu potencial como agente terapêutico antioxidante, em estudos *in vivo*, nos tecidos hepático e pulmonar de ratos com ligadura de ducto biliar comum.

## **1 REFERENCIAL TEÓRICO**

## 1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 Síndrome Hepatopulmonar (SHP)

#### 1.1.1 Definição

Pacientes com enfermidades hepáticas têm risco considerável de desenvolver grande variedade de complicações como varizes, ascite, peritonite bacteriana, encefalopatia, síndrome hepatorenal, síndrome hepatopulmonar, entre muitas outras (Zhang et al., 2007).

Além disso, as doenças crônicas do fígado podem levar a disfunções no sistema cardiovascular e pulmonar, com alterações hemodinâmicas que incluem aumento do débito cardíaco, baixa resistência vascular e vasodilatação (Russo et al., 2005). A hipertensão portal, a encefalopatia hepática e o desenvolvimento de ascite são complicações secundárias aos distúrbios hemodinâmicos que ocorrem em hepatopatas crônicos (Fernando et al., 1998).

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

A SHP é caracterizada por um defeito na oxigenação arterial, causado por dilatações vasculares pulmonares na presença de alterações hepáticas (Rodriguez-Roisin and Krowka, 2008), ou seja, trata-se de situação clínica em que uma doença hepática determina alterações

vasculares pulmonares com modificações na oxigenação sanguínea e dilatações vasculares intrapulmonares (Sherlock, 1993).

Em 1966, Berthelot e colaboradores documentaram, através de autópsias feitas em pacientes com diagnóstico prévio de cirrose hepática, a presença de dilatações pré-capilares pulmonares difusas, variando de 15 a 150  $\mu\text{m}$  em seu diâmetro, bem como “aranhas” vasculares na pleura das bases pulmonares, e a presença de malformações arteriovenosas na presença de hipoxemia arterial (Berthelot et al., 1966).

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

Atualmente, aceita-se sua definição como uma síndrome clínica na qual deve haver presença obrigatória de três componentes: 1) doença hepática; 2) dilatação vascular pulmonar; 3) alterações na oxigenação (Rodriguez-Roisin and Krowka, 2008).

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

Na disfunção respiratória por alteração da difusão de gases, que se desenvolve em pacientes com doença hepática avançada sem doença coexistente do parênquima pulmonar, confirma-se o diagnóstico da SHP, também chamada angiodisplasia hepatogênica (Eriksson, 1990, Rodriguez-Roisin and Krowka, 2008).

A SHP desenvolve-se em cerca de 10 a 20% dos pacientes com cirrose (Tiano et al., 2002, Fallon and Abrams, 2000) e independe de faixa etária (Rodriguez-Roisin and Krowka, 2008). A hipoxemia geralmente é progressiva e os índices de mortalidade são significativamente aumentados em pacientes cirróticos com SHP em relação aos pacientes sem a síndrome (Fuhrmann et al., 2006).

A classificação da gravidade do quadro clínico do paciente com SHP baseia-se em anormalidades na oxigenação, tendo influência vital na sobrevivência, e útil na determinação da sobrevida e fatores de risco em situação de transplante hepático. Os componentes vasculares incluem capilares pulmonares dilatados localizados ou difusos, e menos comumente, comunicações arterio-venosas pulmonares e pleurais (Rodríguez-Roisin and Krowka, 2008). A hipoxemia arterial é comum no contexto da doença hepática e tem causas multifatoriais (ex.: ascite, hidrotórax hepático e doença pulmonar obstrutiva crônica principalmente em alcoólistas), mas, particularmente no caso da SHP, os fatores patofisiológicos são únicos (Rodríguez-Roisin and Krowka, 2008).

As anormalidades nas trocas gasosas são caracterizadas pela deoxigenação. A *European Respiratory Society (ERS) Task Force* propõe o seguinte estagiamento da severidade da SHP baseado na determinação da PaO<sub>2</sub> (Rodríguez-Roisin et al., 2004).

Média: PaO<sub>2</sub> >80 mmHg

Moderada: PaO<sub>2</sub> <80 a 60 mmHg

Severa: PaO<sub>2</sub> <60 a 50 mmHg

Muito Severa: PaO<sub>2</sub> <50 mmHg

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

Atualmente, apesar de significativa quantidade de estudos experimentais sobre a SHP e avaliação de efeitos de algumas terapias, a patogênese ainda permanece sem completo entendimento, e terapias médicas ainda não foram viabilizadas em pacientes (Tieppo et al., 2009). Logo, considerando o alto risco cirúrgico em pacientes gravemente hipoxêmicos, faz-se necessária uma terapia medicamentosa efetiva para o tratamento da SHP.

### 1.1.2 Fisiopatologia

A única característica marcante da SHP é a acentuada dilatação de capilares pulmonares (para 15-100  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com o paciente em repouso) (Berthelot et al., 1966). Além disso, a vasculatura pulmonar na cirrose hepática é caracterizada pela combinação paradoxal da redução ou ausência de tônus e de certo grau de inibição da vasoconstrição pulmonar hipóxica (Rodriguez-Roisin et al., 1987).

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

Vários mediadores humorais têm sido propostos como vasodilatadores circulantes responsáveis pela SHP, entre eles, as prostaglandinas, o glucagon, a substância P, o peptídeo atrial natriurético, o fator de ativação plaquetário e o óxido nítrico (NO) (Panos and Baker, 1996).

Na busca de uma substância específica, a principal hipótese é a do possível envolvimento do fator relaxante derivado do endotélio (óxido nítrico) como um potencial mediador nesta síndrome (Perrella et al., 1992, Vallance and Moncada, 1991).

Muitos estudos têm valorizado o possível envolvimento do óxido nítrico (NO) pelo seu papel de vasodilatador capilar, possivelmente um fator que persiste, por alguma razão ainda não conhecida, em níveis elevados em relação ao normal, potencializando a formação de dilatações vasculares intrapulmonares, atuando como potencial mediador nessa síndrome (Rabiller et al., 2002, Thannickal and Fanburg, 2000).

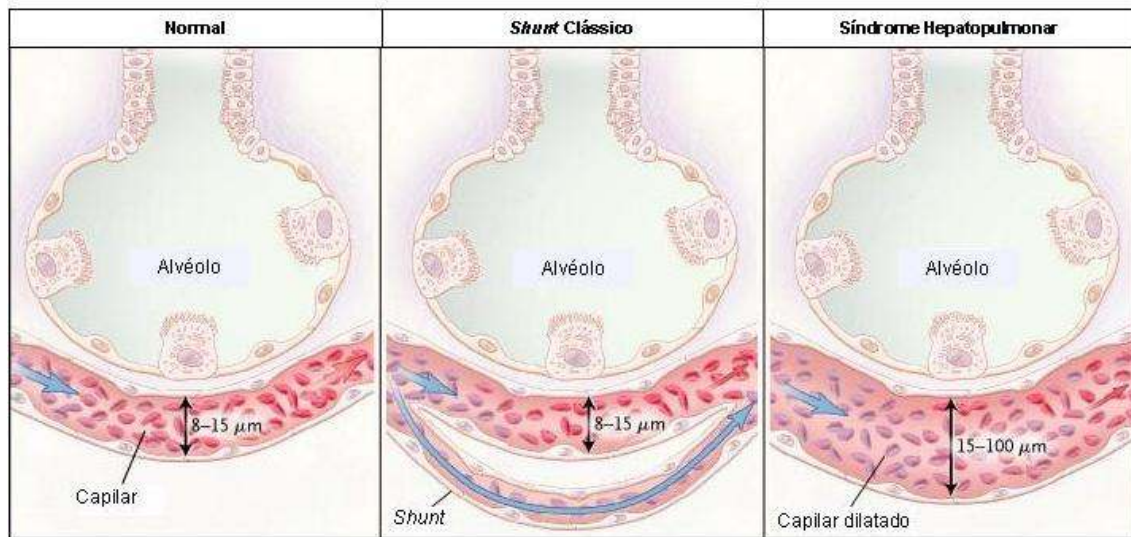
Atualmente, a atenção é focada sobre a produção excessiva de vasodilatadores, particularmente o NO, que é visto como fator vasoativo responsável pela vasodilatação pulmonar (Fallon, 2005). Muitas pesquisas reforçam essa ideia, e muitos estudos têm mostrado a ação do NO na interação fígado-pulmão (Matsumoto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

O óxido nítrico é um gás denominado fator relaxante derivado do endotélio, que, em situações de endotoxemia, mostra-se em níveis elevados nos tecidos. Nesta situação patológica, existe importante indução da atividade da NOS entre os macrófagos e as células endoteliais, mediada por endotoxinas bacterianas e citocinas liberadas, resultando em significativa produção de NO (Fallon, 2006, Rolla, 2004).

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

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

O desequilíbrio entre a difusão-perfusão é um mecanismo que pode explicar a hipoxemia na SHP. Esse mecanismo pode ser responsável pela alteração do gradiente de oxigenação alvéolo-capilar ou efeito *shunt* e relaciona a hipoxemia às dilatações vasculares pulmonares. No capilar dilatado e com diâmetro maior, a molécula de oxigênio vinda do alvéolo não pode difundir-se até o centro do vaso, e a hipoxemia, resultante desse fenômeno, ainda pode ser agravada pelo estado hiperdinâmico circulatório, com menor tempo disponível para o trânsito da hemácia dentro do capilar pulmonar (**Figura 1**). Essa anormalidade na difusão-perfusão traduz a dificuldade do oxigênio em saturar as hemácias em um capilar pulmonar anormalmente dilatado, evidenciando o efeito *shunt* funcional. O *shunt* funcional ocorre devido à diminuição da difusão do oxigênio através da membrana alvéolo-capilar, uma consequência da anormalidade de perfusão que acomete o pulmão de pacientes cirróticos (Rodriguez-Roisin and Krowka, 2008).



**Figura 1.** Efeito *shunt* relacionando a hipoxemia com as dilatações vasculares pulmonares (Kinane and Westra, 2004).

Em modelos experimentais, foi demonstrada a ação vasodilatadora do NO e que o aumento da NO sintase endotelial (eNOS) no tecido pulmonar estaria relacionado à hipoxemia (Fallon et al., 1997, Rolla et al., 1997, Nunes et al., 2001). Os estudos sugerem a ação do NO como o responsável pela vasodilatação intrapulmonar encontrada na SHP, mas novos trabalhos devem ser realizados para melhor compreensão dos mediadores causadores da SHP.

Além do envolvimento do NO, a endotelina-1 (ET-1) que, em condições normais, é um vasoconstritor parácrino que atua na regulação do tônus vascular, também vem sendo amplamente estudada, visto que, em situações de cirrose biliar secundária, ocorre a superprodução de ET-1 pelas células estreladas hepáticas, a qual passa a atuar de forma endócrina, atingindo a circulação pulmonar e aumentando ainda mais a produção de NO, contribuindo também para a vasodilatação na microcirculação pulmonar (Fallon and Abrams, 2000).

Também já foi demonstrado que animais cirróticos por ligadura de ducto biliar comum apresentavam hipoxemia e aumento da LPO em homogeneizado de pulmão, provavelmente devido à ação oxidativa de radicais livres e do NO em altas concentrações na circulação pulmonar (Tieppo et al., 2005).



## 1.2 Cirrose Biliar Secundária

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

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

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

A obstrução crônica da via biliar extra-hepática pode determinar a estase biliar e áreas focais de necrose centrolobular, necrose periportal, proliferação e dilatação dos ductos e canaliculos biliares dos espaços porta, colangite estéril ou infecciosa com infiltração de polimorfonucleares, edema e fibrose dos espaços porta. Como em outras formas de cirrose, a lesão é acompanhada de fenômenos degenerativos e regenerativos do parênquima residual, com a formação de nódulos (Abdel-Aziz et al., 1990).

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

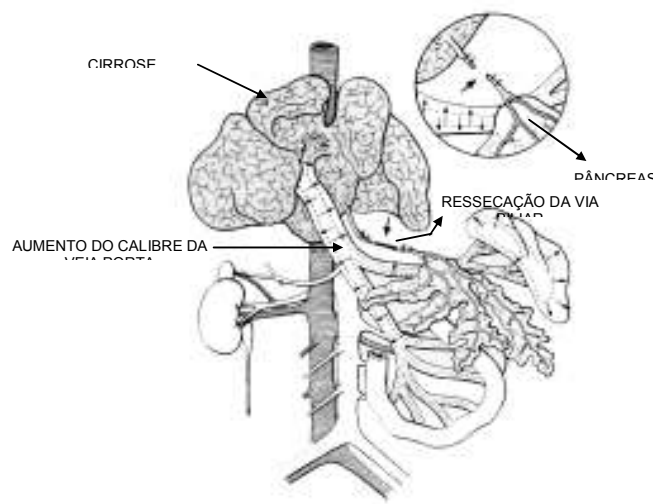
O dano hepático colestático é uma característica da cirrose biliar secundária. Define-se com critérios histopatológicos específicos e bioquímicos bem estabelecidos.

A citotoxicidade dos ácidos biliares é atribuída a diversos mecanismos, incluindo as suas propriedades detergentes, a alteração da homeostase do  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, a depleção de ATP e o dano mitocondrial. Trabalhos recentes sugerem que na patogênese do dano colestático hepático participam espécies ativas de oxigênio e reações de radicais livres (Parola et al., 1996, Pastor et al., 1997, Videla et al., 2004).

### 1.3 Ligadura de Ducto Biliar Comum e SHP Experimental

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

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



**Figura 2** – Modelo experimental de Ligadura de Ducto Biliar Comum (Fernandes and Mies, 1998).

O processo de fibrose hepática é consequência essencial da doença hepática crônica. Atualmente, é conceituada como parte de um processo dinâmico de contínuo remodelamento da matriz extracelular que conduz a acúmulo excessivo de proteínas extracelulares, proteoglicanos e carboidratos (Gressner and Weiskirchen, 2006, Bataller and Brenner, 2005).

Nesse contexto, sabe-se do grande envolvimento das células estreladas hepáticas na fibrogênese e, nos dias de hoje, estas são consideradas importantes para os estudos dos mecanismos fisiopatológicos desse processo e surgimento de novas terapias (Moreira, 2007).

A fibrose é caracterizada histologicamente e bioquimicamente por significativa elevação no total do conteúdo de matriz extracelular (MEC) hepática (Bataller and Brenner, 2005). Os principais componentes da MEC normal são os colágenos (Tipos I e III) e a elastina, além de proteínas, carboidratos e glicoproteínas. Em situação de fibrogênese, tem-se aumento significativo de colágeno Tipo I, e essa deposição resulta de produção excessiva e de diminuição de processos de degradação. Em um fígado normal, as metaloproteinases (MMPs) têm papel bem descrito de degradantes da MEC, mas estas têm sua atividade reprimida nas lesões hepáticas crônicas como resultado da superexpressão de seu inibidores, os chamados inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) que são ativados pelas células estreladas (**Figura 3**) (Bataller and Brenner, 2005).

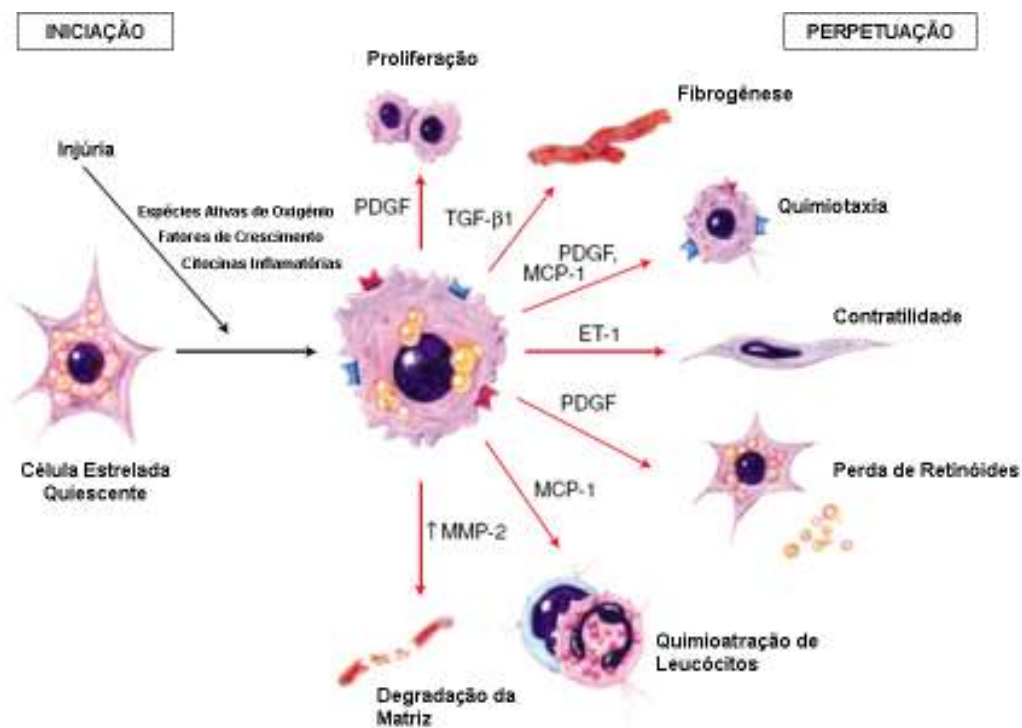
Além das células estreladas, no processo de fibrose estão envolvidos outros tipos celulares, como os hepatócitos, as células de Kupffer, as células plaquetárias epiteliais, as células sinusoidais, as células endoteliais e os neutrófilos. Cada um desses tipos celulares libera mediadores que exercem diversos efeitos sobre as células estreladas. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF $\beta$ ) são as duas citocinas que melhor caracterizam o envolvimento na ativação das células estreladas, tendo papel central nesse processo. Um grande número de estudos indica o PDGF como principal mediador de proliferação e o TGF $\beta$  como a citocina mais importante estimulando a fibrogênese pelas células estreladas (**Figura 3**) (Bataller and Brenner, 2005, Gressner and Weiskirchen, 2006, Yoshiji et al., 2006, Borkham-Kamphorst et al., 2004).

Vários mediadores têm sido demonstrados como promotores da ativação de células estreladas e fibrogênese, incluindo endotelina-1 (ET-1), angiotensina II e leptina (Cho et al., 2000, Bataller and Brenner, 2005, Saxena et al., 2004). Além disso, várias moléculas, como o

fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), TGF $\beta$ , TIMP-1, colágeno Tipo I e integrinas, mostraram ser fibrogênicas por provocar a inibição da apoptose das células estreladas, contribuindo para o aumento do número destas em locais de dano hepático (**Figura 3**) (Roulot et al., 1999).

As EAO produzidas pelas células de Kupffer e os hepatócitos danificados também têm um importante papel na ativação das células estreladas, 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 3**) (Guimaraes et al., 2006).

Além disso, marcadores mesenquimais, como a  $\alpha$ -SMA, vimentina e desmina, têm sido mostrados como importantes quantificadores da atividade das células estreladas no tecido hepático. Entretanto, a  $\alpha$ -SMA é o marcador mais comumente utilizado em estudos experimentais e clínicos, sendo aceito como um indicador da ativação destas células (Gawrieh et al., 2005, Russo et al., 2005).



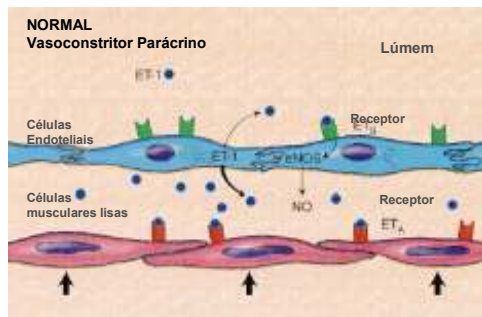
**Figura 3:** Célula estrelada em um processo dano hepático (Hui and Friedman, 2003).

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

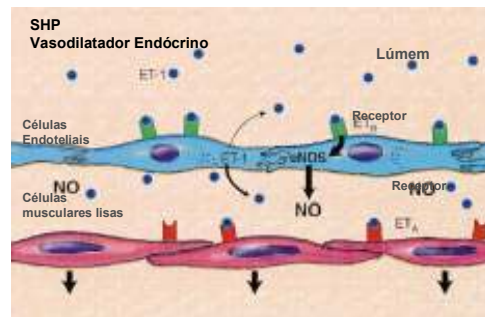
Fallon e colaboradores, em 1997, estabeleceram que a ligadura de ducto biliar comum reproduz em ratos as anormalidades fisiológicas pulmonares encontradas na SHP em humanos e, portanto, aqueles serviriam como modelo para o estudo dessa doença (Fallon et al., 1997).

Os estudos que envolvem esse modelo avaliaram uma série de alterações moleculares na microvasculatura pulmonar que influenciariam o tônus vascular e contribuiriam para a vasodilatação intrapulmonar durante a progressão dessa doença (Fallon, 2006, Fallon and Abrams, 2000, Fallon et al., 1997).

Entre essas mudanças tem-se dado grande importância ao papel da endotelina-1 (ET-1), que é produzida pelas células estreladas do fígado e que, em situações fisiológicas, atua de forma parácrina. Em situações de disfunção hepática, como na cirrose, a síntese dessa substância pelas células estreladas eleva-se significativamente, aumentando a sua concentração plasmática e passando a atuar de forma endócrina, atingindo a circulação pulmonar, sendo um mediador das alterações endoteliais e da progressão da vasodilatação intrapulmonar, pois o aumento da produção hepática e circulante de ET-1 está relacionado à produção de eNOS, devido a sua ligação com receptores ETB (**Figuras 4 e 5**), logo a eNOS possivelmente está ligada à gravidade das anormalidades nas trocas gasosas (Fallon and Abrams, 2000, Ling et al., 2004).



**Figuras 4.** Efeito da ET-1 na microvasculatura normal (Fallon and Abrams, 2000).



**Figuras 5.** Efeito da ET-1 na microvasculatura na SHP (Fallon and Abrams, 2000).

As endotelinas, descobertas em 1988, consistem em família de três subtipos, denominadas ET-1, ET-2 e ET-3, que atuam através da ligação com receptores acoplados à proteína G, chamados receptores de endotelina do tipo A (ETA) e receptores de endotelina do tipo B (ETB) (Sakurai and Masaki, 1991, Yanagisawa et al., 1988). São produzidas pelas células endoteliais e exercem efeitos autócrinos e efeitos parácrinos nas células musculares adjacentes (Rockey, 2003). Elas regulam o tônus vascular, mas também são importantes em múltiplos processos como no crescimento celular, no desenvolvimento neural e, particularmente, na doença hepática fibrogênica (Cho et al., 2000, Battistini et al., 1993, Kurihara et al., 1994, Rockey, 2003).

Os receptores ETA são encontrados predominantemente nas células musculares lisas da parede vascular, enquanto os receptores ETB (ETBr) são característicos das células endoteliais, mas têm ampla distribuição incluindo outros tipos celulares (Yanagisawa et al., 1988). Sugere-se que os receptores ETA, nas células musculares lisas, sejam mediadores de vasoconstrição, e os ETBr, nas células endoteliais, sejam mediadores de vasodilatação através do NO (Rockey, 2003).

A importância das endotelinas na doença hepática tem sido enfatizada por relatos dos níveis circulatórios elevados de ET-1 e ET-3 em pacientes com cirrose (Trevisani et al., 1997). No fígado normal, a endotelina-1 é produzida pelas células endoteliais sinusoidais. Entretanto, após a injúria, a endotelina é largamente derivada das células estreladas e a sua síntese pelas células endoteliais sinusoidais é reduzida (Shao et al., 1999). Dessa forma, na injúria hepática, ocorre aumento da produção de endotelina, que passa a atuar de forma endócrina e conseqüentemente leva a anormalidades do tônus vascular, entre outras respostas fisiológicas, podendo contribuir para a vasodilatação intrapulmonar e podendo ser um potencial mediador da SHP (Fallon and Abrams, 2000).

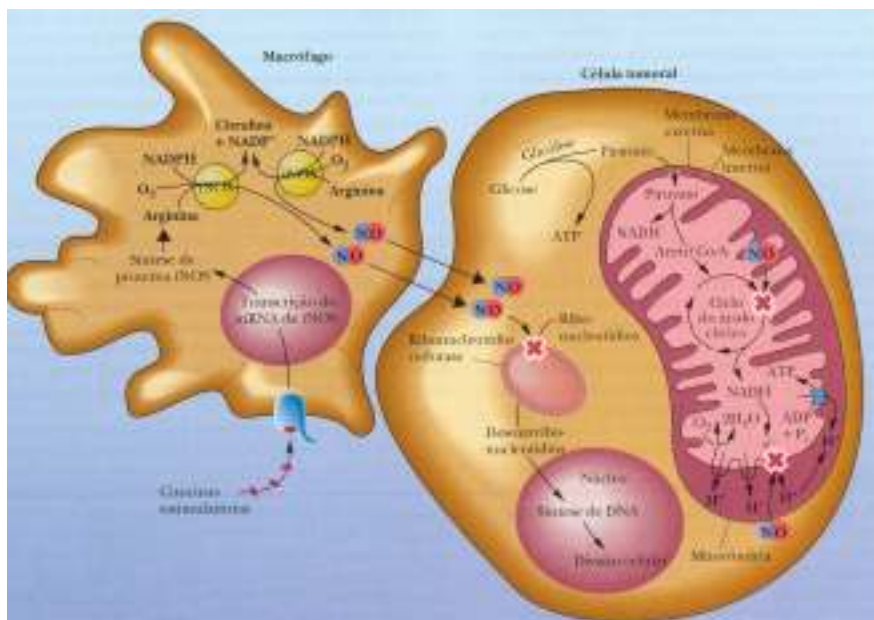
Além disso, alguns autores relacionam o aumento de NO com a translocação bacteriana, que ocorre em 45-75% dos animais cirróticos induzidos experimentalmente. Essa translocação bacteriana deve-se ao decréscimo da função fagocitária do fígado pela lesão, o que favorece a entrada de bactérias e endotoxinas na circulação pulmonar, gerando acúmulo e ativação de macrófagos intravasculares e estes, por sua vez, secretam produtos para o meio extracelular, incluindo citocinas e NO que, em altas quantidades, tornam-se uma fonte altamente tóxica e

oxidante além de o NO ser uma substância relaxante do endotélio, levando à vasodilatação (Thannickal and Fanburg, 2000, Rabiller et al., 2002).

As células fagocitárias geram ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), que é capaz de oxidar a membrana plasmática, produzindo grande quantidade de espécies ativas do oxigênio (EAO), e, quando combinado com NO, pode levar à formação de peroxinitritos, um potente e versátil oxidante que pode atacar tecidos biológicos, promovendo danos por estresse oxidativo (Thannickal and Fanburg, 2000). Destaque-se que, neste modelo, ocorre o processo de endotoxemia por translocação bacteriana, fator importante a ser levado em consideração.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula biologicamente importante, um radical livre, inorgânico, que participa de inúmeros processos fisiológicos e patológicos, geralmente como sinalizador ou como fator de relaxamento derivado do endotélio. Moléculas com elétrons desemparelhados, gerados a partir da resposta inflamatória como o  $O_2^{\bullet-}$ , podem reagir com o NO e formar as espécies ativas de nitrogênio (EAN), como o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Squadrito and Pryor, 1995). O  $ONOO^-$  pode reagir com os aminoácidos tirosina e cisteína e produzir a nitrotirosina e a nitrocisteína, considerados os promotores das reações entre as EAO e o NO.

Mesmo sendo uma molécula simples, a síntese enzimática do NO é bastante complexa. O óxido nítrico participa diretamente das reações que culminam com a desregulação de sua síntese (Gate et al., 1999). O NO é sintetizado a partir da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que transforma a L-arginina em L-hidroxiarginina, formando, assim, a citrulina e o NO (**Figura 6**).



**Figura 6.** Papel do óxido nítrico no sistema imune e transcrição da iNOS (Campbell, 2000).

As NOS são descritas como três isoformas, relacionadas a três genes diferentes, já sequenciados: óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (ambas constitutivas) e a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Gross and Wolin, 1995, Liaudet et al., 2000).

Quanto à ação de cada uma, sabe-se que a eNOS, encontrada no endotélio vascular, gera baixas concentrações de NO, favorece a diminuição da pressão sanguínea e auxilia na inibição da agregação plaquetária. Já a isoforma nNOS gera o NO que regula a transmissão neuronal e apresenta a função de neurotransmissor. A iNOS produz NO nos macrófagos, estimulada por certas citotoxinas. O NO está intimamente ligado aos processos de defesa do organismo e, em função da produção excessiva, relaciona-se aos processos destrutivos teciduais presentes na inflamação aguda ou crônica e na apoptose celular (Liaudet et al., 2000).

Além da alta produção de NO, derivado da iNOS e da eNOS, ocorre também aumento importante e progressivo nos níveis de HO-1 que também contribui para a progressão da SHP (Rabiller et al., 2002, Zhang et al., 2007). As heme-oxigenases são enzimas que catalisam a degradação do grupamento heme, produzindo monóxido de carbono, biliverdina e ferro, moléculas que têm atraído grande interesse devido aos seus papéis na modulação de importantes funções fisiológicas (Otterbein et al., 2003, Tamion et al., 2006). Logo, pelo papel fisiológico da degradação do grupamento heme, a HO-1, também conhecida como



proteína de choque térmico (HSP-32), pode influenciar em inúmeros processos celulares, incluindo crescimento, dano oxidativo, inflamação e apoptose (Tamion et al., 2006).

A biliverdina é posteriormente reduzida à bilirrubina pela ação da biliverdina redutase, enquanto o monóxido de carbono atua como um mensageiro gasoso semelhante ao NO, os quais podem mediar importantes funções celulares. Já o ferro pode estar fortemente envolvido com a geração de EAO (Tamion et al., 2006). Dessa forma, a HO-1 poderia estar fortemente envolvida na SHP, visto que ocorrem em conjunto alterações hepáticas de gases arteriais e do estado redox, o que nos levou a investigar a expressão dessa proteína nos dois tecidos que têm envolvimento central nessa doença, ou seja, nos tecidos hepático e pulmonar.

Todas essas alterações podem ser influenciadas pela ativação de vários fatores de transcrição como o NFκB. Os fatores de transcrição nuclear Kappa Beta (NFκB) são reguladores gênicos envolvidos na maioria das respostas inflamatórias. Essas respostas fazem parte das reações à infecção ou à lesão e ajudam a proteger as células desses estresses (Dias et al., 2005b).

O NFκB é um importante sinalizador da resposta inflamatória e, quando ativado, transloca para o núcleo, onde se liga à região promotora de genes alvos e estimula a expressão de genes de moléculas de adesão, resultando em subsequente ativação de mediadores inflamatórios, com regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias, tal como TNFα e indução dos genes de enzimas como iNOS, eNOS e HO-1 (Majano et al., 2001, Lavrovsky et al., 2000). Do mesmo modo, a ET-1, envolvendo os receptores ETB, aumenta a formação de complexos NFκB e sua ligação com o DNA (Gallois et al., 1998). O NFκB pode, portanto, representar um importante alvo para bloquear terapêuticamente a inflamação e a injúria do fígado (Tunon et al., 2003).

A ativação dos fatores de transcrição é significativamente intensificada quando as células são estimuladas em condições oxidativas. Existem evidências que sugerem que as EAO possam atuar como sinalizadores à NFκB. Isso está baseado na inativação dessa proteína quando utilizado algum tipo de antioxidante, logo este fator de transcrição mostra-se responsivo ao dano oxidativo (Dias et al., 2005a).

Tieppo e colaboradores, em 2005, demonstraram que animais cirróticos por ligadura de ducto biliar apresentavam hipoxemia e aumento da lipoperoxidação em homogeneizado de pulmão, provavelmente devido à ação oxidativa de radicais livres e do NO em altas concentrações na circulação pulmonar (Tieppo et al., 2005). Em estudos posteriores, mostraram, no mesmo modelo experimental, aumento dos níveis de nitratos totais em homogeneizado de tecido pulmonar, alterações da atividade enzimática antioxidante e evidências de vasodilatação nos testes anatomopatológicos nesse tecido, além do efetivo tratamento com os antioxidantes quercetina e N-acetilcisteína (Tieppo et al., 2009, Vercelino et al., 2008a, Vercelino et al., 2008b).

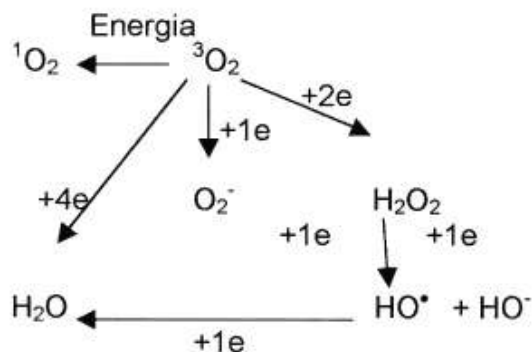
Devido a essas evidências, o dano oxidativo pode ter um papel fundamental na progressão dessa síndrome e diversos trabalhos mostram que alguns antioxidantes reduzem eficientemente a fibrose hepática em modelos animais de cirrose biliar secundária (Zhang et al., 2003, Vercelino et al., 2008a, Peres et al., 2000, Gaines and Fallon, 2004).

## **1.4 Estresse Oxidativo e Antioxidantes**

### **1.4.1 Radicais Livres e Espécies Ativas de Oxigênio**

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

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



**Figura 7.** Esquema da produção das EAO (Barp et al., 2002).

Os intermediários da redução parcial do oxigênio são o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), oxigênio *singlet* ( $^1\text{O}_2$ ) e radical hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ). Todos são denominados espécies ativas de oxigênio por serem capazes de existir de forma independente (Barp et al., 2002).

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

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existir independentemente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, sendo espécies paramagnéticas, com alto grau de reatividade química e curta vida média, capazes de atacar qualquer biomolécula (Halliwell, 1994, Halliwell, 1999). Tais radicais podem ser formados em situações fisiológicas ou patológicas e são danosos às células e ao organismo quando produzidos em grandes quantidades (Peres et al., 2000, Halliwell, 1994).

No organismo, os radicais livres encontram-se envolvidos nos processos de produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Dessa forma, encontram-se relacionados com várias doenças, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, doenças do

fígado, diabetes mellitus, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (Halliwell, 2006).

Os radicais livres podem ser formados durante o metabolismo normal de toda a célula, pela perda de elétrons de um não radical ou pelo ganho de um elétron por não radical. Eles podem também ser formados quando uma ligação covalente é quebrada, se cada um dos átomos ficar com um elétron, num processo conhecido como fissão homolítica (Halliwell, 1999).

Os RL reagem através de ligações covalentes ou reações bioquímicas em cadeia. Na primeira situação, uma união covalente ocorre quando dois radicais formam um par, combinando os seus elétrons desemparelhados. As reações bioquímicas em cadeia ocorrem quando reagem com outro não radical, e, ao final dessa reação, produzir-se-á outro radical. Além dessas duas vias, existem outras formas de obtenção de RL, através da fagocitose na resposta inflamatória, em situações de exposição do organismo a radiações ionizantes, nas contaminações, poluição, excesso de exercício e processos de doença (Peres et al., 2000, Kozlov et al., 1994).

A excessiva formação endógena de RL pode ser causada por: (1) ativação aumentada de fagócitos; (2) interrupção dos processos normais de transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial; (3) aumento da concentração de íons metálicos de transição por escape do grupamento heme de proteínas em locais de lesão ou doenças metabólicas; e (4) por níveis diminuídos das defesas antioxidantes. Entretanto, torna-se difícil determinar se na doença humana os radicais livres são a causa ou se potencializam o dano (Halliwell, 1999, Dröge, 2002). Por outro lado, as espécies ativas de oxigênio são reconhecidas como importantes sinalizadoras intracelulares e estão envolvidas na regulação redox no interior das células do sistema imune (Oktyabrsky and Smirnova, 2007, Halliwell, 2007). Sabe-se que células fagocitárias, como macrófagos e neutrófilos, são ativadas sob condições oxidativas. Essa ativação é mediada pelo sistema da NADPH oxidase que resulta em marcado incremento no consumo de oxigênio e consequente produção de ânion superóxido (Halliwell, 1999, Dröge, 2002).

As EAO formam-se durante a redução do oxigênio à água na cadeia de transporte de elétrons mitocondriais. O termo denominado radical livre é determinado quando uma espécie química, que pode ser um átomo como o hidrogênio ou um átomo de cloro, um metal de

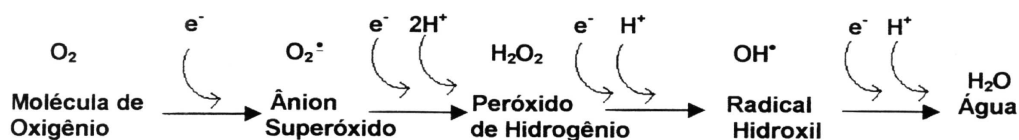
transição ou uma molécula, possui um elétron não pareado no seu último orbital (Boveris et al., 2006). O elétron não pareado neste orbital confere alta reatividade à molécula, a qual apresenta forte tendência a adquirir um segundo elétron para esse orbital. Essas espécies reativas têm o potencial de oxidar moléculas biológicas, incluindo proteínas, lipídios, glicídios e ácidos nucleicos. Quantidades aumentadas de metabólitos oxidados destas moléculas têm sido detectadas em pacientes com uma variedade de doenças. A estabilidade do RL é adquirida por remoção de elétrons de moléculas vizinhas, produzindo um par eletrônico (Maxwell, 1995).

As EAO, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), podem ser formadas durante o metabolismo normal de qualquer célula através da perda de elétrons de um não radical ou pelo ganho de um elétron por não radical e estão envolvidas numa série de processos degenerativos, devido à propriedade de serem ou gerarem RL (Halliwell, 1999).

Nas membranas mitocondriais encontram-se as proteínas transportadoras de elétrons, principalmente os citocromos que reduzem uma molécula de oxigênio ( $O_2$ ) à água ( $H_2O$ ) durante o processo de respiração. A redução completa de uma molécula de  $O_2$  à  $H_2O$  requer quatro sucessivas transferências de elétron, duas dessas denominadas de redução univalente. Dois desses intermediários são chamados de RL, são eles o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) (Maxwell, 1995). A maior parte do  $O_2$  (aproximadamente 95%) recebe os quatro elétrons de uma só vez, através do sistema oxidativo citocromo-oxidase, redução tetravalente. Porém, em cerca de 5% dos casos, a redução é monovalente, ou seja, a molécula de oxigênio recebe apenas um elétron de cada vez, proporcionando a formação de intermediários reativos e tóxicos, denominados espécies ativas de oxigênio (Orrenius et al., 2007).

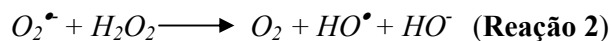
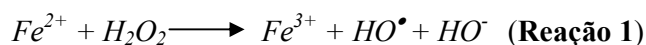
Nos organismos aeróbios, o  $O_2$  é reduzido à água no final da respiração mitocondrial (**Figura 8**). A molécula de  $O_2$  mantém-se unida ao complexo IV da cadeia respiratória até que ocorra a redução total do  $O_2$  em água. Durante esse processo, por receber apenas um elétron de cada vez, ocorre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

se ao fato do  $O_2$  se reduzir à água de forma monovalente, o que permite a geração de moléculas ou íons reativos durante o processo de redução do oxigênio (Thannickal and Fanburg, 2000).



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

O ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) é constituído pela redução do  $O_2$  molecular por um elétron, após aporte energético. Normalmente, é removido pela reação de dismutação, que consiste na reação de ânions superóxido catalisados pela enzima superóxido dismutase (SOD). O  $H_2O_2$ , é normalmente produto da dismutação do ânion superóxido pela enzima SOD. As enzimas oxidativas são capazes de formar e degradar o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e essas enzimas são encontradas nos peroxissomas. Dentre as mais comuns, encontram-se catalase (CAT), D-amino oxidase, urato oxidase, B-oxidase de ácidos graxos e glutathiona peroxidase (GPx). O  $H_2O_2$ , apesar de não ser um radical livre, pode reagir com outro ânion superóxido, ou com metais de transição, conforme as reações de Fenton (**Reação 1**) e Haber-Weiss (**Reação 2**), formando o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) (Halliwell, 1994).



O radical hidroxil é uma EAO instável, sendo um dos mais potentes oxidantes em sistemas biológicos devido à sua meia-vida muito curta. Esses radicais frequentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações. Esse RL possui a capacidade de atravessar as membranas e reagir com biomoléculas, como lipídios insaturados e DNA, apesar de seu baixo tempo de meia-vida (Halliwell, 1999).

O radical  $OH^{\bullet}$  é formado no organismo principalmente por dois mecanismos: reação de  $H_2O_2$  com metais de transição e homólise da água por exposição à radiação ionizante

(Halliwell and Gutteridge, 1992). O ferro reduzido ( $\text{Fe}^{2+}$ ) desenvolve uma importante rota na geração de radicais tóxicos, particularmente quando reage com peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Yokozawa et al., 1997). O radical hidroxil é formado quando o  $\text{H}_2\text{O}_2$  reage com o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), com catálise de íons divalentes de metais de transição como ferro e cobre, através da reação descrita por Haber-Weiss no ano de 1934 (Halliwell, 1999). É usualmente aceito que os efeitos tóxicos dos íons ferro são consequências da decomposição catalítica pelos íons  $\text{Fe}^{2+}$  do peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos para a forma ativa do radical hidroxil, conforme reação. Acredita-se que essas reações sejam o passo inicial de muitos processos de danos causados por radicais livres, como LPO, modificação oxidativa de proteínas e lipoproteínas, e aumento de anomalias em cromossomos (Kozlov et al., 1994).

Já a produção exagerada de espécies ativas de nitrogênio é chamada de estresse nitrosativo. Isso pode ocorrer quando a geração de espécies reativas de nitrogênio em um sistema excede a habilidade do sistema em neutralizá-las e eliminá-las (Valko et al., 2007).

O óxido nítrico é uma molécula com características de radical livre que nos últimos anos tem sido estudada como molécula sinalizadora que mantém a homeostase, como também pode ser um potente citotóxico em uma grande quantidade de enfermidades. Em condições normais, o NO é produzido em baixas concentrações e atua como citoprotetor, podendo interagir com os metais de transição e com outros radicais. Quando ocorre aumento das situações de estresse oxidativo, essa molécula também aumenta sua produção, gerando os efeitos indiretos que são citotóxicos, produzindo-se peroxinitrito, gerando estresse oxidativo e nitrosativo que têm grande importância nos processos inflamatórios (Halliwell, 2007, Salvemini et al., 2006).

O ânion superóxido pode reagir com óxido nítrico formando o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), uma espécie ativa de nitrogênio. A adição de  $\text{ONOO}^-$  às células, aos tecidos e aos fluidos corporais leva à rápida protonação, podendo resultar em depleção de grupos-SH e outros antioxidantes, oxidação e nitração de lipídeos, quebra de DNA, nitração e desaminação de bases de DNA (especialmente a guanina). A nitração em resíduos de tirosina é amplamente usada como um biomarcador da geração de  $\text{ONOO}^-$  *in vivo*. Nesse sentido, tem sido considerada como importante instrumento para estudo do estresse nitrosativo em doenças humanas, ainda que não seja um biomarcador específico para  $\text{ONOO}^-$  (Halliwell, 2007, Dröge, 2002, Salvemini et al., 2006).

Dentre os radicais de oxigênio e nitrogênio, o  $\text{ONOO}^-$  age depletando os grupamentos -SH e leva a alteração do balanço redox da glutatona no sentido do estresse oxidativo. Esse desequilíbrio no estado redox induz por regulação redox o inibidor kappa quinase (IKK) a fosforilar o inibidor kappa-B (IKB), possibilitando a translocação do  $\text{NF}\kappa\text{B}$  para dentro do núcleo, levando à transcrição de diversos mediadores inflamatórios (Bitencoutt, 2007).

Se, por um lado, altas concentrações de espécies ativas de oxigênio estão envolvidas na ativação do  $\text{NF}\kappa\text{B}$  com a manutenção do processo inflamatório atuando como agente causal de dano a macromoléculas; por outro, sugere-se que baixas concentrações de espécies ativas de oxigênio participem na regulação de diferentes funções nas células eucarióticas tais como proliferação, biossíntese de hormônios, quimiotaxia, explosão oxidativa, apoptose e outras (Oktyabrsky and Smirnova, 2007, Hwang and Kim, 2007).

Enfim, os danos celulares causados pelos radicais livres podem ser a peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, a inativação enzimática, a alteração do estado redox intracelular e o dano ao DNA (Halliwell, 2006).

A LPO é um processo natural de renovação das membranas celulares. Entretanto, o estresse oxidativo aumenta a LPO e provoca severo dano nas membranas celulares, promovendo aumento na fluidez da membrana e quebra das funções secretórias e dos gradientes iônicos. A reação de oxidação pode ser iniciada pelo radical hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ) ou pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Southorn and Powis, 1988b, Southorn and Powis, 1988a).

Ao iniciar a LPO, o radical livre remove um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado. Como o átomo de hidrogênio possui um elétron, resta um elétron desemparelhado no átomo de carbono. Na fase de propagação, acontecem duas outras reações: 1) o carbono radical do lipídio poli-insaturado tende a se estabilizar por rearranjo molecular, produzindo dienos conjugados, os quais, por sua vez, rapidamente reagem com o oxigênio formando um radical peroxil; 2) o radical peroxil formado capta um próton de outra molécula de lipídio formando um hidroperóxido. Esta última reação torna a se repetir inúmeras vezes num processo de reação em cadeia. Na etapa final, dois radicais peroxil reagem entre si, formando um tetróxido instável que se decompõe, dando origem ao oxigênio singlete e a carbonilas excitadas, os quais podem emitir luz e serem medidos em detectores de quimiluminescência.



Como mecanismo compensador do processo oxidativo, o organismo possui um sistema antioxidante, constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos, que atuam conjuntamente na proteção celular. O sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. Existem também as defesas secundárias que impedem a propagação da LPO e as terciárias, enzimas responsáveis pelo reparo de danos já instalados (Halliwell, 2006, Halliwell, 1999).

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

#### 1.4.2 Defesas Antioxidantes

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

As defesas antioxidantes compreendem agentes que cataliticamente removem RL e outras espécies ativas como as enzimas SOD, CAT e GPx; proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes, como íons ferro e cobre ou como transferinas e hepatoglobinas; proteínas que protegem biomoléculas contra dano por outros mecanismos, como proteínas de choque térmico; e substâncias de baixo peso molecular que combatem EAO e EAN como glutathione,  $\alpha$ -tocoferol, ácido úrico, bilirrubina e outros (Halliwell, 2007).

A atividade das defesas antioxidantes varia com o tipo celular, e possivelmente, em diferentes células do mesmo tecido (Halliwell, 1999). O sistema antioxidante é constituído

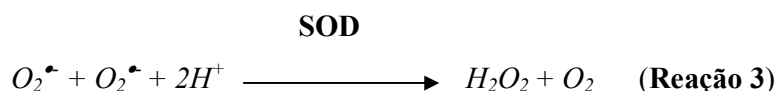
por componentes enzimáticos e não enzimáticos, que atuam conjuntamente na proteção celular. O sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. Existem também as defesas secundárias que impedem a propagação da LPO e as terciárias, enzimas de reparo de danos já instalados (Halliwell, 2006). Quando a substância age neutralizando as EAO na fase de iniciação ou propagação da LPO, levando à formação de um composto menos reativo, é chamada de *scavenger*. Ao passo que, se a substância antioxidante tiver a propriedade de absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os, é denominada de *quencher* (Sies, 1991).

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

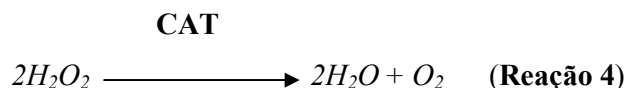
### 1.4.3 Defesas Antioxidantes Enzimáticas

O sistema enzimático encarregado da detoxificação das EAO é formado por várias enzimas, das quais 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.

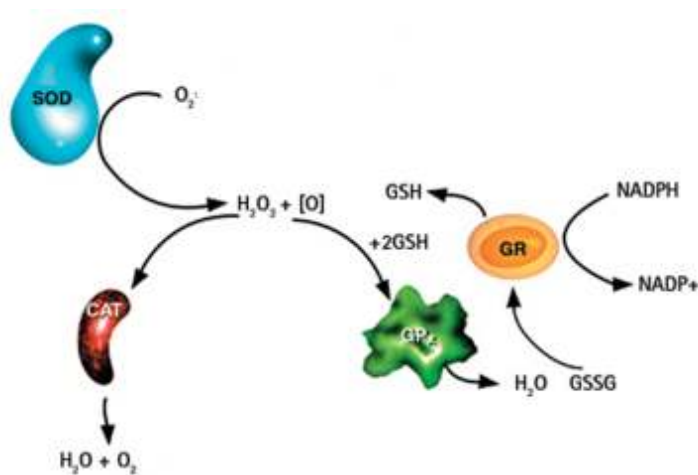
A SOD tem por principal função atuar na dismutação do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , sendo que o primeiro é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas (**Reação 3**). Essa enzima pode ser classificada em três grandes grupos, segundo o metal que se encontra presente no sítio ativo: a Cu-ZnSOD, localizada no citosol; a MnSOD, presente na matriz mitocondrial, e a FeSOD, existente somente nos procariontes e plantas (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, 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 4**.



Entre as peroxidases que geralmente usam o grupo heme, sobressai-se a atividade da GPx, 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 oxidada (GSSH) à reduzida, é necessário que a glutathiona redutase (GR) promova a regeneração da GSSH, consumindo NADPH, conforme demonstrado na **Figura 9** (Halliwell, 1999).



**Figura 9.** Esquema da interação entre as enzimas antioxidantes.

#### 1.4.4 Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas

Assim como as enzimas antioxidantes, que removem radicais livres ou EAO antes que esses causem dano à membrana, existem substâncias que atuam como antioxidantes, evitando

reações em cadeia como a LPO. Elas são conhecidas como defesas antioxidantes não enzimáticas, sendo as mais conhecidas a glutathiona, o ácido ascórbico (vitamina C), o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -carotenos e flavonóides (Peres et al., 2000, Pavanato et al., 2003, Moreira et al., 2004, Tieppo et al., 2005).

Essas substâncias, quando atuam, podem evitar a formação de RL ou EAO, suprimir uma cadeia de peroxidação na fase de propagação e reparar ou reconstruir a membrana. A glutathiona é um tripeptídeo de ácido  $\alpha$ -glutâmico, cisteína e glicina que, além de ser um importante antioxidante não enzimático, participa de reações de enzimas antioxidantes como a glutathiona peroxidase e a glutathiona transferase, logo, uma alta concentração de GSH intracelular protege a célula contra a ação de EAO, reagindo por via não enzimática com essas espécies. A sua ação deve-se à presença de um grupamento sulfidril, 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 vem 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).

Os flavonoides são encontrados nas folhas e partes externas das plantas. Para proteger os tecidos da ação oxidativa, é descrito por vários autores que fitoterápicos, entre eles os flavonoides, possuam atividade antioxidante. Alguns, como a rutina e a quercetina, estão sendo estudados e estão apresentando bons resultados como antioxidantes (van Acker et al.,

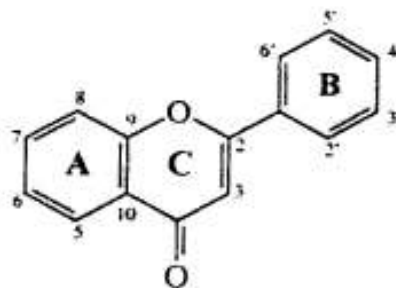
1996, Maris et al., 2001, Peres et al., 2000, Tieppo et al., 2005, Moreira et al., 2004, Pavanato et al., 2003).

Muitos trabalhos têm mostrado a redução da fibrose em situações de cirrose biliar e hepática através da administração de flavonoides (Peres et al., 2000, Pavanato et al., 2003), assim como da redução da hipertensão portal, uma das complicações da cirrose (Moreira et al., 2004).

### 1.4.5 Flavonoides

Vários antioxidantes e flavonoides têm sido referidos recentemente como eficazes para diminuir a fibrose em modelos animais de cirrose biliar secundária, de cirrose por álcool ou por administração de tetracloreto de carbono (Vercelino et al., 2008a, Pavanato et al., 2003, Pastor et al., 1997, Peres et al., 2000).

Flavonoides é o nome genérico de um grupo de moléculas formadas pelo metabolismo secundário dos vegetais, que se originam mediante uma via biossintética mista (Rice-Evans and Miller, 1996). São compostos que contêm grupos hidroxila fenólicos que lhes conferem uma ação antioxidante com importante potencial terapêutico (**Figura 10**) e são encontrados na maçã, laranja, pera, uva, melão, cereja, brócoli, batata, cebola, tomate, feijão, assim como na cerveja, no chá, no vinho tinto e nos sucos de limão e laranja, os quais fazem parte da dieta humana de forma habitual (Plumb et al., 1999).



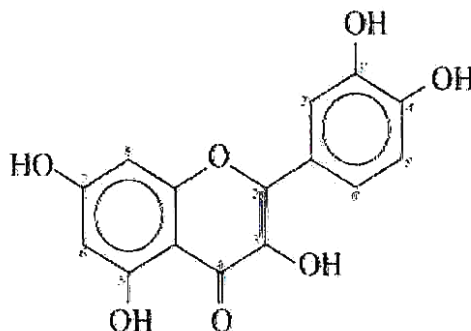
**Figura 10.** Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração (Rice-Evans and Miller, 1996).

Estima-se que diariamente a dieta ocidental contenha, em média, 25 mg de flavonoides, dentre os quais a quercetina é o principal componente, sendo consumida em torno de 16

mg/dia, uma quantidade que pode ser farmacologicamente significativa para os fluidos e tecidos corporais (Duthie et al., 1997).

#### 1.4.6 Quercetina

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



**Figura 11.** Estrutura química da quercetina (Formica and Regelson, 1995).

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

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

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

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).

Pavanato e colaboradores, em 2003, verificaram que o tratamento de três semanas na dose de 50mg/Kg/dia na cirrose induzida por tetracloreto de carbono intraperitonealmente protegeu o fígado, reduziu o conteúdo de colágeno e diminuiu a expressão da iNOS e a peroxidação lipídica (Pavanato et al., 2003).

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

A quercetina também tem sido relatada em estudos de apoptose, nos quais foi mostrado que inibiu a apoptose induzida pelo peróxido de hidrogênio das células mesangiais, fibroblastos e células epiteliais. Em estudos prévios, nós demonstramos que a quercetina aumenta a estabilidade genômica em ratos do grupo com SHP (Tieppo et al., 2007, Maris et al., 2001).

Muitos efeitos dos flavonoides têm sido constatados sobre funções celulares, incluindo efeito mutagênico, antimutagênico, antiviral e citotóxico, além de antioxidante (Formica and Regelson, 1995, Robak and Gryglewski, 1996, Erden Inal et al., 2001, da Silva et al., 2002).

## 1.5 Avaliação de Atividade Genotóxica

Os testes de genotoxicidade detectam efeitos de substâncias tóxicas para o genoma. Os mais utilizados são aqueles que detectam mutações em células germinativas ou somáticas, por exemplo mutação gênica, associada a alterações na sequência de nucleotídeos do DNA, ou em nível cromossômico, como aberrações e micronúcleos (Waters et al., 1999, MacGregor et al., 1987, Dearfield et al., 2002, MacGregor et al., 2000). Uma vez lesado seu DNA, as células respondem utilizando diferentes estratégias de ação tais como morte por citotoxicidade ou apoptose, modulação da expressão gênica controlando o ciclo celular, e reparação do material genético por via livre ou sujeita a erro, sendo a segunda responsável pela fixação das mutações. Normalmente é a combinação desses fatores que compõe a resposta a danos genéticos (Moustacchi, 2000).

Os métodos que são amplamente empregados para a detecção de mutações gênicas são aqueles que utilizam as bactérias (*Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*) (Waters et al., 1999, MacGregor et al., 1987, Dearfield et al., 2002, MacGregor et al., 2000). Esses são relativamente simples e reprodutíveis.

Para a detecção de mutações cromossômicas, os testes mais utilizados incluem as aberrações cromossômicas e micronúcleos, sendo que tais testes exigem que a célula esteja em seu estado proliferativo (MacGregor et al., 2000, Tice et al., 1998). Esses testes têm validação internacional e podem ser desenvolvidos tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Já para detectar quebras no DNA, tem sido recomendado o teste alcalino eletroforético de célula única ou ensaio cometa (EC) sendo este realizado em células individuais não necessariamente em proliferação (Fairbairn et al., 1995, Singh, 2000).



## 1.6 Avaliação de Atividade Antigenotóxica

Alterações metodológicas dos testes de genotoxicidade podem ser empregadas para identificar compostos que estariam envolvidos na proteção do DNA, através de uma atividade antigenotóxica (Lohman et al., 2001, Weisburger, 2001). Essa é uma das atividades mais importantes para a determinação de agentes quimiopreventivos, naturais ou sintéticos, envolvidos na modulação ou inibição de processos patológicos resultantes da exposição a genotoxinas e agentes carcinogênicos presentes no ambiente (De Flora and Ramel, 1988, De Flora, 1988, Heo et al., 2001, Ames, 2001).

Agentes inibidores de mutagênese ou antimutagênicos têm sido avaliados pelo uso de ensaios rápidos, particularmente o teste *Salmonella*/microsoma, que auxilia na elucidação do mecanismo antimutagênico (Minnunni et al., 1992, Edenharder et al., 1999, Karekar et al., 2000). A maioria dos testes de mutagenicidade em *S. typhimurium* e *E. coli* detecta agentes que induzem mutações reversas como resultado da formação de adutos ou por intercalação entre pares de bases do DNA (Waters et al., 1999, Rosenkranz, 2002, Dearfield et al., 2002).

Estudos mais recentes têm revelado que muitas mutações são induzidas como consequência de danos oxidativos ao DNA (Laval et al., 1998, Rosenkranz, 2002). Por isso há um grande interesse na busca de novos agentes que possam proteger o genoma por mecanismos antioxidantes (Ferguson, 2001, Shukla et al., 2002).

Os testes *Salmonella*/microsoma e Mutoxiteste-WP2 podem detectar agentes que geram EAO, como terc-butil-hidroperóxido (*t*-BOOH) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Os agentes antioxidantes têm sido considerados antimutagênicos, devido à proteção que conferem ao DNA contra danos oxidativos (Minnunni et al., 1992, Edenharder et al., 1999, Karekar et al., 2000, Chaudiere and Ferrari-Iliou, 1999, Kaur and Saini, 2000).

## 1.7 A levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucarioto amplamente estudado, tornando-se ferramenta importante nas pesquisas sobre mutagênese, reparo do DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo (Maris et al., 2000, Maris et al., 2001, Boeira et al., 2002, Pungartnik et al., 2002).

Como todos os aeróbios, *Saccharomyces cerevisiae* apresenta uma variedade de mecanismos de defesa contra danos oxidativos via atividades enzimáticas, presença de antioxidantes, sequestradores de metais e diversos mecanismos de reparação (Maris et al., 2001, Brozmanova et al., 2001).

Linhagens isogênicas deficientes em defesas antioxidantes têm sido utilizadas para o estudo do mecanismo de ação de agentes físicos e químicos que interferem com o estado redox celular (Brennan and Schiestl, 1998). Um método utilizado consiste em comparar a sensibilidade ao tratamento com um agente físico (por ex. radiação) ou químico (por ex. pró-/antioxidante), de diversas mutantes deficientes em enzimas antioxidantes, ou em um fator de transcrição sensível ao estado redox a fim de avaliar a importância de cada defesa antioxidante celular na detoxificação do agente testado. Também é possível combinar um oxidante, conhecido como  $H_2O_2$  e *t*-BOOH, com uma substância antioxidante ou com mecanismo desconhecido, e avaliar o efeito do tratamento da substância na modulação do estresse oxidativo. O aumento da viabilidade celular ao tratamento estará sugerindo atividade protetora (antioxidante) e diminuição da viabilidade a um efeito deletério (pró-oxidante) (Brendel and Henriques, 2001, Picada et al., 2003b).

Devido às evidências demonstradas neste referencial teórico, denotamos necessidade de estudos mais avançados sobre o tema. Tais estudos, envolvendo os aspectos moleculares dos efeitos do flavonoide quercetina nos tecidos hepático e pulmonar na SHP, teriam a finalidade de explicar de forma mais aprofundada e detalhada como a quercetina poderia atenuar as alterações pulmonares presentes na Síndrome Hepatopulmonar, caracterizando-a como um agente terapêutico promissor nesta doença.

## **2 OBJETIVOS DO ESTUDO**

## **2 OBJETIVOS DO ESTUDO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Este trabalho tem por objetivo geral verificar os efeitos do flavonoide quercetina como agente genotóxico/antigenotóxico em estudos *in vitro* e avaliar os efeitos da quercetina nos tecidos hepático e pulmonar, em estudos *in vivo*, utilizando o modelo experimental de ligadura de ducto biliar comum como modelo de Síndrome Hepatopulmonar.

### **2.2 Objetivos Específicos**

#### **2.2.1 Experimento I**

- 1) Avaliar os danos ao DNA no modelo de cirrose biliar secundária e a ação da quercetina como agente genotóxico/antigenotóxico, utilizando o teste de micronúcleos em medula óssea e o ensaio cometa em tecidos sanguíneo, pulmonar e hepático.
- 2) Identificar os efeitos celulares da quercetina como pró-/antioxidante ou como agente mutagênico/antimutagênico, através de testes de sobrevivência de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes em enzimas superóxido dismutase e por meio de testes de mutagenicidade com linhagens de *Salmonella typhimurium* (testes de Ames) e de *Escherichia coli* (Mutoxiteste WP2), que detectam mutagênese oxidativa.

### 2.2.2 Experimento II

- 1) Identificar as alterações de integridade do fígado de ratos com cirrose biliar secundária, submetidos à administração de quercetina, através da análise das enzimas séricas aminotransferases aspartato (AST) e alanina (ALT), da fosfatase alcalina (FA), das bilirrubinas total e direta, bem como identificar alterações no peso do fígado, do baço e do pulmão desses animais em relação ao seu peso corporal total.
- 2) Verificar alterações na pressão portal.
- 3) Verificar alterações na difusão de gases através de Gasometria Arterial, avaliando a PaO<sub>2</sub> e a diferença alvéolo-arterial de O<sub>2</sub>.
- 4) Analisar os efeitos do flavonoide quercetina sobre os tecidos hepático e pulmonar através de histologia.
- 5) Avaliar a imunorreatividade da  $\alpha$ -SMA em tecido hepático.
- 6) Avaliar, em tecido pulmonar, os efeitos produzidos pela quercetina na oxidação de lipídios, bem como quantificar a atividade enzimática antioxidante em tecido pulmonar.
- 7) Avaliar os metabólitos do Óxido Nítrico (nitritos e nitratos) em tecido pulmonar nos diferentes grupos.
- 8) Avaliar os níveis de RNAm de ETBr, eNOS, iNOS e HO-1 em tecido pulmonar dos diferentes grupos estudados.
- 9) Avaliar os níveis de RNAm de colágeno tipo I, pró-colágeno tipo IV, TGF $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA, ET-1 e HO-1 em tecido hepático dos diferentes grupos estudados.
- 10) Verificar a expressão proteica do marcador de macrófagos ED-1 em tecido pulmonar dos animais.

- 11)** Verificar a ativação do NF $\kappa$ B no extrato nuclear de tecido pulmonar nos diferentes grupos estudados.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Experimento I**

##### **3.1.1 Delineamento da Pesquisa**

Este estudo tem caráter experimental qualitativo e quantitativo. Para isso, foi desenvolvido o modelo experimental de cirrose biliar secundária por ligadura de ducto biliar comum em ratos e a avaliação do potencial antioxidante e genotóxico/antigenotóxico da quercetina neste modelo e em linhagens de levedura e bactérias.

##### **3.1.2 Flavonoide Quercetina**

O flavonoide quercetina ( $C_{15}H_{10}O_7$ ) (CAS Número de Registro [117-39-5]), utilizado no estudo, foi proveniente da Sigma Chemical Co., St. Louis, USA.

##### **3.1.3 Delineamento Experimental**

###### ***3.1.3.1 Animais***

Foram utilizados ratos machos Wistar, com peso entre 200 e 300 gramas, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Os animais foram mantidos durante o experimento na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do



Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em caixas plásticas individuais, de 47x34x18 cm, forradas com maravalha, em ciclo de doze horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas) e temperatura de  $22 \pm 2$  °C. A água e a ração foram administradas livremente, sendo tratados diariamente com água e ração Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil).

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

Todos os procedimentos realizados seguiram em consonância com as normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, contidas na Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais, de autoria do grupo de pesquisa e de Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) bem como o preconizado no *Principles for Research Involving Animals* (NAS) (Goldin and Raymundo, 1997).

### 3.1.3.2 Modelo experimental

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

**Grupo I: Controle + Veículo (CO + V)** - Grupo submetido à simulação da cirurgia, sem BDL e administração de Veículo (NaCl 0,9%);

**Grupo II: Controle + Quercetina (CO + Q)** - Grupo submetido à simulação da cirurgia, sem BDL e tratamento com quercetina;

**Grupo III: Cirrose Biliar Secundária + Veículo (BDL + V)** - Grupo submetido à cirurgia de BDL e à administração de Veículo (NaCl 0,9%);

**Grupo IV: Cirrose Biliar Secundária + Quercetina (BDL + Q)** - Grupo submetido à cirurgia de BDL e a tratamento com quercetina.

O processo iniciou com a anestesia do animal, mediante a administração de fármacos anestésicos, e posicionamento para cirurgia. Foi utilizada uma mistura de Cloridrato de

Xilazina 2% 50mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Cetamina 100mg/Kg de peso corporal intraperitonealmente. A intervenção cirúrgica iniciou com a realização de tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida de laparotomia ventral média e, posteriormente, dissecação do ducto biliar comum na altura da desembocadura dos ductos pancreáticos, ligando-se por meio de dois nós para posterior secção entre eles. A cavidade abdominal foi fechada com pontos individuais em “U” no plano cutâneo, e o peritônio e a camada muscular abdominal foram fechados com pontos contínuos. Os animais recuperaram-se da anestesia em caixas individuais forradas com maravalha, em incubadora para recém-nascidos (FANEM - SP), antes de serem devolvidos às condições padrão da Unidade de Experimentação.

Os animais dos grupos I e II não foram submetidos à BDL, sendo realizada somente a manipulação do ducto mediante o estresse cirúrgico. O tratamento com a quercetina iniciou a partir do 14º dia do procedimento cirúrgico, diariamente, por via intraperitoneal, na dose de 50 miligramas de quercetina por quilograma de peso do animal. Os animais controle receberam o veículo (solução fisiológica – NaCl 0,9%) no volume de 1 mL por quilograma de peso corporal, na mesma via de administração.

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

Primeiramente foi coletado sangue pela técnica da punção de plexo veno retro-orbital com tubo capilar de vidro e este material foi utilizado para análise de ensaio cometa no tecido sanguíneo (Halpern and Pacaud, 1951).

Posteriormente, realizou-se tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida da intervenção cirúrgica, que iniciou com laparotomia ventral média seguida da coleta de pequeno fragmento do fígado e do pulmão esquerdo, os quais foram imediatamente imersos em *eppendorfs* no gelo com solução tampão, abrigados de incidência de luz direta, para posteriores análises de ensaio cometa para avaliação do dano ao DNA.

Por fim, foi coletado o osso fêmur da pata direita dos animais para posteriores análises de micronúcleos. Após esse procedimento, os animais sofreram eutanásia por exanguinação sob anestesia profunda (American Veterinary Medical Association, 2007a, 2007b).

### 3.1.4 Análise de Micronúcleos

Após o sacrifício do animal, uma amostra de medula óssea foi coletada de um dos fêmures, o qual foi limpo. A extremidade final e a proximal do osso foi cortada para expor o canal da medula e uma agulha histológica foi inserida firmemente na abertura do fêmur, para possibilitar que a medula fosse extraída e misturada a uma gota de soro fetal bovino, previamente colocada sobre uma das extremidades de uma lâmina de microscopia codificada.

A amostra de medula óssea foi homogeneizada no soro, obtendo-se a suspensão de células. Foi realizado esfregaço da suspensão celular sobre a lâmina com auxílio de uma outra lâmina inclinada. Foram preparadas duas lâminas por animal. Após secagem da preparação, as lâminas foram tratadas com metanol, à temperatura ambiente, para fixação do material biológico. Posteriormente, foi realizada a coloração utilizando corante de Giemsa em tampão fosfato 0.2M, pH 5.8 (proporção de 1:9). Após sete minutos nesta solução de coloração, as lâminas foram enxaguadas em água destilada, secadas e guardadas em caixas de lâminas até a análise. Para contagem dos eritrócitos normocromáticos (ENC), eritrócitos policromáticos (EPC) e micronúcleos no EPC, foi utilizado microscópio ótico com objetiva de imersão. Pelo menos 2000 EPC foram analisados por animal. A relação EPC/ENC também foi determinada pela avaliação da frequência de EPC em 1000 eritrócitos de cada animal (MacGregor et al., 1987, Mavournin et al., 1990, Picada et al., 2003a).

### 3.1.5 Ensaio Cometa

Foi utilizada a versão alcalina do ensaio cometa, utilizando sangue total, fígado e pulmão dos animais tratados e controles. Um pedaço de cada tecido foi colocado em *ependorf* contendo solução tamponada (PBS) pH 7.4 gelada e fragmentado com auxílio de uma pinça para obtenção de suspensão celular. O sangue foi coletado em *ependorfs* heparinizados. As amostras de tecido em suspensão e o sangue foram misturados com uma fina camada de agarose *low melting* 0,75% e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a

1,5%; essas lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% DMSO na hora do uso), por, no mínimo, uma hora até, no máximo, 72 horas a 4°C, para o rompimento das membranas celulares. A lise celular permitiu migração dos fragmentos de DNA que foi realizada após a incubação das lâminas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13) e subsequente aplicação de uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) às células lisadas sobre as lâminas para microscopia em uma cuba de eletroforese de DNA. As lâminas foram neutralizadas logo após a eletroforese com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5 e coradas com solução de coloração com prata. Os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD). O ID foi obtido pela avaliação visual das classes de dano (de 0 – 4), extraíndo-se um índice que expressa o dano geral sofrido por uma população de células; os núcleos intactos aparecem redondos (classe 0 – sem dano), já nas células lesadas, o DNA livre migra do núcleo em direção ao ânodo, durante a eletroforese, mostrando uma “cauda” de fragmentos sedimentados, semelhante à de cometa. Foram classificados entre classes 1 (dano mínimo) a 4 (dano máximo). A FD foi calculada baseada no número de células com cauda versus aquelas sem cauda (Picada et al., 2003a, Speit and Hartmann, 1999, Tice et al., 2000).

### 3.1.6 Ensaios em bactérias e leveduras

#### 3.1.6.1 Linhagens

*Salmonella typhimurium* TA102, descrita por Maron e Ames em 1983 (Maron and Ames, 1983), e *Escherichia coli* IC203 (WP2 *uvrA oxyR*/pKM101) e sua derivada *oxyR* IC188 (WP2 *uvrA*/pKM101), descritas por Martinez e colaboradores (Martinez et al., 2000), foram gentilmente fornecidos por B.M. Ames (University of California, Berkeley, USA) e M. Blanco (Instituto de Investigaciones Citológicas, Valencia, Espanha), respectivamente. A levedura selvagem *S. cerevisiae* EG103 (*MATa leu2-3 112 his3Δ1 trp1-289 ura3-52 GAL<sup>+</sup>*) e as linhagens isogênicas deficientes de superóxido dismutase citoplasmática CuZnSOD EG118 ( $\Delta sod1$ ) ou mitocondrial MnSOD, EG110 ( $\Delta sod2$ ) e a linhagem deficiente de ambas SOD, EG133 ( $\Delta sod1\Delta sod2$ ), previamente descritos por Longo e colaboradores (1996) (Longo et al., 1996), foram gentilmente fornecidas por E.B. Gralla (Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, LA).

### 3.1.7 Ensaio de mutagenicidade e antimutagenicidade em bactérias

Ensaio de mutagenicidade foram realizados de acordo com Mortelmans e Zeiger, com modificação no procedimento de pré-incubação descrito por Picada e colaboradores em 2003 (Picada et al., 2003a, Mortelmans and Zeiger, 2000). A quercetina foi dissolvida em dimetil sulfóxido:água destilada (1:1) imediatamente antes da utilização. Cem microlitros de cultura bacteriana ( $1-2 \times 10^9$  cells/mL) foram incubados no escuro, à temperatura de 37°C, com diferentes concentrações de quercetina (10, 50, 100, 250 e 500 µg/placa) sem agitação. Posteriormente, 2 mL de gelose (0.6% agar, 0.5% NaCl, suplementado com histidina 50 µM para linhagem *S. typhimurium* TA102 ou triptofano 0,05 mM para linhagens de *E. coli* IC188 e IC203), à temperatura de 45°C, foram adicionados ao tubo teste e semeados imediatamente em uma placa com meio ágar mínimo (1,5% ágar, meio de Vogel-Bonner E, contendo 2% glicose para a linhagem TA102 ou 0,4% para linhagens de *E. coli*). Terc-butil-hidroperóxido (*t*-BOOH, 25 µg/placa) foi utilizado como controle positivo. As placas foram incubadas no escuro, à temperatura de 37°C, durante as 48 horas anteriores à contagem das colônias revertentes.

Para avaliar a antimutagenicidade da quercetina, obedeceu-se ao seguinte procedimento: a quercetina foi incubada com a cultura a 37°C sem agitação. O agente mutagênico oxidativo *t*-BOOH (25 µg/placa) ou peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (100 µg/placa) foi acrescentado, e a mistura foi novamente incubada a 37°C, seguida de semeadura sobre os meios adequados. As placas foram incubadas no escuro, à temperatura de 37°C, durante as 48 horas anteriores à contagem das colônias revertentes.

### 3.1.8 Ensaio de sensibilidade em linhagens de *S. cerevisiae*

Efeitos protetores ou deletérios da quercetina contra dano induzido por hidroperóxidos em levedura *S. cerevisiae* foram avaliados de acordo com o descrito por Picada e colaboradores em 2003 (Picada et al., 2003a). Células em fase estacionária jovem, cultivadas em meio YPD, foram reinoculadas em uma densidade apropriada, em YPD fresco, em condições de supressão de glicose e cresceram durante quatro horas a 30°C até uma densidade de  $1-2 \times 10^7$  cels/mL. Para avaliar a sensibilidade à quercetina, as culturas foram expostas a concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL e incubadas sob condições de crescimento durante quatro horas. A fim

de avaliar um possível efeito antioxidante ou pró-oxidante, as células foram pré-tratadas e então submetidas a concentrações letais de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.25 mM) ou *t*-BOOH (2 mM) e incubadas durante uma hora. As células foram devidamente diluídas e semeadas em triplicata em meio sólido YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose e 2% agar). Após três dias, as unidades formadoras de colônias foram contadas. Todos os ensaios biológicos foram repetidos pelo menos duas vezes, e a semeadura foi realizada em triplicata para cada dose.

### 3.1.9 Análise Estatística

A significância estatística foi determinada por análise de Variância de uma via (ANOVA). Em todas as comparações,  $P < 0,05$  foi considerado como indicativo de significância estatística.

Os dados de mutagenicidade dos ensaios em linhagens bacterianas foram analisados com *Salmonel software* (Myers et al., 1991). Um composto foi considerado positivo para mutagenicidade quando seguiu os seguintes critérios: (a) o número de revertentes da amostra foi pelo menos o dobro do número espontâneo ( $IM \geq 2$ ;  $IM = \text{índice mutagênico: número de colônias induzidas na amostra/ número de colônias do controle negativo}$ ); (b) foi encontrada resposta significativa na análise de variância ( $P \leq 0,05$ ); e (c) foi apresentada uma dose-resposta positiva ( $P \leq 0,01$ ), avaliada pelo *Salmonel software* (Myers et al., 1991).

A porcentagem de inibição da mutagenicidade foi calculada de acordo com Picada e colaboradores em 2003 (Picada et al., 2003a), como descrito abaixo: porcentagem de inibição ( $I\%$ ) =  $[I - (B - NC/A - NC)] \times 100$ , onde *A* representa o número de revertentes na placa contendo somente agente mutagênico, *B* representa o número de revertentes na placa contendo agente mutagênico e antimutagênico, e NC representa o número de revertentes espontâneos do controle negativo. O efeito antimutagênico foi considerado positivo quando uma dose causava pelo menos 50% de redução da mutagenicidade ( $I\% \geq 50$ ).

## 3.2 Experimento II

### 3.2.1 Delineamento da Pesquisa

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

### 3.2.2 Flavonoide Quercetina

O flavonoide quercetina ( $C_{15}H_{10}O_7$ ) (CAS Número de Registro [117-39-5]) utilizado no estudo proveio da Sigma Chemical Co., St. Louis, USA.

### 3.2.3 Delineamento experimental

#### 3.2.3.1 Animais e Tratamento

Foram utilizados ratos machos Wistar, com peso entre 200 e 300 gramas, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Os animais foram mantidos durante o experimento na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em caixas plásticas individuais, de 47x34x18cm, forradas com maravalha, em ciclo de doze horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas) e temperatura de  $22 \pm 2$  °C. A água e a ração foram administradas livremente, sendo tratados diariamente com água e ração Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil).

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

Todos os procedimentos realizados seguiram em consonância com as normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, contidas na Pesquisa em Saúde e Direito dos

Animais, de autoria do grupo de pesquisa e de Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), bem como o preconizado no Principles for Research Involving Animals (NAS) (Goldim and Raymundo, 1997).

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

**Sham** - Grupo submetido à simulação da cirurgia, sem a CBDL e à administração de Veículo (NaCl 0,9%);

**Sham - Quercetina (Sham-Q)** - Grupo submetido à simulação da cirurgia, sem a CBDL e à tratamento com quercetina;

**Ligadura de ducto biliar comum (CBDL)** - Grupo submetido à cirurgia de CBDL e à administração de Veículo (NaCl 0,9%);

**Ligadura de ducto biliar comum - Quercetina (CBDL-Q)** - Grupo submetido à cirurgia de CBDL e à tratamento com quercetina.

O processo iniciou com a anestesia do animal, mediante a administração de fármacos anestésicos, e posicionamento para cirurgia (**Figuras 12A**). Foi utilizada uma mistura de Cloridrato de Xilazina 2% 50mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Cetamina 100mg/Kg de peso corporal intraperitonealmente. A intervenção cirúrgica iniciou com a realização de tricotomia, desinfecção da região abdominal, seguida de laparotomia ventral média, e posteriormente, dissecação do ducto biliar comum na altura da desembocadura dos ductos pancreáticos, ligando-se por meio de dois nós para posterior secção entre eles (**Figuras 12B**). A cavidade abdominal foi fechada com pontos individuais em “U” no plano cutâneo, e o peritônio e a camada muscular abdominal foram fechados com pontos contínuos (**Figura 12C**). Os animais recuperaram-se da anestesia em caixas individuais forradas com maravalha, em incubadora para recém-nascidos (FANEM - SP), antes de serem devolvidos às condições padrão da Unidade de Experimentação.





**Figura 12.** (A) Posicionamento do animal para cirurgia; (B) Laparotomia e CBDL; (C) Sutura em planos.

Os animais dos grupos **Sham** e **Sham-Q** não foram submetidos á CBDL, sendo realizada somente a manipulação do ducto mediante o estresse cirúrgico.

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

Transcorridos 28 dias do desenvolvimento do modelo e quatorze dias de administração de quercetina ou veículo, conforme o grupo, os animais foram novamente pesados e anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilasina (10 mg/kg), intraperitonealmente, para morte dos animais, a qual se deu por meio de eutanásia por exanguinação, sob anestesia profunda (American Veterinary Medical Association, 2007a, , 2007b) e coleta de material biológico.

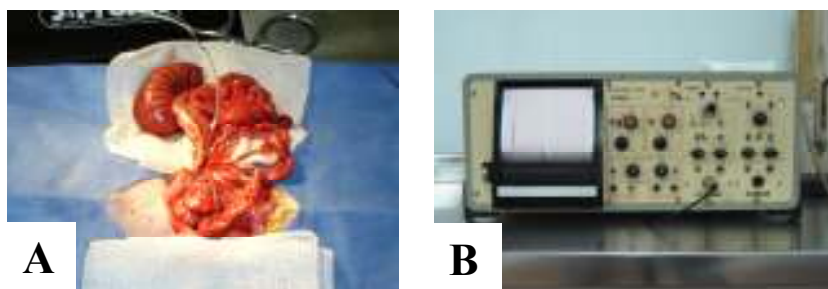
### *3.2.3.2 Testes hepáticos, mensuração venosa portal e mensuração de gases arteriais*

Sob efeito de anestesia, foi coletado sangue pela técnica da punção de plexo veno retro-orbital (Halpern and Pacaud, 1951) com tubo capilar de vidro. Esse material foi utilizado para avaliar integridade hepática por meio das análises das aminotransferases aspartato-aminotransferase (AST) e alanina-aminotransferase (ALT), da fosfatase alcalina (FA) e das bilirrubinas total e direta.

As análises de integridade hepática foram realizadas no Laboratório Central do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Para a determinação da AST (aspartato-aminotransferase) e da ALT (alanina-aminotransferase) no plasma, foi utilizado o método enzimático comercial

(Boehringer Mannheim, Alemanha). Já para determinação da atividade da FA (Fosfatase Alcalina) no plasma, foi empregado o método enzimático automatizado e, para determinação de bilirrubinas, foi utilizado método colorimétrico automatizado.

Posteriormente, realizou-se tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida da intervenção cirúrgica, que iniciou com laparotomia ventral média, exposição das alças intestinais para mensuração da pressão venosa portal (**Figura 13A**), realizada com polígrafo Lettica (Biscriptual Polygraph Wilson Medical Electronics Inc. Middletown, Wisconsin, USA) (**Figuras 13B**).



**Figura 13.** (A) Mensuração da pressão venosa portal; (B) Polígrafo Lettica.

Em seguida, foi exposta a artéria aorta abdominal, da qual foi coletado sangue para realização de gasometria arterial (**Figura 14**). A análise dos gases arteriais foi realizada no Laboratório Central do Hospital de Clínicas de Porto Alegre através do analisador ABL 700 (Radiometer, Copenhagen), pelo método de eletroiontoforese.



**Figura 14.** Coleta de sangue da Aorta Abdominal para Gasometria Arterial.

O gradiente alvéolo-arterial de oxigênio (Ling et al., 2004) foi calculado, utilizando os valores de pressão parcial de dióxido de carbono e da pressão parcial de oxigênio, através da seguinte fórmula:

$$(AaO_2) = 150 - (PaCO_2/0.8) - PaO_2$$

Dando continuidade, foram retirados o fígado, o baço e os pulmões, sendo estes pesados para realização das relações hepatossomática, esplenossomática e pneumossomática, respectivamente, e, posteriormente, o fígado e o pulmão separados em duas partes:

1º) Um pequeno fragmento do fígado e da porção anterior do lobo inferior do pulmão direito foram imergidos em Formol tamponado 10% durante doze horas e, posteriormente, em álcool para análises histológicas e de imuno-histoquímica;

2º) O restante do fígado e do pulmão foi pesado e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises bioquímicas e de biologia molecular. O baço foi apenas pesado e, posteriormente, desprezado.

### 3.2.4 Análises histológicas

Os testes anatomopatológicos referentes ao tecido hepático foram realizados no Laboratório de Patologia Experimental do Instituto Gonçalo Muniz – FIOCRUZ (Bahia), e as análises referentes ao tecido pulmonar foram realizadas no Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, ambas por patologista cegados quanto aos grupos experimentais.

Para a dissecação anatômica do fígado e do pulmão direito, seccionaram-se todas as demais estruturas, obtendo-se pulmão e fígado que foram incluídos em blocos de parafina. Na etapa seguinte, os blocos de parafina foram fixados ao Micrótopo (Leitz®1512) onde se realizaram os cortes. Na fase de coloração, as lâminas foram mergulhadas nos corantes hematoxilina-eosina e intermediadas por banho de água corrente. Somente o fígado recebeu coloração de picrosírius. Na fase de desidratação, as estruturas passaram por três recipientes com álcool absoluto e por dois de xilol. Colocou-se a lâmina sobre a lâmina, utilizando-se Bálsamo do Canadá ou Entellan, finalizando, assim, o processo de preparação. As lâminas foram analisadas em microscópio binocular Nikon Labophot nos diferentes aumentos. No tecido pulmonar, os capilares alveolares foram selecionados para avaliação morfométrica, a qual foi conduzida por microscópio equipado com câmera digital para captura de imagens através do software Image-Plus (Media Cybernetics, Bethesda, USA).

### 3.2.5 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada para verificação da ativação das células estreladas no tecido hepático e, como marcador para estas células ativadas, foi utilizada a  $\alpha$ -SMA. Foi utilizado anticorpo policlonal  $\alpha$ -SMA (Abcam, Cambridge, UK). Cada secção foi desparafinizada com xilol e reidratada com diferentes graus de álcool. A recuperação de antígeno foi feita em micro-ondas (300W) em buffer citrato (pH 6.0) a 100°C, e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação das lâminas em metanol absoluto contendo 3% de peróxido de hidrogênio, à temperatura ambiente. Os cortes foram sequencialmente pré-incubados com 10% de soro de coelho, à temperatura ambiente, para bloquear possíveis reações indesejadas do anticorpo secundário. As lâminas foram incubadas com anticorpo  $\alpha$ -SMA na diluição 1:200. Após sessenta minutos em temperatura ambiente, elas foram tratadas com reagente EnVision (Dako, Glostrup, Dinamarca). Logo, foram realizados três lavagens com PBS e 3,39-diaminobenzidina foi utilizada como cromógeno. Os núcleos foram contracolorados com hematoxilina. O anticorpo primário foi diluído em PBS, contendo 0,1% de albumina bovina como controle negativo. Os resultados foram avaliados por um dos autores, sem conhecimento prévio dos grupos, através de microscópio equipado com câmera digital para captura de imagens através do software Image-Plus (Media Cybernetics, Bethesda, USA).

### 3.2.6 Análises Bioquímicas

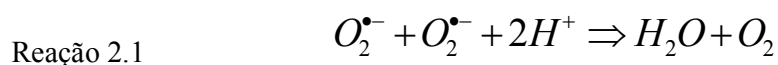
#### 3.2.6.1 *Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)*

O emprego da técnica das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico é utilizado para medir a LPO, porque o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído e outros aldeídos. A técnica consiste em aquecer o material biológico a ser testado na presença de ácido tiobarbitúrico em meio ácido, para medir espectrofotometricamente a formação de um composto corado (base de Schiff). Para que ocorresse a reação, adicionou-se ao homogeneizado, ácido tricloroacético (TCA) a 10%(P/V), que tem a função de desnaturar as proteínas presentes e acidificar o meio de reação. Essa mistura foi agitada e centrifugada durante três minutos a 1000 X g. Foi retirada parte do sobrenadante e a este foi adicionado o ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (P/V), que reagiu

com os produtos da LPO formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada a 100°C e, em seguida, resfriada no gelo. Depois desses procedimentos, foi realizada a leitura da absorbância a 535nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nmoles de TBARS por mg de proteína (Buege and Aust, 1978).

### 3.2.6.2 *Superóxido Dismutase (SOD)*

A enzima SOD catalisa a reação de dois ânions superóxido, com a conseqüente formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) (Southorn and Powis, 1988b, Southorn and Powis, 1988a, Boveris et al., 1983). **Reação 2.1.**



A técnica utilizada está baseada da inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina. A SOD, presente na amostra em estudo, compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Dado que não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, utiliza-se a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector (adrenalina). A oxidação da adrenalina leva à formação de um produto colorido, o adrenocromo, detectado espectrofotometricamente. A atividade da SOD é determinada, medindo a velocidade de formação do adrenocromo, observada a 480nm, em meio de reação contendo glicina-NaOH (50mM, pH 10) e adrenalina (1mM) (Misra and Fridovich, 1972).

### 3.2.6.3 *Avaliação dos Metabólitos do Óxido Nítrico*

Inúmeras células em diferentes tecidos do corpo humano podem produzir óxido nítrico (NO) sendo que, na ausência de estimulação imunológica, a maior parte do NO é produzida pelas células endoteliais e do sistema nervoso central. É uma substância extremamente lábil, com meia-vida de apenas alguns segundos em sistemas biológicos. Dessa forma, a medida do NO faz-se de forma indireta, através da medida de nitritos e nitratos. Esse método consiste na

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

Para realizar a técnica, foram necessários 500  $\mu\text{L}$  de amostra, 100  $\mu\text{L}$  NADPH (0,2 mM), 70  $\mu\text{L}$  Tris Buffer 1M, pH 7,5, 230  $\mu\text{L}$  de uma mistura formada por glicose 6-fosfato (50 mM) e glicose 6-fosfato desidrogenase (100 U/mL), 100  $\mu\text{L}$  de nitrato redutase (10/mL), essa mistura foi incubada, à temperatura ambiente, durante trinta minutos. Posteriormente, foram utilizados 750  $\mu\text{L}$  dessa mistura e adicionados 750  $\mu\text{L}$  do reativo de Griess, incubando-a novamente, à temperatura ambiente, durante dez minutos. A leitura foi realizada a 550nm e foi feita uma curva padrão para a determinação de nitritos e nitratos (Granger et al., 1999).

### 3.2.7 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real – PCR em tempo real

Para quantificar a concentração de RNAm, utilizamos a metodologia de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real.

Primeiramente, foi realizada extração e purificação do RNA da amostra, mediante uso de um kit comercial (Promega Corporation, Madison, USA). Após esse procedimento, foi quantificado o total de RNA nas amostras, mediante utilização de espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Products, Wilmington, USA) e, posteriormente, realizou-se por meio do sistema High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA)(Garcia-Mediavilla et al., 2007) a conversão de RNA a cDNA, baseando-se na capacidade da transcriptase reversa em sintetizar uma cadeia complementar de DNA (cDNA) a partir de uma sequência molde de RNA.

Como procedimento sequencial, realizou-se a técnica de PCR, em tempo real, de acordo com o descrito por Mullis e Faloona, em 1987, e por Saiki e colaboradores, em 1988, com base no processo natural de replicação do DNA com amplificação cíclica (Mullis and Faloona, 1987, Saiki et al., 1988). O método constou de três etapas: desnaturação, anelamento e alongamento, efetuados de forma sucessiva em condições controladas de temperatura e tempo.

Foram também utilizados os demais materiais, como sondas TaqMan para iNOS (GenBank acesso n° D12520.1 e Rn00561646\_m1), eNOS (GenBank acesso n° AB176831.1 e Rn02132634\_s1), HO-1 (GenBank acesso n° BC091164.1 e Rn01536933\_m1) e ETBr (GenBank acesso n° X57764.1 e Rn00569139\_m1). Além disso, foi utilizado colágeno tipo I (GenBank acesso n° BC108298.1 e Rn01526721\_m1), procolágeno tipo IV (GenBank acesso n° BC089096.1 e Rn01482927\_m1), fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF $\beta$ ) (GenBank acesso n° X52498.1 e Rn00572010\_m1),  $\alpha$ -actina do músculo liso (a-SMA) (GenBank acesso n° X06801.1 e Rn01759928\_g1) e ET-1 (GenBank acesso n° M64711.1 e Rn00561129\_m1). Esses genes foram avaliados através de ensaios de expressão TaqMan, sendo utilizado TaqMan Universal PCR Master mix (Applied Biosystems, Foster City, USA).

A amplificação foi realizada em termociclador StepOne Plus, real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, USA). Em cada ensaio, foi incluído um controle vazio e um controle negativo. O número de ciclos transcritos detectados foram normalizados com o número de ciclos para detecção do gene constitutivo HPRT (hipoxantina fosforribotransferase) (GenBank acesso n° M63983.1 e Rn01527840\_m1), utilizado como *housekeeping*, que codifica para a hipoxantina fosforribosil transferase.

As mudanças relativas aos níveis de expressão gênica foram determinadas, conforme o descrito por Livak e Schmittgen, em 2001, mediante o cálculo de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001).

### 3.2.8 Ensaio de mobilidade eletroforética - EMSA

A ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) foi realizada segundo o método descrito por Essani e colaboradores, que consiste na separação eletroforética do complexo formado pelo NF $\kappa$ B e de uma sonda específica de DNA marcada radioativamente com ( $^{32}$ P)ATP (GE Healthcare Bio-sciences AB, Uppsala, Sweden) (Martinez-Florez et al., 2005, Essani et al., 1997). O método foi realizado em etapas:

Primeiramente, para a análise da atividade do NF $\kappa$ B, o tecido foi processado para a obtenção da fração nuclear. Dando continuidade, foi realizada a marcação da sonda específica. Foi utilizado um oligonucleotídeo com sequência para o NF $\kappa$ B (5'-

AGTTGAGGGGACTTTCCCAGCC-3' - Promega Corporation, Madison, USA) marcado com  $^{32}\text{P}(\text{ATP})$ , ao qual foi adicionada uma mistura reativa (9,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q, 5,7  $\mu\text{L}$  de oligonucleotídeo para  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão 10x T4 PNK, 5,3  $\mu\text{L}$  (10 pmol) e  $^{32}\text{P}(\text{ATP})$ , 2  $\mu\text{L}$  da enzima T4 PNK). Após agitar a mistura, ela foi incubada a  $37^\circ\text{C}$  durante trinta minutos. Posteriormente, a fim de deter a reação e purificar o oligonucleotídeo, foram adicionados na seguinte ordem: 2,5  $\mu\text{L}$  de EDTA sódico (0,1 M), 12,5  $\mu\text{L}$  de acetato de amônia (3 M) e 80  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto. Incubou-se a mistura a  $-20^\circ\text{C}$  durante trinta minutos e, posteriormente, centrifugou-se a 12.000 X g durante quinze minutos, a  $4^\circ\text{C}$ . Foi descartado o sobrenadante e o precipitado ressuspenso em etanol a 70%. Novamente ocorreu incubação durante vinte minutos a  $-20^\circ\text{C}$ . Transcorrido este tempo, voltou-se a centrifugar a 12.000 X g a  $4^\circ\text{C}$ . Eliminou-se o sobrenadante, ressuspendendo o precipitado em tampão TE (10 mM Tris/HCl e 1 mM EDTA pH 8,0). O material foi armazenado a  $-20^\circ\text{C}$  durante um período inferior a quinze dias.

Posteriormente foi elaborada outra mistura reativa (5  $\mu\text{L}$  de tampão de incubação (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 40 mM NaCl, 1mM EDTA e glicerol 4%), 1  $\mu\text{L}$  de Poli (dI-dC), 13  $\mu\text{g}$  proteína provenientes dos extratos nucleares de cada amostra,  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q até completar um volume final de 25  $\mu\text{L}$ ) para a reação da união com o DNA. Essa mistura permaneceu durante quinze minutos em gelo e logo foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo marcado (aproximadamente 30.000 c.p.m.) e incubados, à temperatura ambiente, durante vinte minutos.

Em seguida, preparamos o gel para a etapa de separação eletroforética, através da seguinte mistura (4 mL de acrilamida/bisacrilamida (29:1), 15 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , 200  $\mu\text{L}$  de persulfato de amônia, 10  $\mu\text{L}$  de TEMED). Essa mistura foi introduzida entre os cristais deixando-a polimerizar durante uma hora. Posteriormente, os cristais foram introduzidos na cuba de eletroforese, adicionados 2  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol nas misturas radioativas provenientes de cada amostra e carregado o gel. A eletroforese foi realizada com 150 (V), a  $4^\circ\text{C}$ , durante duas horas. Finalizada a eletroforese, o gel foi extraído cuidadosamente e transferido para papel tipo Whatman®, colocando-se-o no interior de um filme de revelação de alta sensibilidade (Amersham Pharmacia, Piscataway, USA). Depois de revelado o filme, foi realizada quantificação por densitometria, utilizando o programa Scion Image, com resultados expressos em relação à porcentagem do controle (100%).



### 3.2.9 Western Blot

Foi utilizado o sistema descrito por Laemmli e colaboradores (1970) para a eletroforese (Laemmli et al., 1970), e, para o *blotting*, a técnica descrita por Towbin e colaboradores (1979) (Towbin et al., 1979). Selecionamos quantidade de amostra equivalente a 30 µg de proteína. Adicionamos uma solução de H<sub>2</sub>O, tris/HCl 0,5 M, DTT 1% e azul de bromofenol, incubando-a durante cinco minutos a 100°C. Posteriormente, realizamos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% em tampão de eletroforese (Tris 25 mM, glicina 0,2 M, SDS 3,5 mM; pH 8,8). Depois de separadas, as proteínas foram transferidas para uma membrana de Polifluorofuro de Vinilideno (PVDF), a fim de permitir a sua exposição aos anticorpos. Para realizar a transferência, uma vez extraído o gel, este foi equilibrado em um tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 0,2 M e metanol 20%). A transferência foi realizada a 13 V durante 25 minutos. A membrana foi lavada com agitação durante dez minutos com PBS (0,14 M NaCl, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl), depois foi colocada durante trinta minutos em solução de bloqueio (leite em pó desnatado em PBS-Tween 20 frio) a 37°C.

A membrana de PVDF foi, então, incubada em *overnight* a 4° C com anticorpo primário policlonal específico para ED-1 (78 kDa) (Santa Cruz Biothecnology, Santa Cruz, USA). Após esse período, foi lavada seis vezes, durante dez minutos, com PBS-Tween 20. Posteriormente, foi incubada durante uma hora com anticorpo anti-imunoglobulina de coelho, unido a HRP (Dako, Glostrup, Dinamarca). Transcorrido esse tempo, foi novamente lavada seis vezes, durante dez minutos, em PBS-Tween 20.

A detecção das proteínas foi realizada por quimiluminescência utilizando um kit comercial ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) e, posteriormente, foi introduzida em um cassete junto com o filme de revelação (Amersham Hyperfilm ECL, UK). Depois de revelado, o filme foi secado, e as bandas foram quantificadas por densitometria, utilizando o programa Scion Image 4.02 para Windows (Scion Corporation, Frederick, USA). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

### 3.2.10 Análise Estatística

As médias e os respectivos desvios padrão foram calculados e analisados, utilizando ANOVA de duas vias, comparando os dois grupos (tratados e não tratados com quercetina) com outros dois grupos (cirróticos e controles), seguidas de Teste de comparações de *Student Newman-Keuls*. Os valores foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ . Todos os cálculos foram realizados com o uso do programa estatístico SPSS, versão 14.0.

## **4 RESULTADOS**

## **EXPERIMENTO I**

### **Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome**

**(Publicado na *Food and Chemical Toxicology*)**

**(Fator de impacto: 2.321)**

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Food and Chemical Toxicology 45 (2007) 1140–1146

[www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox)

## Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome

J. Tieppo<sup>a</sup>, R. Vercelesino<sup>a</sup>, A.S. Dias<sup>a</sup>, M.F. Silva Vaz<sup>b,c</sup>, T.R. Silveira<sup>a</sup>, C.A. Marroni<sup>d</sup>,  
N.P. Marroni<sup>a,e</sup>, J.A.P. Henriques<sup>b,c</sup>, J.N. Picada<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 90035-903, Laboratório de Hepatologia Experimental, Fisiologia, Ramiro Barcelos, 2350 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 91501-970, Centro de Biotecnologia e Departamento de Biofísica, Av. Bento Gonçalves, 9500 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, 92420-280, Curso de Farmácia, Laboratório de Genética Toxicológica, Av. Farroupilha, 8001 Bairro São José, Canoas, RS, Brazil

<sup>d</sup> Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, FFFCMPA, 90050-170, Curso de Medicina, Serviço de Hepatologia, Rua Sarmento Leite, 250 Bairro Bom Fim, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>e</sup> Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, 92420-280, Curso de Biologia, Laboratório de Estresse Oxidativo, Av. Farroupilha, 8001 Bairro São José, Canoas, RS, Brazil

Received 13 January 2006; accepted 25 December 2006

### Abstract

The hepatopulmonary syndrome (HPS) occurs when intrapulmonary dilatation causes hypoxemia in cirrhosis. The free radicals may play a significant contributory role in the progression of HPS, and flavonoid agents could protect against deleterious effects of free radicals. The flavonoid quercetin was evaluated in an experimental model of biliary cirrhosis induced by bile duct ligation (BDL) in rats. Quercetin was administered at 50 mg/kg for 14 days to cirrhotic and non-cirrhotic rats. Bone marrow was extracted from animals to analyze micronuclei. Lung, liver and blood were extracted to detect DNA damage using the comet assay. The results showed that the micronuclei and DNA damages to lung and liver were increased in BDL rats. Quercetin caused no damage to the DNA while decreasing the occurrence of micronucleated cells in bone marrow as well as DNA damage to lung and liver in cirrhotic rats. Quercetin showed antimutagenic activity against hydroperoxides as evaluated by the oxidative stress sensitive bacterial strains TA102 *Salmonella typhimurium* and IC203 *Escherichia coli*, suggesting protection by free radical scavenging. In *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains lacking mitochondrial or cytosolic superoxide dismutase, these results indicate that quercetin protects cells by induction of antioxidant enzymes. The present study is the first report of genotoxic/antigenotoxic effects of quercetin in a model of animal cirrhosis. In this model, quercetin was not able to induce genotoxicity and, conversely, it increased the genomic stability in the cirrhotic rats, suggesting beneficial effects, probably by its antioxidant properties. © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Quercetin; Comet assay; Micronucleus assay; Hepatopulmonary syndrome

**Abbreviations:** BDL, Bile duct ligation; DI, Damage index; HPS, Hepatopulmonary syndrome; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Hydrogen peroxide; NCE, Normochromatic erythrocytes; SCGE, Single-cell gel electrophoresis assay; PCE, Polychromatic erythrocytes.

\* Corresponding author. Address: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 91501-970, Centro de Biotecnologia e Departamento de Biofísica, Av. Bento Gonçalves, 9500 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 4779158; fax: +55 51 4771313.

E-mail address: [jnpicada@cpovo.net](mailto:jnpicada@cpovo.net) (J.N. Picada).

### 1. Introduction

Hepatopulmonary syndrome (HPS) occurs in at least 15% of patients with end-stage liver disease (Fallon and Abrams, 2000). HPS is a triad of advanced liver disease, intrapulmonary vasodilatation, and arterial hypoxemia, occurring in the clinical setting of liver disease or portal hypertension. HPS is also recognized to occur in both acute

and chronic hepatitis without portal hypertension and in pre-hepatic portal hypertension and hepatic venous obstruction without cirrhosis (Hoepfer et al., 2004; Imamura et al., 2005). There is evidence that free radicals may play a significant contributory role in the progression of this syndrome (Vallance and Moncada, 1991; Singh et al., 1992; Zhang et al., 2003). Some antioxidants have been shown to decrease efficiently the hepatic fibrosis in an animal model of cirrhosis by common bile duct ligation, which has been considered the best model to assess the HPS (Fallon et al., 1997; Gaines and Fallon, 2004). However, various studies have identified nominally antioxidant species which show low-dose antioxidant and high-dose pro-oxidant behavior (Rice-Evans and Miller, 1996; Ferguson, 2001).

Flavonoids are considered antioxidant agents widely distributed in dietary plants frequently consumed by humans such as fruits, vegetables, teas, and wine (Hollman and Katan, 1999; Skibola and Smith, 2000). The dietary intake of flavonoids in humans has been estimated to be 16–1000 mg/day. Quercetin is regularly consumed by humans as it is the major flavonoid found in human diet (Manach et al., 1998). A number of beneficial effects of quercetin on human health have been known for some time (Formica and Regelson, 1995; Hertog and Hollman, 1996; Stavrlic, 1994). This flavonoid is reported to decrease capillary fragility, to protect against diabetic cataracts, to possess antiviral and anti-allergenic activities, to inhibit platelet aggregation and the oxidation of low density lipoproteins, and to act as an anti-inflammatory agent (Bors et al., 1997).

However, it is very important to take into account the potential toxicity of quercetin because it has been shown that, in some conditions, it has genotoxic activity in prokaryotic and eukaryotic cells (Brown and Dietrich, 1979; Caria et al., 1995; Gaspar et al., 1993). Early studies of flavonoids first documented the mutagenicity of quercetin in its capacity to cause base-pair substitutions and frame-shift mutations in the Ames test (Carver et al., 1983). Results from different studies (Carver et al., 1983; Ruff et al., 1992; Sahu and Gray, 1996) demonstrated that it can act as a pro-oxidant, leading to oxidative DNA damage, which may be responsible for its mutagenicity. Quercetin induces chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in CHO cells (Skibola and Smith, 2000). Da Silva et al. (2002) showed that quercetin at high dose ( $2 \times 1250$  mg/kg dose) increases the micronucleus frequency in bone marrow of mice (Da Silva et al., 2002).

While there is ample evidence that a flavonoid-rich diet may promote good health, and considering that some studies (Peres et al., 2000; Pavanato et al., 2003) demonstrated an important role for quercetin in fighting the deleterious effects of free radicals in cirrhotic rats, its genotoxic/anti-genotoxic effects in HPS remain uncertain.

Against this background, the aim of this study was to evaluate the effect of quercetin on the baseline DNA damage of target tissues in the HPS, induced in the model of cirrhosis in rats by bile duct ligation. Bone marrow micro-

nucleus assay and the alkaline single-cell gel electrophoresis assay (SCGE, or comet assay) were performed in blood, lung, and liver tissues of cirrhotic and non-cirrhotic rats treated or untreated with quercetin for 14 days. Complementary assays were used to elucidate the cellular effects of quercetin as pro-/antioxidant or mutagenic/antimutagenic agent by means of a survival assay in strains of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast lacking superoxide dismutase enzymes and in the Salmonella/mutagenicity assay and WP2 Mutoxitest, using bacterial strains detecting oxidative mutagenesis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

The flavonoid quercetin ( $C_{15}H_{10}O_7$ ) (CAS Registry Number [117-39-5]) was purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

### 2.2. Animals

A total of 28 male Wistar rats weighing 200–300 g were obtained from the Institute of Basic Sciences of Health of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). Animals were housed in cages with food and water available *ad libitum*, and were maintained on a 12 h light/dark cycle. The temperature in the animals' room was 20–25 °C. All experimental procedures were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (NIH).

### 2.3. Experimental model of liver cirrhosis

Biliary cirrhosis in rats was induced by bile duct ligation. Details of the surgery and postsurgical care have been previously reported (Chang and Ohara, 1992; Fallon et al., 1997). The animals were divided in four experimental groups: Group I: Vehicle (saline 1 mL/kg i.p.) control group; Group II: Quercetin control group; Group III: bile duct ligation plus vehicle (BDL); Group IV: bile duct ligation plus quercetin. Surgery for bile duct ligation was carried out in rats of groups III and IV. A sham operation was performed in rats of groups I and II. In animals of groups II and IV, quercetin was administered i.p. at 50 mg/kg starting 14 days after surgery (day 14) until day 28, when the animals were killed and their tissues collected. The animals of groups I and III were treated with saline i.p. (vehicle). All animals were sacrificed 28 days after surgeries, when samples of bone marrow from femurs were collected for micronucleus assay, and of blood, liver and lung for comet assay.

### 2.4. Micronucleus assay

The micronucleus assay was performed according to the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program (Mavournin et al., 1990; Stopper et al., 1997). Bone marrow from both femurs was suspended in foetal calf serum and smears on clean glass slides were made according to Picada et al. (1997). Slides were air-dried, fixed in methanol, stained in 10% Giemsa and coded for a "blind" analysis. To avoid false negative results and as a measure of toxicity on bone marrow, the polychromatic erythrocytes/normochromatic erythrocytes (PCE/NCE) ratio was scored in 1000 cells. The incidence of micronuclei (MN) was observed in 2000 PCE for each animal (Picada et al., 1997).

### 2.5. Comet assay

The alkaline comet assay was carried out as described by Tice et al. (2000) with minor modifications (Picada et al., 2003; Tice et al., 2000). Each piece of lung and liver was placed in 0.5 mL of cold

phosphate-buffered saline (PBS) and minced into fine pieces in order to obtain a cellular suspension. The cell suspensions from lung, liver, and peripheral blood (5  $\mu$ L) were embedded in 95  $\mu$ L of 0.75% low melting point agarose (Gibco BRL) and spread on agarose-precoated microscope slides. After solidification, slides were placed in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 10.0), with freshly added 1% Triton X-100 (Sigma) and 10% dimethyl sulfoxide for a minimum of 1 h and a maximum of 1 week at 4 °C. Subsequently, the slides were incubated in freshly made alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) for 20 min at 4 °C. An electric current of 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) was applied for 15 min to electrophorese the DNA. The slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), stained with silver as described by Nadin et al. (2001) and analyzed using a microscope.

Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed from each animal. Cells were also scored visually according to tail size into five classes ranging from undamaged (0) to maximally damaged (4), resulting in a single DNA damage score to each animal, and consequently to each studied group. Therefore, the damage index (DI) can range from 0 (completely undamaged, 100 cells  $\times$  0) to 400 (with maximum damage, 100  $\times$  4). The damage frequency (%) was calculated based on the number of tailed versus tailless cells (Picada et al., 2003).

## 2.6. Assays in bacteria and yeast

### 2.6.1. Strains

*Salmonella typhimurium* TA102, described in Maron and Ames (1983), and *Escherichia coli* IC203 (WP2 *uvrA* *oxyR*/pKM101) and its *oxyR*+ parent IC188 (WP2 *uvrA*/pKM101), described in (Martinez et al., 2000), were kindly provided by B.M. Ames (University of California, Berkeley, CA, USA) and M. Blanco (Instituto de Investigaciones Citológicas, Valencia, Spain), respectively. Wild-type (WT) yeast strain *S. cerevisiae* EG103 (*MAT $\alpha$  leu2 3 112 his3 $\Delta$ 1 trp1 289 ura3 52 GAL<sup>+</sup>*) and isogenic strains lacking cytoplasmic superoxide dismutase CuZnSOD EG118 (*Asod1*) or mitochondrial MnSOD, EG110 (*Asod2*) and strain lacking both SOD, EG133 (*Asod1Asod2*), previously described in (Longo et al., 1996), were kindly provided by E.B. Gralla (from the Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, LA).

### 2.7. Mutagenicity and antimutagenicity assays in bacterial strains

Mutagenicity assays were performed according to Mortelmans and Zeiger, 2000, with a modified pre-incubation procedure (Picada et al., 2003). Quercetin was dissolved in dimethyl sulfoxide: distilled water (1:1) immediately prior to use. One-hundred microliters of test bacterial cultures (1–2  $\times$  10<sup>9</sup> cells/mL) were incubated in the dark at 37 °C with different amounts of quercetin (10, 50, 100, 250 and 500  $\mu$ g/plate) for 20 min, without shaking. Subsequently, 2 mL of soft agar (0.6% agar, 0.5% NaCl, supplemented with 50  $\mu$ M histidine to TA102 *S. typhimurium* strain or 0.05 mM tryptophan to *E. coli* IC188 and IC203 strains), at 45 °C, were added to the test tube and poured immediately onto a plate of minimal agar (1.5% agar, Vogel-Bonner E medium, containing 2% glucose to TA102 strain or 0.4% to *E. coli* strains). *Tert*-butylhydroperoxide (*t*-BOOH, 25  $\mu$ g/plate) was used as positive control. The plates were incubated in the dark at 37 °C for 48 h before counting the revertant colonies.

To assess quercetin antimutagenicity the procedure was as follows: quercetin was incubated with the culture at 37 °C without shaking for 20 min. An oxidative mutagen *t*-BOOH (25  $\mu$ g/plate) or hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (100  $\mu$ g/plate) was then added and the mixture further incubated at 37 °C for 20 min, followed by plating on the appropriate media. Plates were incubated in the dark at 37 °C for 48 h before counting the revertant colonies.

### 2.8. Sensitivity assay of *S. cerevisiae* strains

Protective or deleterious effects of quercetin against hydroperoxide-induced damage in *S. cerevisiae* yeast were assessed as described by Picada

et al. (2003). YPD-grown yeast cells from the early stationary phase were re-inoculated at an appropriate cell density in fresh YPD media containing 5% glucose (glucose repressing conditions) and grown for 4 h at 30 °C to a density of 1–2  $\times$  10<sup>7</sup> cells/mL. To evaluate sensitivity to quercetin, cultures were exposed to concentrations of 10, 50 and 100  $\mu$ g/mL and incubated under growth conditions for 4 h. In order to assess a possible antioxidant or pro-oxidant effect the pre-treated cells were then challenged with a lethal concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.25 mM) or *t*-BOOH (2 mM) and incubated for 1 h. Cells were appropriately diluted and plated in triplicate on solid YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, and 2% agar). After 3 days, colony-forming units were counted. All biological tests were repeated at least twice and plating was carried out in triplicate for each dose.

### 2.9. Data analysis

Statistical significance was determined by One-Way Analysis of Variance (ANOVA). In all comparisons,  $p < 0.05$  was considered as indicating statistical significance.

Mutagenicity data from assays in bacterial strains were analyzed with the Salmonel software (Myers et al., 1991). A compound was considered positive for mutagenicity only when: (a) the number of revertants was at least double the spontaneous yield (MI  $\geq$  2; MI = mutagenic index: no of induced colonies in the sample/no of spontaneous in the negative control); (b) a significant response for analysis of variance ( $p \leq 0.05$ ) was found; and (c) a reproducible positive dose-response ( $p \leq 0.01$ ) was present, evaluated by the Salmonel software (Myers et al., 1991).

The percentage of inhibition of mutagenicity was calculated according to Picada et al. (2003) as follows: percentage of inhibition ( $I\%$ ) =  $[1 - (B - NC/A - NC)] \times 100$ , where *A* represents the number of revertants on the plate containing mutagen only, *B* represents the number of revertants on the plate containing mutagen and antimutagen, and NC represents the number of spontaneous revertants on the negative control plate. The antimutagenic effect was given when one dose caused at least a 50% reduction of mutagenicity in the system ( $I\% \geq 50$ ).

## 3. Results

As shown in Table 1, a similar PCE/NCE ratio was detected in all groups, indicating no toxicity in bone marrow of the animals. However, there was an increase in frequency of micronucleus in cirrhotic rats (Group III) as compared to non-cirrhotic rats (Group I). Groups I and II showed similar responses. In quercetin-treated cirrhotic rats (Group IV) there was a decrease ( $p < 0.05$ ) in frequency of micronucleus in relation to untreated cirrhotic rats (Group III).

Results from the comet assay showed a significant increase in baseline DNA damage in lung and liver, but not in blood, of cirrhotic rats (Group III), as measured by DI and DF, in comparison with non-cirrhotic rats (Group I) (Table 2). The control group treated with quercetin (Group II) did not induce any significant increase in DNA damage as compared to the vehicle-control group (Group I) in any of the three tissues. Quercetin-treated cirrhotic rats (Group IV) showed reduced DNA damage in lung and liver tissues as compared to untreated cirrhotic rats (Group III) (Table 2).

Quercetin did not induce mutagenesis in IC188, IC203 and TA102 strains (Table 3), which have a proven detection ability for mutagens that generate ROS and cause oxidative DNA damage (Martinez et al., 2000). In TA102

Table 1  
Micronucleus test in bone marrow of cirrhotic and non-cirrhotic rats treated or untreated with quercetin

Group	Ratio (PCE/NCE)								Per group (mean ± SD)
	Individual values								
I	2.8	2.6	1.6	2.0	1.9	2.1	–	–	2.1 ± 0.5
II	2.1	1.8	3.0	2.9	2.5	2.5	–	–	2.5 ± 0.4
III	2.5	2.2	1.7	1.7	1.5	2.6	2.5	–	2.1 ± 0.5
IV	1.3	2.0	2.3	1.6	1.8	1.7	2.3	–	1.8 ± 0.4
Micronucleated polychromatic erythrocytes in 2000 PCE									
I	12	16	11	12	16	12	–	–	13.2 ± 2.2 <sup>***,b</sup>
II	12	11	13	13	12	15	–	–	12.7 ± 1.4 <sup>***,b</sup>
III	42	30	56	50	42	28	29	–	39.6 ± 11.0 <sup>***,a</sup>
IV	22	45	29	30	22	26	23	–	28.2 ± 8.1 <sup>***,a,b</sup>

Group I: vehicle control; Group II: quercetin control; Group III: BDL (bile duct ligation); Group IV: BDL + quercetin.

Significant difference: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  (ANOVA, Tukey test).

<sup>a</sup> Different from the vehicle control group.

<sup>b</sup> Different from the BDL group.

Table 2  
Comet assay in the blood, lung, and liver from cirrhotic and non-cirrhotic rats treated or untreated with quercetin

Tissue	Group	Damage index	Damage frequency
Blood	I	6.1 ± 3.9	5.9 ± 3.5
	II	7.6 ± 6	6.0 ± 2.8
	III	6.4 ± 3	5.4 ± 3.5
	IV	4.7 ± 1.4	4.6 ± 1.5
Lung	I	31.2 ± 16.2	22.6 ± 12.2
	II	40.7 ± 10.7 <sup>**b</sup>	29.0 ± 9.1 <sup>**b</sup>
	III	93.1 ± 39.0 <sup>***a</sup>	60.0 ± 20.6 <sup>***a</sup>
	IV	35.7 ± 19.1 <sup>***b</sup>	26.0 ± 12.6 <sup>***b</sup>
Liver	I	15.6 ± 3.7	11.2 ± 2.8
	II	39.9 ± 22.1 <sup>***b</sup>	27.9 ± 15.7 <sup>***b</sup>
	III	116.3 ± 38.8 <sup>***a</sup>	65.9 ± 21.4 <sup>***a</sup>
	IV	31.7 ± 15.7 <sup>***b</sup>	20.8 ± 10.0 <sup>***b</sup>

Group I: vehicle control; Group II: quercetin control; Group III: BDL (bile duct ligation); Group IV: BDL + quercetin. Damage index DI: can range from 0 (completely undamaged, 100 cells × 0) to 400 (with maximum damage 100 × 4); Damage frequency DF (%): was calculated based on number of cells with tail versus those with no tail.

Significant difference: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  (ANOVA, Tukey test).

<sup>a</sup> Different from the vehicle control group.

<sup>b</sup> Different from the BDL group.

strain quercetin showed antimutagenic activity against  $H_2O_2$  and  $t$ -BOOH, inhibiting by up to 80% the mutagenicity induced by  $H_2O_2$  (Table 4). In *E. coli* IC188-IC203 strains there was antimutagenic effect only to IC203 strain, using  $t$ -BOOH as oxidative mutagen (Table 4). Quercetin significantly enhanced the survival of the yeast cells stressed with  $H_2O_2$ , showing protective effects at 50 and 100  $\mu$ g/mL for EG103 (WT) and at 100  $\mu$ g/mL for isogenic strains EG110 and EG118 (Fig. 1). A similar response was observed using  $t$ -BOOH (data not shown).

#### 4. Discussion

Cirrhotic rats exhibited increased frequency of micronuclei (Table 1) and DNA damage (Table 2) in comparison

with non-cirrhotic rats, suggesting that HPS can decrease the genomic stability. Previous reports on the pathophysiology of biliary cirrhosis have shown that liver and lung lesions are induced by free radicals (Vallance and Moncada, 1991; Zhang et al., 2003; Singh et al., 1992). Indeed, nitric oxide levels are increased in HPS and natural antioxidant defenses are decreased (Zhang et al., 2003). Overproduction of nitric oxide in HPS could lead to the generation of peroxynitrite, a source of oxidative DNA damage (Ferguson, 2001).

Quercetin alone induced neither micronucleated polychromatic erythrocytes nor DNA damage, as observed by results from the quercetin control group (Group II) (Tables 1 and 2). In fact, the *in vivo* genotoxicity and carcinogenicity studies of flavonoids in mammals are predominantly negative (Das et al., 1994; Noda, 1999). Quercetin inhibits the development of experimental cancers in animal models (Stoewsand et al., 1984; Wiltrout and Hornung, 1988; Stavric, 1994). It is well known that quercetin as well as other flavonoids are able to protect against chemically induced DNA damage in human lymphocytes both *in vivo* and *ex vivo* as evaluated by the comet assay and increase the total antioxidant capacity of plasma (Anderson et al., 1994; Duthie et al., 1997; Wilms et al., 2005).

In our study, quercetin was able to protect DNA in the BDL model (Tables 1 and 2). Quercetin-treated cirrhotic rats (Group IV) exhibited a slight reduction of micronucleated cells (Table 1). Indeed, DNA damage evaluated by comet assay in lung and liver, both target tissues of HPS, was lower in quercetin-treated cirrhotic rats (Group IV) than in the BDL group (Group III) (Table 2). Inversely, the superoxide dismutase activity in these tissues was higher in quercetin-treated cirrhotic rats than in untreated ones (data not shown), suggesting antioxidant protective mechanisms by quercetin in this model.

Likewise, using *S. cerevisiae* strains, quercetin exerted antioxidant protective effects, increasing the survival of the strains against cytotoxicity induced by  $H_2O_2$  (Fig. 1). The lack of effect on double mutant EG133 ( $\Delta sod1\Delta sod2$ ),



1144

J. Tieppo et al. / Food and Chemical Toxicology 45 (2007) 1140–1146

Table 3  
Mutagenic effects of quercetin in bacterial strains detecting oxidative mutagens

Substance	Dose µg per plate	IC188		IC203		TA102	
		Revertant per plate <sup>a</sup>	MI <sup>b</sup>	Revertant per plate	MI	Revertant per plate	MI
PC <sup>c</sup>	25	422 ± 7	–	1007 ± 34	–	1125 ± 55	–
NC <sup>d</sup>	0	110 ± 11	–	116 ± 19	–	324 ± 19	–
Quercetin	10	105 ± 10	1.0	108 ± 29	0.9	368 ± 42	1.1
	50	109 ± 3	1.0	133 ± 6	1.1	378 ± 9*	1.2
	100	98 ± 5	0.9	132 ± 3	1.1	388 ± 19*	1.2
	250	109 ± 11	1.0	119 ± 13	1.0	391 ± 33	1.2
	500	107 ± 6	1.0	112 ± 17	1.0	410 ± 31*	1.3

\*  $P < 0.05$  (ANOVA).

<sup>a</sup> Number of revertant per plate: mean of three plates ± SD.

<sup>b</sup> MI: mutagenic index (no. of induced colonies in the sample/no. of spontaneous in the negative control).

<sup>c</sup> PC: positive control (*tert*-butylhydroperoxide).

<sup>d</sup> NC: negative control: dimethyl sulfoxide/sterile distilled water (1:1).

Table 4  
Effects of quercetin on mutagenicity induced by *t*-butylhydroperoxide (*t*-BOOH) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Substances	Doses µg per plate	IC188		IC203		TA102		
		Revertant per plate <sup>a</sup>	<i>I</i> (%) <sup>b</sup>	Revertant per plate	<i>I</i> (%)	Revertant per plate	<i>I</i> (%)	
<i>t</i> -BOOH	25 + 0	467 ± 53	–	911 ± 140	–	938 ± 88	–	
<i>t</i> -BOOH + quercetin	25 + 10	423 ± 61	12.4	882 ± 50	3.7	899 ± 48	5.8	
	25 + 50	371 ± 32	27.1	659 ± 46**	31.8	561 ± 48**	56.4	
	25 + 100	309 ± 23**	44.6	491 ± 56**	53.0	480 ± 47**	68.5	
	25 + 250	386 ± 14	22.9	440 ± 9**	59.4	492 ± 41**	66.7	
	25 + 500	404 ± 32	17.8	572 ± 47**	42.7	486 ± 46**	67.6	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 + 0	228 ± 29	–	538 ± 72	–	595 ± 31	–	
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + quercetin	100 + 10	236 ± 21	–	419 ± 20	–	599 ± 73	–
		100 + 50	233 ± 14	–	558 ± 47	–	471 ± 31*	38.0
		100 + 100	249 ± 30	–	481 ± 30	–	408 ± 57**	57.4
		100 + 250	265 ± 17	–	529 ± 35	–	361 ± 33**	71.8
		100 + 500	241 ± 12	–	564 ± 75	–	327 ± 31**	82.2
NC <sup>c</sup>		113 ± 13	–	118 ± 32	–	269 ± 23	–	

\*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (ANOVA).

<sup>a</sup> Number of revertant per plate: mean of three plates ± SD.

<sup>b</sup> *I*: percentage of inhibition =  $[1 - (B - NC/A - NC)] \times 100$ , where *A* represents the number of revertants on the plate containing mutagen only, *B* represents the number of revertants on the plate containing mutagen and antimutagen, and NC represents the number of spontaneous revertants on the negative control plate. The antimutagenic effect was given when one dose caused at least a 50% reduction of mutagenicity in the system ( $I\% \geq 50$ ).

<sup>c</sup> NC: negative control: dimethyl sulfoxide/sterile distilled water (1:1).

which is defective in the superoxide dismutase enzymes, again suggests a role of quercetin in the expression of SOD enzymes to assess its protective effect.

Other mechanisms for the protective effect of flavonoids on cellular targets have been suggested (Bors and Sarah, 1987; Anderson et al., 1994; Ferguson, 2001). *In vitro* studies have demonstrated that quercetin and other flavonoids strongly inhibit the nitric oxide production and the tumor necrosis factor in Kupffer cells (Kawada et al., 1998). Flavonoids can also protect cells by acting as free radical scavengers, inhibiting DNA damage and mutagenicity (Edenharder and Grünhage, 2003; Salter et al., 2004). Moreover, a very pronounced antimutagenic effect by quercetin against *t*-BOOH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TA102 strain

(Table 4) was observed. With the use of the oxidant sensitive *E. coli* IC188 and its derivative that has enhanced sensitivity to oxidative damages, strain IC203, quercetin also showed antimutagenic effect against mutation induced by *t*-BOOH mainly in IC203, suggesting an antioxidant protection. Besides, quercetin was not able to induce itself mutagenicity in these strains (Table 3).

The present study is the first report of genotoxic/antigenotoxic effects of quercetin in an animal model of cirrhosis. In this model, quercetin was not able to induce genotoxicity and, conversely, it increased the genomic stability in the cirrhotic rats, suggesting beneficial effects, probably by its antioxidant properties. Additional studies should be performed to better understand the mechanism

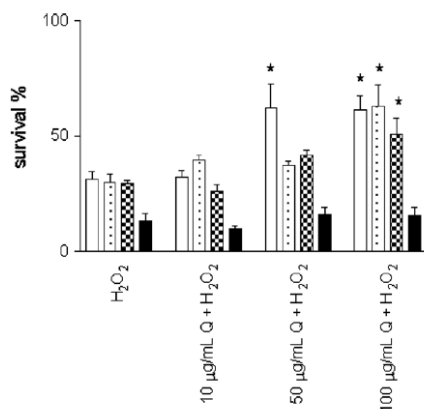


Fig. 1. Effect of quercetin on survival to oxidant  $H_2O_2$  (0.25 mM) in isogenic *S. cerevisiae* yeast strains EG103 (WT) (white bars), EG118 ( $\Delta sod1$ ) (spotted bars), EG110 ( $\Delta sod2$ ) (mosaic bars), and EG133 ( $\Delta sod1\Delta sod2$ ) (black bars).

of protection by quercetin on DNA in the HPS and evaluate its effects on hepatopulmonary functions.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants from the Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Laboratory of Experimental Hepatology (HCPA) and GENOTOX – Genotoxicity Laboratory, Universidade Federal do Rio Grande do Sul and Universidade Luterana do Brasil.

#### References

- Anderson, D., Yu, T.W., Phillips, B.J., Schmezer, P., 1994. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat. Res.* 307, 261–271.
- Bors, W., Sarah, M., 1987. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radic. Res. Commun.* 2, 289–294.
- Bors, W., Michel, C., Stettmaier, K., 1997. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors* 6, 399–402.
- Brown, J.P., Dietrich, P.S., 1979. Mutagenicity of plant flavonols in the *Salmonella*/mammalian microsome test: activation of flavonol glycosides by mixed glycosidases from rat cecal bacteria and other sources. *Mutat. Res.* 66, 223–240.
- Caria, H., Chaveca, T., Laires, A., Rueff, J., 1995. Genotoxicity of quercetin in the micronucleus assay in mouse bone marrow erythrocytes, human lymphocytes, V79 cell line and identification of kinetochore-containing CREST staining micronuclei in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 343, 85–94.
- Carver, J.H., Carrano, A.V., Macgregor, J.T., 1983. Genetic effects of the flavonols quercetin, kaempferol, and galangin on Chinese hamster ovary cells in vitro. *Mutat. Res.* 113, 45–60.
- Chang, S.W., Ohara, N., 1992. Pulmonary circulatory dysfunction in rats with biliary cirrhosis. An animal model of the hepatopulmonary syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145, 798–805.
- Das, A., Wang, J.H., Lien, E.J., 1994. Carcinogenicity, mutagenicity and cancer preventing activities of flavonoids: a structure-system-activity relationship (SSAR) analysis. *Prog. Drug Res.* 42, 133–166.
- Da Silva, J., Herrmann, S.M., Heuser, V., Peres, W., Possa Marroni, N., Gonzalez-Gallego, J., Erdtmann, B., 2002. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem. Toxicol.* 40, 941–947.
- Duthie, S.J., Collins, A.R., Duthie, G.G., Dobson, V.L., 1997. Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 393, 223–231.
- Edenharder, R., Grünhage, D., 2003. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.* 540, 1–18.
- Fallon, M.B., Abrams, G.A., 2000. Pulmonary dysfunction in chronic liver disease. *Hepatology* 32, 859–865.
- Fallon, M.B., Abrams, G.A., McGrath, J.W., Hou, Z., Luo, B., 1997. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome. *Am. J. Physiol.* 272, G779–G784.
- Ferguson, L.R., 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat. Res.* 475, 89–111.
- Formica, J.V., Regelson, W., 1995. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 33, 1061–1080.
- Gaines, D.I., Fallon, M.B., 2004. Hepatopulmonary syndrome. *Liver Int.* 24, 397–401.
- Gaspar, J., Laires, A., Monteiro, M., Laureano, O., Ramos, E., Rueff, J., 1993. Quercetin and the mutagenicity of wines. *Mutagenesis* 8, 51–55.
- Hertog, M.G., Hollman, P.C., 1996. Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50, 63–71.
- Hoepfer, M.M., Krowka, M.J., Strassburg, C.P., 2004. Portopulmonary hypertension and hepatopulmonary syndrome. *Lancet* 363, 1461–1468.
- Hollman, P.C., Katan, M.B., 1999. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* 37, 937–942.
- Imamura, M., Luo, B., Limbird, J., Vitello, A., Oka, M., Ivy, D.D., Mcmurtry, I.F., Garat, C.V., Fallon, M.B., Carter, E.P., 2005. Hypoxic pulmonary hypertension is prevented in rats with common bile duct ligation. *J. Appl. Physiol.* 98, 739–747.
- Kawada, N., Seki, S., Inoue, M., Kuroki, T., 1998. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and *N*-acetylcysteine on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology* 27, 1265–1274.
- Longo, V.D., Gralla, E.B., Valentine, J.S., 1996. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J. Biol. Chem.* 271, 12275–12280.
- Manach, C., Morand, C., Crespy, V., Demigne, C., Texier, O., Regerat, F., Remesy, C., 1998. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett.* 426, 331–336.
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 173–215.
- Martínez, A., Urios, A., Blanco, M., 2000. Mutagenicity of 80 chemicals in *Escherichia coli* tester strains IC203, deficient in OxyR, and its oxyR(+) parent WP2 uvrA/pKM101: detection of 31 oxidative mutagens. *Mutat. Res.* 467, 41–53.
- Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F., Heddl, J.A., 1990. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 239, 29–80.

- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455, 29–60.
- Myers, L., Adams, N., Kier, L., Rao, T.K., Shaw, B., Williams, L., 1991. Microcomputer software for data management and a statistical analysis of the Ames/Salmonella test. In: Krewski, D., Franklin, C.A. (Eds.), *Statistical in Toxicology*. Gordon and Breach, New York, pp. 265–279.
- Nadin, S.B., Vargas-Roig, L.M., Ciocca, D.R., 2001. A silver staining method for single-cell gel assay. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 1183–1186.
- Noda, M., 1999. International agency for research on cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 29, 592 <http://www.iarc.fr/>.
- Pavanato, A., Tunon, M.J., Sanchez-Campos, S., Marroni, C.A., Llesuy, S., Gonzalez-Gallego, J., Marroni, N., 2003. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig. Dis. Sci.* 48, 824–829.
- Peres, W., Tunon, M.J., Collado, P.S., Herrmann, S., Marroni, N., Gonzalez-Gallego, J., 2000. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J. Hepatol.* 33, 742–750.
- Picada, J.N., Da Silva, K.V., Erdtmann, B., Henriques, A.T., Henriques, J.A., 1997. Genotoxic effects of structurally related beta-carboline alkaloids. *Mutat. Res.* 379, 135–149.
- Picada, J.N., Flores, D.G., Zettler, C.G., Marroni, N.P., Roesler, R., Henriques, J.A., 2003. DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 114, 80–85.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 790–795.
- Rueff, J., Laires, A., Gaspar, J., Borba, H., Rodrigues, A., 1992. Oxygen species and the genotoxicity of quercetin. *Mutat. Res.* 265, 75–81.
- Sahu, S.C., Gray, G.C., 1996. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione *S*-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett.* 104, 193–196.
- Salter, L., Clifford, T., Morley, N., Gould, D., Campbell, S., Curnow, A., 2004. The use of comet assay data with a simple reaction mechanism to evaluate the relative effectiveness of free radical scavenging by quercetin, epigallocatechin gallate, and *N*-acetylcysteine in UV-irradiated MRC5 lung fibroblasts. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 75, 57–61.
- Singh, S., Shackleton, G., Ah-Sing, E., Chakraborty, J., Bailey, M.E., 1992. Antioxidant defenses in the bile duct-ligated rat. *Gastroenterology* 103, 1625–1629.
- Skibola, C.F., Smith, M.T., 2000. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 375–383.
- Stavric, B., 1994. Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen. *Clin. Biochem.* 27, 245–248.
- Stoewsand, G.S., Anderson, J.L., Boyd, J.N., Hrazdina, G., Babish, J.G., Walsh, K.M., Losco, P., 1984. Quercetin: a mutagen, not a carcinogen, in Fischer rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 14, 105–114.
- Stopper, H., Eckert, I., Wagener, P., Schulz, W.A., 1997. Formation of micronuclei and inhibition of topoisomerase II in the comet assay in mammalian cells with altered DNA methylation. *Recent Results Cancer Res.* 143, 183–193.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen* 35, 206–221.
- Vallance, P., Moncada, S., 1991. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 337, 776–778.
- Wilms, L.C., Hollman, P.C., Boots, A.W., Kleinjans, J.C., 2005. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 582, 155–162.
- Wiltroth, R.H., Hornung, R.L., 1988. Natural products as antitumor agents: direct versus indirect mechanisms of activity of flavonoids. *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 220–222.
- Zhang, X.J., Katsuta, Y., Akimoto, T., Ohsuga, M., Aramaki, T., Takano, T., 2003. Intrapulmonary vascular dilatation and nitric oxide in hypoxemic rats with chronic bile duct ligation. *J. Hepatol.* 39, 724–730.

**EXPERIMENTO II**

**Quercitin administration ameliorates  
pulmonary complications of cirrhosis in rats**

**(Publicado na *The Journal of Nutrition*)**

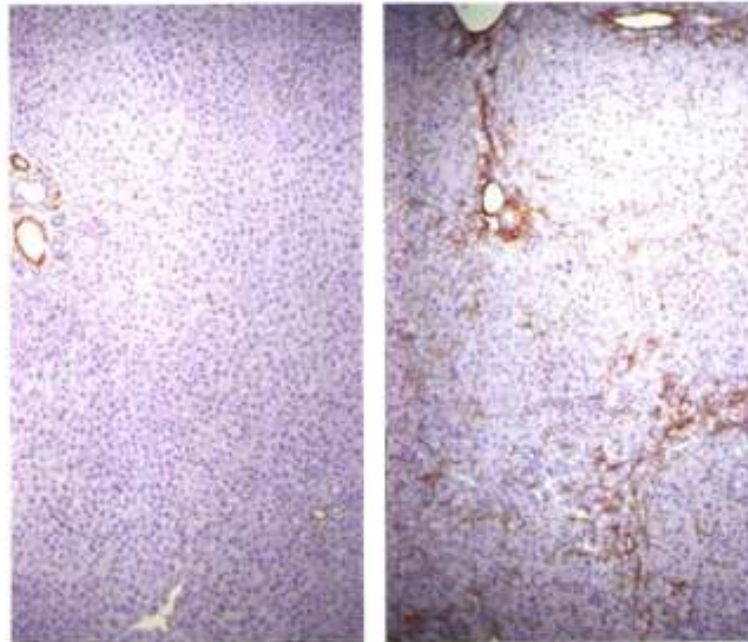
**(Fator de impacto: 3.8)**

July 2009 • Volume 139 • Number 7

# JN

## THE JOURNAL OF NUTRITION

A Publication of the American Society for Nutrition • www.nutrition.org



This issue genome-mutations by human nutrition and research  
Bone osteogenic signaling pathway in TWEAK mice  
Folate status and telomere length in peripheral blood mononuclear cells  
Energy intake, environment and food acceptance in Vietnamese toddlers

Cover image: Treatment with quercetin, a dietary flavonoid with antioxidant properties, ameliorated the effects of hepatic inflammation in rats with common bile duct ligation (CBDL), 14 d after surgery. *Left:* CBDL rat liver; *Right:* CBDL + Quercetin rat liver. Brown staining shows alpha-smooth muscle actin, which is elevated by CBDL. See the article by Tieppo et al., page [1339](#), in this issue (J. Nutr. 139: [1139-1346](#), 2009).

Supplemental Material can be found at:  
<http://jn.nutrition.org/cgi/content/full/jn.109.105353DC1>

The Journal of Nutrition  
 Nutrition and Disease



## Quercetin Administration Ameliorates Pulmonary Complications of Cirrhosis in Rats<sup>1-3</sup>

Juliana Tieppo,<sup>4</sup> María J. Cuevas,<sup>6</sup> Rafael Vercelino,<sup>4</sup> María J. Tuñón,<sup>6</sup> Norma P. Marroni,<sup>4,5</sup> and Javier González-Gallego<sup>6\*</sup>

<sup>4</sup>Laboratory of Experimental Hepatology and Physiology, Porto Alegre Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90035903, Brazil; <sup>5</sup>Laboratory of Oxidative Stress, Lutheran University of Brazil, Canoas 92425900, Brazil; and <sup>6</sup>Institute of Biomedicine, University of León and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, León 24071 Spain

### Abstract

In the hepatopulmonary syndrome (HPS), a common complication of liver cirrhosis, pulmonary endothelial endothelin B (ETB) receptor overexpression, enhanced endothelial nitric oxide (NO) synthase (eNOS)-derived NO production, and increases in pulmonary inducible NO synthase (iNOS) and heme oxygenase (HO-1) are important factors in the development of vasodilatation. These changes may be influenced by redox-sensitive signaling pathways, including nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). In this study, our aim was to evaluate the effects of the flavonoid antioxidant quercetin on the development of HPS in rats with common bile duct ligation (CBDL). Rats were divided into the following 4 groups: rats subjected to CBDL, Sham (rats subjected to simulated CBDL), quercetin-treated sham, and quercetin-treated CBDL. Quercetin (50 mg/kg) was administered for 2 wk starting on d 14 after surgery. Increased NO production, overexpression of iNOS, eNOS, HO-1, and ETB-receptor and activation of NF- $\kappa$ B were observed in lung of CBDL rats. Quercetin inhibited oxidative stress, NF- $\kappa$ B activation, and the expression of different pulmonary mediators involved in HPS. Quercetin also ameliorated liver injury and reduced the expression of hepatic endothelin-1 and HO-1 in untreated cirrhotic rats. Our findings suggest that quercetin administered after the onset of hepatic injury significantly ameliorates pulmonary complications in CBDL rats and that limitation of cirrhotic evolution contributes to this effect. *J. Nutr.* 139: 1339–1346, 2009.

### Introduction

Patients with liver cirrhosis bear a considerable risk of a variety of complications, such as variceal bleeding, ascites, spontaneous bacterial peritonitis, encephalopathy, and hepatopulmonary syndrome (HPS)<sup>1</sup> (1). HPS results when intrapulmonary vascular dilatation causes hypoxemia in the setting of liver disease or portal hypertension (2). This syndrome is found in 10–20% of patients with cirrhosis and its presence increases mortality (3).

Despite a dramatic improvement in our understanding of HPS, its pathogenesis remains incompletely understood and no medical therapies are available.

Chronic common bile duct ligation (CBDL) leading to biliary cirrhosis reproduces in rats the pulmonary physiological abnormalities of human HPS and serves as an experimental model of the disease (4). A series of alterations in the pulmonary microvasculature have been identified after CBDL and contribute to intrapulmonary vasodilatation. These changes include endothelin-1 (ET-1)-mediated endothelial nitric oxide (NO) synthase (eNOS) activation and NO production via increased endothelial endothelin B (ETB) receptors (5). Moreover, the accumulation and activation of intravascular macrophages leads to inducible NO synthase (iNOS)-derived NO and heme oxygenase (HO)-1-derived carbon monoxide (CO) production (6,7). These changes may be influenced by activation of several transcription factors, such as nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Thus, ET-1 increases the formation of NF- $\kappa$ B complexes and the stimulation of NF- $\kappa$ B DNA binding by ET-1 involves the ETB-receptor (8). Moreover, NF- $\kappa$ B activation stimulates gene expression of adhesion molecules, inflammatory cytokines, and enzymes such as iNOS, eNOS, and HO-1 (9,10). There is also evidence that oxidative damage may play a large role in the progression of this syndrome (11,12) and some antioxidants efficiently decrease hepatic fibrosis in CBDL animal models (13,14).

<sup>1</sup> Supported by grants from the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and Laboratory of Experimental Hepatology–Physiology of the Federal University of Rio Grande do Sul. CIBERehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

<sup>2</sup> Author disclosures: J. Tieppo, M. J. Cuevas, R. Vercelino, M. J. Tuñón, N. P. Marroni, and J. González-Gallego, no conflicts of interest.

<sup>3</sup> Supplemental Figures 1 and 2 are available with the online posting of this paper at [jn.nutrition.org](http://jn.nutrition.org).

<sup>7</sup> Abbreviations used: AaO<sub>2</sub>, alveolar-arterial oxygen gradient; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase;  $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -smooth muscle actin; AST, aspartate aminotransferase; CBDL, common bile duct ligation; CBDL-Q, quercetin-treated CBDL; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; ET-1, endothelin 1; ETB, endothelin B; HO-1, heme oxygenase 1; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyl-transferase; HPS, hepatopulmonary syndrome; iNOS, inducible nitric oxide synthase; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B; NO, nitric oxide; NO<sub>x</sub>, nitrate plus nitrite; PVP, portal venous pressure; Sham-Q, quercetin-treated sham-operated; SOD, superoxide dismutase; TGF $\beta$ , transforming growth factor-beta.

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: [jgonga@unileon.es](mailto:jgonga@unileon.es).

Quercetin (3,5,7,3,4-pentahydroxy flavone) is the major flavonoid found in the human diet (15). A number of beneficial effects of quercetin on human health have been shown (16) and some studies have indicated an important role for quercetin in fighting the deleterious effects of reactive oxygen species and in the inhibition of redox-sensitive signaling pathways, including NF- $\kappa$ B, in several diseases (17,18). In previous research, we also demonstrated that quercetin increased the genomic stability in rats with HPS, probably due to its antioxidant properties (19). However, additional studies should be performed to better understand the mechanism of protection by quercetin in HPS. Therefore, the present study was undertaken to evaluate the effects of quercetin on the development of HPS in rats with CBDL and to test whether quercetin treatment would decrease oxidative stress, NF- $\kappa$ B activation, and gene expression of the different mediators involved in HPS.

## Materials and Methods

**Materials.** Quercetin was purchased from Sigma Chemical. TaqMan primers and probes for iNOS (GenBank accession nos. D12520.1 and Rn00561646\_m1), eNOS (GenBank accession nos. AB176831.1 and Rn02132634\_s1), HO-1 (GenBank accession nos. BC091164.1 and Rn01536933\_m1), ETB-receptor (GenBank accession nos. X57764.1 and Rn00569139\_m1), collagen type I (GenBank accession nos. BC108298.1 and Rn01526721\_m1), procollagen type IV (GenBank accession nos. BC089096.1 and Rn01482927\_m1), transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) (GenBank accession nos. X52498.1 and Rn00572010\_m1),  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (GenBank accession nos. X06801.1 and Rn01759928\_g1), ET-1 (GenBank accession nos. M64711.1 and Rn00561129\_m1), and the housekeeping gene hypoxanthine phosphoribosyl-transferase (HPRT) (GenBank accession nos. M63983.1 and Rn01527840\_m1) genes were derived from TaqMan-Gene Expression assays (Applied Biosystems). NF- $\kappa$ B and Specificity protein 1 (SP1) oligonucleotides were from Promega. NF- $\kappa$ B oligonucleotide was labeled with ( $\gamma$ - $^{32}$ P)ATP from GE Healthcare Bio-sciences. Antibody against ED1 was from Santa Cruz Biotechnology, antibody against  $\alpha$ -SMA was from Abcam, and anti- $\beta$ -actin antibody was from Sigma. EnVision reagent was purchased by Dako Cytomation and 3,3'-diaminobenzidine was from Vector Laboratories.

**Rats and treatments.** The study protocol was approved by the institutional Animal Care Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the NIH. Male Wistar rats (Panlab) were caged at 24°C with a 12-h-light/dark cycle and free access to food (Panlab A04). The composition of the diet was: 15.4% protein, 2.9% fat, 60.5% carbohydrate, 3.9% fiber, 5.3% minerals, and 12% water. Four groups of rats were subjected to CBDL as previously described (20) and studied 4 wk after CBDL or a sham operation: an untreated sham-operated group (Sham), a quercetin-treated sham-operated group (Sham-Q), an untreated CBDL group (CBDL), and a quercetin-treated CBDL group (CBDL-Q). Quercetin was suspended, immediately before administration, in a 0.2% Tween aqueous solution. Groups of Sham and cirrhotic rats received daily a 50-mg/kg intraperitoneal injection of quercetin starting 14 d after surgery until d 28 (13), when the rats were anesthetized using ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and killed by exsanguination. Tissues were collected and stored at -80°C.

**Liver tests, portal venous pressure blood, and gas measurements.** On d 28, blood was collected into a heparinized glass capillary from the retro-ocular sinus for the analysis of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin, and direct bilirubin, which were measured using commercial kits (Boehringer Mannheim). The abdominal region was shaved for mid-ventral laparotomy and blood was collected from the abdominal aorta to measure arterial gases (20) using an automatic blood gas analyzer (ABL 700, Radiometer). The alveolar-arterial oxygen gradient was calculated

as alveolar-arterial oxygen difference ( $AaO_2$ ) =  $150 - (PaCO_2/0.8) - PaO_2$ , where  $PaCO_2$  is the partial pressure of carbon dioxide in the arterial blood and  $PaO_2$  is the partial pressure of oxygen in the arterial blood. Portal venous pressure was measured on a Wilson biscriptual polygraph (Wilson Medical Electronics).

**Histological and immunostaining analysis.** The anterior portion of the lower right lobe of the lung and liver tissue were collected and kept for 12 h in 10% formaldehyde solution. After paraffin embedding, lung tissue slides were stained using hematoxylin-eosin and liver tissue slides using hematoxylin-eosin and Sirius red. In the lung tissue, the alveolar capillaries were selected for computed morphometric evaluation by a microscope equipped with a digital camera and connected to an image capture board of a computer running the Image-Plus software.

**Immunohistochemistry.** Immunohistochemistry using polyclonal antibody  $\alpha$ -SMA was performed as a marker of activated hepatic stellate cells. Each section was deparaffinized by xylene and rehydrated with graded alcohols. The sections were retrieved in a microwave oven (300W) in citrate buffer (pH 6.0) for 10 min at 100°C. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation of slides in absolute methanol containing 3% hydrogen peroxide for 10 min at room temperature. The sections were sequentially preincubated with 10% normal rabbit serum for 10 min at room temperature to block the possible background staining by the secondary antibody. They were then incubated with antibody  $\alpha$ -SMA at its working dilution of 1:200. After 60 min at room temperature, they were treated with EnVision reagent for 30 min. They were washed 3 times with PBS after each incubation, and 3,3'-diaminobenzidine was employed as a chromogen. The nuclei were lightly counterstained with hematoxylin solution. The primary antibodies were replaced with PBS containing 0.1% bovine serum albumin as a negative control. Pathological findings were assessed by one of the authors who was unaware of the group allocations using a light microscopy equipped with a digital camera and connected to an image capture board of a computer using the Image-Plus software.

**Biochemical analysis.** Lipoperoxidation was measured using the TBARS assay (21). Cytosolic superoxide dismutase (SOD) was assayed by rate of epinephrine auto-oxidation as previously reported (22). The Griess reaction was used for the quantification of nitrate plus nitrite (NOx) (23).

**Real-time quantitative RT-PCR.** Total RNA was extracted and reverse transcribed using a High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems) (24). cDNA was amplified using TaqMan Universal PCR Master mix (Applied Biosystems) on a Step One Plus (Applied Biosystems). Each assay included a no-template control and an RT negative control. Relative changes in expression levels were determined using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (25). The cycle number at which the transcripts were detectable was normalized to the cycle number of HPRT gene detection, referred to as  $\Delta CT$ .

**Nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assay.** Binding activity of NF- $\kappa$ B was determined in nuclear extracts of lung using electrophoretic mobility shift assay (EMSA) (26). Competition experiments were also conducted using a negative control (cold probe) and lung sample plus nonspecific competitor. The nonspecific competitor reaction used an oligonucleotide with a different sequence to the specific oligonucleotide. An additional aliquot was prepared and loaded onto the gel, which contained all reagents with the exception of sample (negative control or cold probe). Protein-DNA complexes were separated from the free DNA probe by electrophoresis through 6% native polyacrylamide gels. Gels were dried under vacuum on Whatmann DE-81 paper and exposed to Amersham Hyperfilms at -80°C.

**Western blot analysis.** Lysate proteins were fractionated by SDS-PAGE and Western blotting was performed using the corresponding primary antibodies. Bound antibody was detected by enhanced chemiluminescence. Membrane rehybridization with  $\beta$ -actin antibody was performed for loading accuracy (27).

**Statistical analysis.** Means and SEM were calculated. Data were analyzed using a 2 (quercetin-treated and quercetin-untreated rats)  $\times$  2 (cirrhotic and noncirrhotic rats) ANOVA. Post hoc comparisons were conducted using the Newman-Keuls test. A value of  $P < 0.05$  was considered significant. All calculations were performed using the SPSS 14.0 statistical software.

## Results

**Cirrhosis and HPS in CBDL rats.** Plasma AST, ALT, and ALP activities and bilirubin concentration, portal pressure, and relative liver, lung, and spleen weights did not differ between the untreated sham-operated group and the Sham-Q group. They were significantly higher in untreated CBDL rats than in Sham rats and significantly reduced by quercetin in the CBDL group (Table 1). The AaO<sub>2</sub> was significantly reduced by 72% in CBDL-Q rats compared to the untreated CBDL group, indicating that the flavonoid markedly reduces HPS severity (Table 1).

The untreated CBDL group had evidence of biliary cirrhosis and nodular liver with intense ductular proliferation and fibrotic bridges, whereas cirrhotic rats treated with quercetin had a marked reduction in ductular proliferation (Fig. 1). Lungs from Sham-Q and untreated sham-operated rats had normal architecture of pulmonary parenchyma and vessels of normal diameter. The diameter of pulmonary vessels increased after CBDL and was significantly reduced by treatment with quercetin (Fig. 2).

**TBARS, SOD, and NOx in lung.** The 80 and 70% increases in TBARS and NOx concentrations, respectively, and the 69% decrease in SOD activity in CBDL rats with cirrhosis compared with sham-operated rats confirmed the presence of oxidative stress in lung tissue associated with cirrhosis-related HPS. These variables were normalized in the CBDL-Q group and they did not differ from those in control rats (Table 2).

**Mediators of pulmonary alterations after CBDL.** Next, we assessed the effects of quercetin on the pulmonary endothelium (lung ETB-receptor and eNOS) and on pulmonary intravascular macrophages (lung ED1, iNOS, and HO-1) after CBDL. ETB receptor and eNOS mRNA levels were 1.4- and 1.1-fold greater in untreated cirrhotic compared with sham-operated rats ( $P < 0.05$ ) and were normalized in CBDL-Q rats. Moreover, iNOS

and HO-1 mRNA expression in the lungs were 1.5- and 2.4-fold greater and were normalized in CBDL-Q rats (Table 3).

To confirm the accumulation of pulmonary intravascular macrophages in relation to iNOS and HO-1 alterations, we assessed levels of ED1, a specific marker for monocytes/macrophages. The qualitative increase in ED1 was confirmed by Western blotting, which indicated that the level in CBDL rats was 4.6 times that in the Sham group. After quercetin treatment, macrophage accumulation, as assessed by lower ED1 protein levels, was reduced by 54% (Fig. 3).

**Pulmonary NF- $\kappa$ B signaling pathway.** The signal intensity obtained by EMSA demonstrated that the NF- $\kappa$ B binding activity to NF- $\kappa$ B consensus sequence in lung tissue from untreated CBDL rats was 50% greater than in Sham rats ( $P < 0.05$ ). Binding activity did not differ from that in sham-operated rats in the CBDL-Q group (Fig. 4).

**Progression of cirrhosis.** To determine whether quercetin was able to ameliorate cirrhosis, we analyzed the effect on the mRNA expression of genes involved in hepatic fibrogenesis. Collagen type I, procollagen type IV, TGF $\beta$ , and  $\alpha$ -SMA were 7.4-, 5.3-, 2.9-, and 4.0-fold greater in untreated CBDL rats compared to Sham rats, respectively. Administration of quercetin to cirrhotic rats with established bridging fibrosis resulted in 18–28% lower expression levels compared to untreated CBDL rats (Table 3). Because hepatic stellate cells are considered a main source of the extracellular matrix in liver, we identified these cells by immunostaining using an antibody for  $\alpha$ -SMA, a marker of activated hepatic stellate cells. Numerous  $\alpha$ -SMA-positive cells were observed within the parenchyma of CBDL rats. In CBDL-Q rats, fibrosis was greatly reduced and there were fewer  $\alpha$ -SMA-positive cells than in untreated CBDL rats (Fig. 5).

**ET-1 and HO-1 mRNA after CBDL.** To gain further insight into the sequence of molecular events involved in the onset and progression of HSP, we evaluated liver ET-1 and HO-1 mRNA levels, which were 16.7- and 2.4-fold greater in CBDL rats than in Sham rats. Compared to untreated CBDL rats, levels were 33 and 25% lower, respectively, in those treated with quercetin (Table 3).

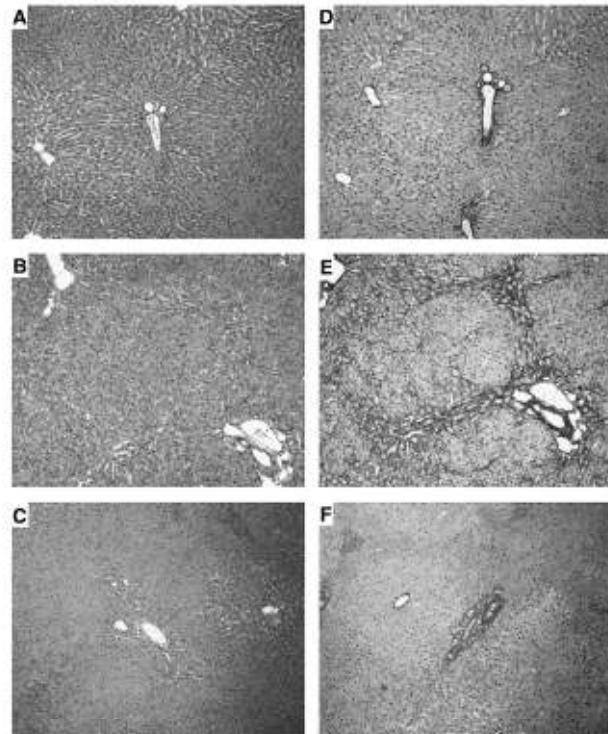
**TABLE 1** Relative liver, lung, and spleen weights, plasma transaminase activities and bilirubin concentrations, and portal pressure and AaO<sub>2</sub> in Sham and CBDL rats that were or were not treated with quercetin<sup>1</sup>

	Sham	Sham-Q	CBDL	CBDL-Q	ANOVA		
					Q	CBDL	Q $\times$ CBDL
Liver weight, g/100 g weight	2.9 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.1	6.1 $\pm$ 0.4*	4.4 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	NS	0.0001	NS
Lung weight, g/100 g weight	0.43 $\pm$ 0.02	0.42 $\pm$ 0.02	0.54 $\pm$ 0.03*	0.47 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	NS	0.0018	NS
Spleen weight, g/100 g weight	0.36 $\pm$ 0.02	0.35 $\pm$ 0.03	0.66 $\pm$ 0.07*	0.48 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	NS	0.0001	NS
Plasma AST, U/L	96 $\pm$ 10	66 $\pm$ 2	511 $\pm$ 47*	147 $\pm$ 23 <sup>b</sup>	0.0001	0.0001	0.0002
Plasma ALT, U/L	66 $\pm$ 9	38 $\pm$ 3	128 $\pm$ 13*	53 $\pm$ 9 <sup>b</sup>	0.0001	0.0011	0.0332
Plasma ALP, U/L	156 $\pm$ 17	145 $\pm$ 9	387 $\pm$ 26*	219 $\pm$ 43 <sup>b</sup>	0.0019	0.0001	0.0067
Plasma total bilirubin, $\mu$ mol/L	3.8 $\pm$ 0.7	4.6 $\pm$ 0.3	138.9 $\pm$ 8.7*	75.8 $\pm$ 11.8 <sup>b</sup>	0.0011	0.0001	0.0009
Plasma direct bilirubin, $\mu$ mol/L	1.7 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.2	107.7 $\pm$ 7.4*	49.1 $\pm$ 13.9 <sup>b</sup>	0.0014	0.0001	0.0014
PVP, <sup>2</sup> mm Hg	11.9 $\pm$ 1.6	11.2 $\pm$ 0.90	19.7 $\pm$ 1.9*	13.0 $\pm$ 0.90 <sup>b</sup>	0.0053	0.0011	0.0042
PaO <sub>2</sub> , <sup>2</sup> mm Hg	90 $\pm$ 2	81 $\pm$ 4	65 $\pm$ 5*	73 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	NS	0.0071	NS
AaO <sub>2</sub> , mm Hg	5.8 $\pm$ 1.2	5.5 $\pm$ 1.6	28.8 $\pm$ 3.0*	8.2 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	0.0058	0.0014	0.0072

<sup>1</sup>Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 11$ . \* $P < 0.05$  vs. Sham rats and Sham-Q rats; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs. CBDL rats. NS,  $P \geq 0.05$ .

<sup>2</sup>PVP, Portal venous pressure; PaO<sub>2</sub>, partial pressure of oxygen.



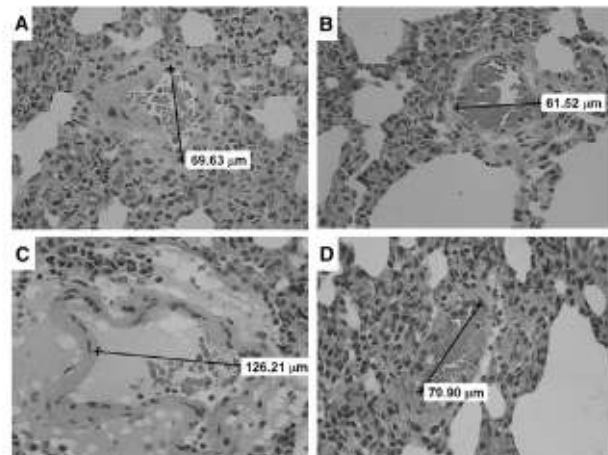


**FIGURE 1** Micrographs of hepatic tissue (original magnification: 100 $\times$ ). (A,D) Sham rats; (B,E) CBDL rats; (C,F) CBDL-Q rats. Tissue samples were counterstained with hematoxylin-eosin (A-C) and Sirius red (D-F). (A,D) Normal liver histology. (B,E) Intense ductular proliferation. (C,F) Marked reduction in ductular proliferation. A color version of this figure is available (**Supplemental Fig. 1**).

## Discussion

Currently, no effective medical therapies for HPS exist and liver transplantation is the only successful treatment (28). Therefore, it is essential to develop novel therapeutic strategies and evaluate

agents targeted at likely pathogenetic mechanisms. In the present study, quercetin decreased oxidative damage, nuclear translocation of NF- $\kappa$ B, the expression of lung iNOS, eNOS, HO-1, and ETB-receptor, and the severity of HPS, and also markedly reduced the expression of liver collagen I, procollagen IV, TGF $\beta$ ,



**FIGURE 2** Micrographs of pulmonary tissue (original magnification: 200 $\times$ ). Tissue samples were counterstained with hematoxylin-eosin. (A) Sham rats; (B) Sham-Q rats; (C) CBDL rats; (D) CBDL-Q rats. (A,B) Normal architecture of pulmonary parenchyma and vessels of normal diameter. (C) Vessels of increased diameter and (D) showing a marked reduction in the diameter of the pulmonary vessels. A color version of this figure is available (**Supplemental Fig. 2**).

**TABLE 2** TBARS, SOD, and total NOx in lung in Sham and CBDL rats that were or were not treated with quercetin<sup>1</sup>

	Sham	Sham-Q	CBDL	CBDL-Q	ANOVA		
					Q	CBDL	Q × CBDL
TBARS, nmol/mg protein	0.94 ± 0.09	0.71 ± 0.09	1.72 ± 0.03*	0.80 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.0031	0.0231	NS
SOD, U/mg protein	8.0 ± 0.5	6.9 ± 0.7	2.5 ± 0.4*	7.9 ± 0.4 <sup>b</sup>	0.0003	0.0002	0.0001
NOx, mmol/L	86 ± 7	95 ± 6	147 ± 10*	105 ± 7 <sup>b</sup>	NS	0.0010	0.0121

<sup>1</sup> Data are means ± SEM, n = 11. \*P < 0.05 vs. Sham rats and Sham-Q rats; <sup>b</sup>P < 0.05 vs. CBDL rats. NS, P ≥ 0.05.

ET-1 and HO-1, indicating that beneficial effects on the complications of cirrhosis, such as HPS or hypertension portal, could be due to the antioxidant and antifibrotic role of the flavonoid in the liver.

CBDL rats are widely used as a model of cirrhosis and portal hypertension. Although the frequency of HPS differs in humans and CBDL rats, the availability of an animal model to study mechanisms involved in the development of HPS provides considerable insight into potential mechanisms of human disease (20). The cirrhotic rats had impaired arterial oxygenation (11,20), as demonstrated by an increased AaO<sub>2</sub>. As previously documented using other antioxidant agents (29), the administration of quercetin to CBDL rats normalized the alveolar-arterial oxygen gradient, leading to an improvement of hypoxemia. Several studies found that exhaled NO concentrations were higher in patients with cirrhosis and HPS than in those without HPS (30) and that AaO<sub>2</sub> was linearly related to exhaled NO concentrations. In the present research, the increase of AaO<sub>2</sub> paralleled the increase in NOx across the lungs, suggesting that NO has a considerable influence on arterial oxygenation.

Increased hepatic production and plasma concentrations of ET-1 also have been observed in experimental and human cirrhosis. ET-1, just like NO, is an important endothelial mediator that modulates vascular tone (5). Other studies have revealed that increased hepatic production of ET-1 with release into the circulation is an important mechanism for triggering the increase in pulmonary eNOS, the onset of vasodilatation after CBDL, and gas exchange alterations (31). This effect may be

driven by a shear stress-mediated increase in pulmonary vascular ETB-receptor expression, which enhances endothelial NO production by ET-1 (32). Accordingly, administration of a selective ETB-receptor antagonist to CBDL rats decreases pulmonary endothelial eNOS and ETB-receptor levels and significantly improves HPS (5). The present study supports the hypothesis that rat pulmonary microvascular ETB-receptor overexpression contributes to enhanced eNOS activation and NO production in response to CBDL. Normalization of ETB-receptor mRNA levels with quercetin administration prevented the progression of HPS and corrected both eNOS messenger RNA induction and pulmonary NO concentrations.

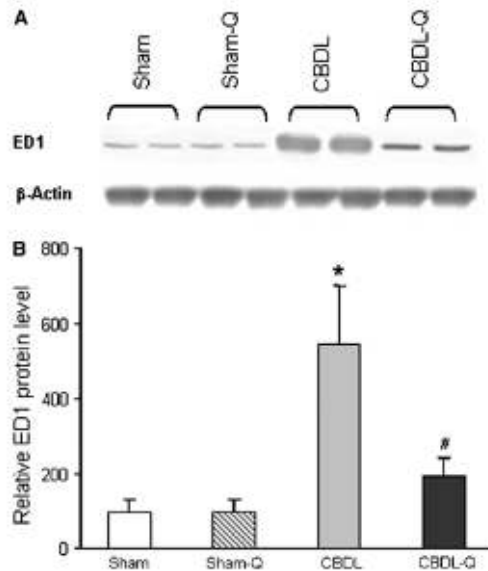
Studies using NOS inhibitors have demonstrated that NO overproduction plays a central role in HPS (29,33). Some investigators have shown that expression of eNOS, but not iNOS, is increased in the systemic vascular bed (34). In contrast, others (35) have suggested that iNOS rather than eNOS overexpression causes the NO activity increase seen in pulmonary arteries. Our data are consistent with increased expression of iNOS and, to a lesser extent, eNOS in the lungs of untreated cirrhotic rats, leading to increased pulmonary production of NO, which contributes to the genesis of HPS. In a previous study of cirrhotic rats, it was found that pulmonary NO production increased mainly in relation to iNOS overexpression in macrophages sequestered in pulmonary microvessels and that inhibition by antioxidant agents of NO overproduction prevented HPS (29). In our study, pulmonary intravascular macrophage accumulation also occurred in CBDL rats and was reflected in

**TABLE 3** Levels of mRNA of ETB-receptor, eNOS, iNOS, and HO-1 in lung and levels of mRNA of collagen type I, procollagen type IV, TGFβ, α-SMA, ET-1, and HO-1 in liver after CBDL and treatment with quercetin<sup>1,2</sup>

	Sham	Sham-Q	CBDL	CBDL-Q	ANOVA		
					Q	CBDL	Q × CBDL
Lung							
	% of Sham						
ETB-receptor, %	100 ± 6	105 ± 2	242 ± 14*	105 ± 20 <sup>b</sup>	0.0001	0.0001	0.0001
eNOS	100 ± 10	106 ± 11	207 ± 17*	123 ± 12 <sup>b</sup>	0.0002	0.0001	0.0001
iNOS	100 ± 12	115 ± 28	254 ± 29*	108 ± 15 <sup>b</sup>	0.0001	0.0001	0.0001
HO-1	100 ± 2	106 ± 4	341 ± 17*	117 ± 8 <sup>b</sup>	0.0001	0.0001	0.0001
Liver							
Collagen type I	100 ± 13	133 ± 21	839 ± 32*	602 ± 28 <sup>b</sup>	0.0005	0.0001	0.0001
Procollagen type IV	100 ± 6	110 ± 15	630 ± 24*	471 ± 31 <sup>b</sup>	0.0001	0.0001	0.0001
TGFβ	100 ± 7	117 ± 11	390 ± 25*	295 ± 18 <sup>b</sup>	0.0018	0.0001	0.0005
α-SMA	100 ± 12	98 ± 3	503 ± 23*	411 ± 18 <sup>b</sup>	0.0003	0.0001	0.0007
ET-1	100 ± 21	156 ± 32	1769 ± 120*	1180 ± 95 <sup>b</sup>	0.0244	0.0001	0.0100
HO-1	100 ± 15	128 ± 9	340 ± 8*	255 ± 17 <sup>b</sup>	0.0193	0.0001	0.0004

<sup>1</sup> Values are means ± SEM, n = 11 (duplicate samples from 3 separate experiments for each group). \*P < 0.05 vs. Sham rats and Sham-Q rats; <sup>b</sup>P < 0.05 vs. CBDL rats.

<sup>2</sup> Levels of mRNA were normalized to HPRT.

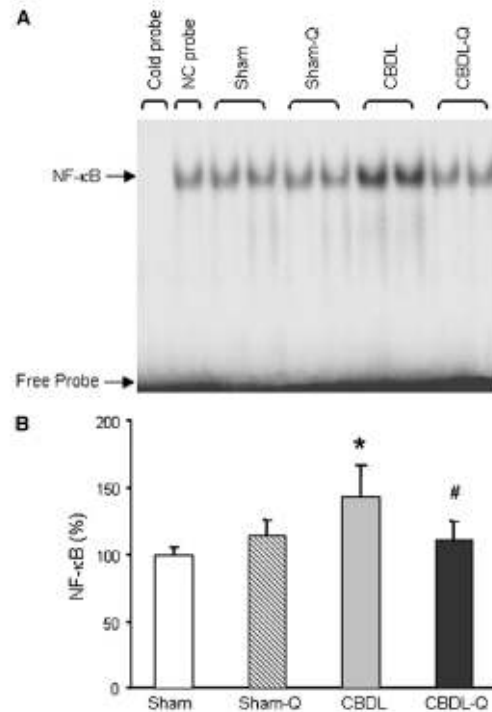


**FIGURE 3** Western blot analysis of ED1 in lung from untreated Sham rats, Sham-Q rats, CBDL rats, and CBDL-Q rats. (A) Representative Western blot photographs. (B) Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 11$  (duplicate samples). ANOVA: Q, NS; CBDL, 0.0037; Q  $\times$  CBDL, NS. \* $P < 0.05$  vs. Sham rats and Sham-Q rats; # $P < 0.05$  vs. CBDL rats. NS,  $P \geq 0.05$ .

increased ED1 levels; quercetin treatment decreased intravascular macrophage recruitment compared to untreated cirrhotic rats.

As experimental HPS progresses, there is a steady accumulation of intravascular macrophages. These cells transiently produce iNOS (11,29) and progressively produce HO-1 (4,11). These events contribute to further vasodilatation through production of iNOS-derived NO and HO-1-derived CO. There is solid evidence that crosstalk between the NOS and HO systems occur. Our findings are in concordance with those suggesting that NO derived from iNOS and, potentially, eNOS, are significantly associated with increased HO-1 expression in lung (11). Increased expression of HO-1 also has been associated with treatment with quercetin in *in vitro* studies (36). However, in the present study, HO-1 expression did not differ between Sham and Sham-Q rats, perhaps due to quercetin's limited bioavailability and metabolism, which make it difficult to extrapolate molecular mechanisms identified by *in vitro* approaches to *in vivo* situations. Overexpression of the isoform HO-1 was found only in the untreated CBDL group. Considering that HO-1 has a protective role against the effects of increased oxidative stress on cell function (37), we speculate that HO-1 may be upregulated in cirrhosis as a homeostatic mechanism against excessive oxidative stress. Thus, the decrease in oxidative stress after treatment with quercetin in cirrhotic rats, represented by the restoration of plasma TBARS, NO, and SOD, may be related to the normal levels of HO-1 mRNA in these rats. A second possibility is suggested by data showing that NOS inhibition can block the increase in pulmonary HO-1 after

1344 Tieppo et al.

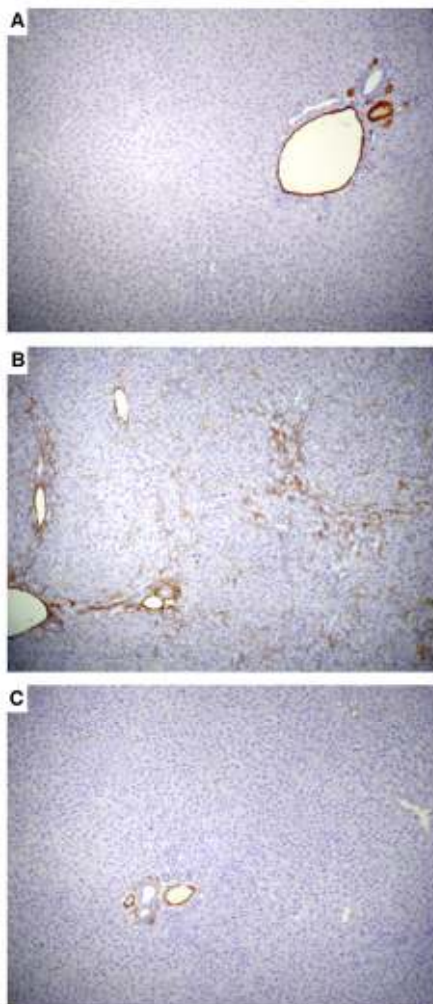


**FIGURE 4** NF- $\kappa$ B activation in lung nuclear extracts from Sham rats, Sham-Q rats, CBDL rats, and CBDL-Q rats. (A) Representative EMSA for each group,  $n = 11$ . Competition experiment of NF- $\kappa$ B binding activity was conducted using a negative control (cold probe) and lung sample + nonspecific competitor. (B) Values are means  $\pm$  SEM. ANOVA: Q, NS; CBDL, 0.0125; Q  $\times$  CBDL, 0.0062. \* $P < 0.05$  vs. Sham rats and Sham-Q rats; # $P < 0.05$  vs. CBDL rats. NS,  $P \geq 0.05$ .

CBDL (38). Taken together, both explanations could be related to the potential inactivation of the redox-sensitive transcription factors that regulates the expression of these enzymes.

One of the most important signaling pathways that could be activated during HPS is NF- $\kappa$ B, because this factor is activated by a variety of external stimulants, including reactive oxygen species, cytokines, and vascular shear stress. Once NF- $\kappa$ B is activated, it migrates to the nucleus, resulting in changes in the expression of different enzymes, including NOS and HO-1 (9,10). This study demonstrated that mRNA levels of iNOS, eNOS, HO-1, and ETB-receptor increased in parallel to NF- $\kappa$ B activation in lung from untreated CBDL rats. Moreover, mRNA levels of the above-cited genes were not affected in cirrhotic rats treated with the flavonoid. Quercetin administered after the onset of hepatic injury significantly attenuated the development of HPS, abolishing NF- $\kappa$ B activation and downregulating pulmonary ETB-receptor and iNOS, eNOS, and HO-1 mRNA levels.

Histological findings demonstrated that the untreated CBDL group had evidence of biliary cirrhosis. Excessive accumulation of fibrillar collagens I, III, and IV leads to the production of a wide set of profibrogenic molecules that rapidly accelerate development of fibrosis (39). Collagen I and procollagen IV gene



**FIGURE 5** Immunohistochemistry for  $\alpha$ -SMA in rat liver sections (original magnification: 100 $\times$ ). (A) Sham rats; (B) CBDL rats; (C) CBDL-Q rats. (A) A normal parenchyma. (B) Numerous  $\alpha$ -SMA-positive cells (yellow cells). (C) A marked reduction in  $\alpha$ -SMA-positive cells.

expression were considerably lower in CBDL-Q rats compared to CBDL rats, effects which could be explained by quercetin's protective effect against oxidative stress damage, which prevented scarring. Consistent with this, TGF $\beta$ , the most potent inductor of fibrosis, was lowered by quercetin treatment, confirming its antifibrotic role (13). These effects could be linked to an inhibitory effect of quercetin on TGF $\beta$ -induced expression of matrix genes by hepatic stellate cells and can also be explained by a reduction in hepatic stellate cell proliferation/differentiation as demonstrated by decreased mRNA levels of  $\alpha$ -SMA and immunostaining of  $\alpha$ -SMA-positive cells. Moreover, quercetin had a hepatic-protective effect, as indicated by

improvement in markers of hepatic damage, including ALT, AST, ALP, and bilirubin concentrations in cirrhotic rats treated with the flavonoid.

Our data also demonstrated that hepatic injury after CBDL resulted in enhanced hepatic ET-1 and HO-1 mRNA levels, which are associated with the development of molecular and functional alterations in HPS. The improvement in damaged liver in CBDL-Q rats closely paralleled the decrease in ET-1 and HO-1 mRNA levels in the liver. Thus, quercetin was particularly effective in decreasing gene expression of hepatic mediators involved in HPS after CBLD, suggesting that effects of this antioxidant on this syndrome are related to the prevention of the evolution of cirrhosis.

In conclusion, the present findings have potentially important clinical and mechanistic implications for treating and understanding HPS, suggesting that the protective effect of quercetin could due to a combination of different mechanisms on various cell types. First, our results show that in the CBDL rat model, quercetin administered after the onset of hepatic injury significantly improved HPS by reducing oxidative stress, abolishing NF- $\kappa$ B activation and downregulating pulmonary ETB-receptor and iNOS, cNOS, and HO-1 mRNA levels. Second, from a practical standpoint, we have shown that quercetin treatment, initiated following the establishment of liver injury in CBDL rats, decreased the severity of the subsequent HPS and that the positive effect on limiting cirrhotic evolution contributed to this effect.

#### Literature Cited

- Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008;371:838–51.
- Rodriguez-Roisin R, Krowka MJ, Herve P, Fallon MB, ERS Task Force Pulmonary-Hepatic Vascular Disorders (PHD) Scientific Committee, Pulmonary-hepatic vascular disorders (PHD). *Eur Respir J*. 2004;24:861–80.
- Schenk P, Schöninger-Heckle M, Fuhrmann V, Madl C, Silberhumer G, Müller C. Prognostic significance of the hepatopulmonary syndrome in patients with cirrhosis. *Gastroenterology*. 2003;125:1042–52.
- Palma DT, Fallon MB. The hepatopulmonary syndrome. *J Hepatol*. 2006;45:617–25.
- Ling Y, Zhang J, Luo B, Song D, Liu L, Tang L, Stockard CR, Grizzle WE, Ku DD, et al. The role of endothelin-1 and the endothelin B receptor in the pathogenesis of experimental hepatopulmonary syndrome. *Hepatology*. 2004;39:1593–602.
- Rabiller A, Nunes H, Lebrec D, Tazi KA, Warski M, Dulmet E, Libert JM, Mougrot C, Moreau R, et al. Prevention of gram-negative translocation reduces the severity of hepatopulmonary syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:514–7.
- Zhang J, Ling Y, Tang L, Luo B, Chacko BK, Patel RJ, Fallon MB. Pentoxifylline attenuation of experimental hepatopulmonary syndrome. *J Appl Physiol*. 2007;102:949–55.
- Galko C, Habib A, Tao J, Moulin S, Mackouf J, Mallat A, Lotersztajn S. Role of NF- $\kappa$ B in the antiproliferative effect of endothelin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in human hepatic stellate cells. Involvement of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*. 1998;273:23183–90.
- Majano B, Lara-Pezzi E, López-Cabrera M, Apolinario A, Moreno-Otero R, García-Mosazón C. Hepatitis B virus X protein transactivates inducible oxide nitric synthase gene promoter through the proximal nuclear factor  $\kappa$ B-binding site: evidence that cytoplasmic localization of X protein is essential for gene transactivation. *Hepatology*. 2001;34:1218–24.
- Lavrovsky Y, Song CS, Chatterjee B, Roy AK. Age-dependent increase of heme oxygenase-1 gene expression in the liver mediated by NF- $\kappa$ B. *Mech Ageing Dev*. 2000;114:49–60.
- Zhang J, Ling Y, Luo B, Tang L, Ryter SW, Stockard CR, Grizzle WE, Fallon MB. Analysis of pulmonary heme oxygenase-1 and nitric oxide synthase alterations in experimental hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology*. 2003;125:1441–51.

12. Vercelino R, Tieppo J, Dias AS, Marroni CA, Garcia E, Meurer L, Marroni NP. N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;102:370-6.
13. Peres W, Tuñón MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, González-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol.* 2000;33:742-50.
14. Gaines DL, Fallon MB. Hepatopulmonary syndrome. *Liver Int.* 2004;24:397-401.
15. Skibola CF, Smith MT. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med.* 2000;29:375-83.
16. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol.* 2008;585:325-37.
17. Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zetler C, Marroni C, Marroni N, González-Gallego J. Quercetin prevents oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol.* 2004;68:1939-46.
18. Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, González-Gallego J. Quercetin decreases oxidative stress, NF- $\kappa$ B activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr.* 2005;135:2299-304.
19. Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Silva Vaz ME, Silveira TR, Marroni CA, Marroni NP, Henriques JA, Picada JN. Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food Chem Toxicol.* 2007;45:1140-6.
20. Fallon MB, Abrams GA, McGrath JW, Hou Z, Luo B. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol.* 1997;272:G779-84.
21. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
22. 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.
23. Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol.* 1999;301:49-61.
24. García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, González-Gallego J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and downregulation of the nuclear factor  $\kappa$ B pathway in Chang liver cells. *Eur J Pharmacol.* 2007;557:221-9.
25. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . *Method.* 2001;25:402-8.
26. Martínez-Flórez S, Gutiérrez-Fernández B, Sánchez-Campos S, González-Gallego J, Tuñón MJ. Quercetin attenuates nuclear factor- $\kappa$ B activation and nitric oxide production in interleukin-1 $\beta$ -activated rat hepatocytes. *J Nutr.* 2005;135:1359-65.
27. Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, Gutiérrez B, Culebras JM, González-Gallego J. Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor  $\kappa$ B activation in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 2003;66:439-45.
28. Rodríguez-Roisin R, Krowka MJ. Hepatopulmonary syndrome: a liver-induced lung vascular disorder. *N Engl J Med.* 2008;358:2378-87.
29. Nunes H, Lebrec D, Mazmanian M, Capron F, Heller J, Tazi KA, Zerbib E, Dulmet E, Moreau R, et al. Role of nitric oxide in hepatopulmonary syndrome in cirrhotic rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:879-85.
30. Rolla G, Brussino L, Colagrande P, Dutto L, Polizzi S, Scappaticci E, Bergerome S, Morello M, Marzano A, et al. Exhaled nitric oxide and oxygenation abnormalities in hepatic cirrhosis. *Hepatology.* 1997;26:842-7.
31. Zhang M, Luo B, Chen SJ, Abrams GA, Fallon MB. Endothelin-1 stimulation of endothelial nitric oxide synthase in the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol.* 1999;277:G944-52.
32. Tang L, Luo B, Patel RB, Ling Y, Zhang J, Fallon MB. Modulation of pulmonary endothelial endothelin B receptor expression and signaling: implications for experimental hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;292:L1467-72.
33. Szrymf B, Rabiller A, Nunes H, Savale L, Lebrec D, Le Pape A, de Montville V, Mazmanian M, Humbert M, et al. Prevention of hepatopulmonary syndrome and hyperdynamic state by pentoxifylline in cirrhotic rats. *Eur Respir J.* 2004;23:752-8.
34. Sogni P, Smith AP, Gadano A, Lebrec D, Higenbottam TW. Induction of nitric oxide synthase II does not account for excess vascular nitric oxide production in experimental cirrhosis. *J Hepatol.* 1997;26:1120-7.
35. Chabot F, Mesiri H, Sabry S, Dall'Ava-Santucci J, Lockhart A, Dinh-Xuan AT. Role of NO in the pulmonary artery hyporeactivity to phenylephrine in experimental biliary cirrhosis. *Eur Respir J.* 1996;9:560-4.
36. Lin HC, Cheng TH, Chen YC, Juan SH. Mechanisms of heme oxygenase-1 gene induction by quercetin in rat aortic smooth muscle cells. *Pharmacology.* 2004;71:107-12.
37. Chen YC, Givals E, Yang J, Sumner SN, Falk S, Russell NS, Schrier RW. Increased vascular heme oxygenase-1 expression contributes to arterial vasodilation in experimental cirrhosis in rats. *Hepatology.* 2004;39:1075-87.
38. Carter EP, Hartsfield CL, Miyazono M, Jakkula M, Morris KG Jr, McMurtry IE. Regulation of heme oxygenase-1 by nitric oxide during hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;283:L346-53.
39. Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. *N Engl J Med.* 1993;328:1828-35.

**DISCUSSÃO GERAL**

## **5 DISCUSSÃO**

Recentemente, o modelo de ligadura de ducto biliar comum tem sido reconhecido como modelo experimental capaz de reproduzir as alterações clínicas observadas na SHP em humanos. A disponibilidade de um modelo animal para estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do SHP é de suma importância para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da doença, além de que, atualmente, não existem terapias eficazes para o tratamento da SHP, sendo o único tratamento de sucesso o transplante de fígado (Rodriguez-Roisin and Krowka, 2008, Fallon et al., 1997, Lee, 1989, Lee et al., 2004). Portanto, é essencial desenvolver novas estratégias terapêuticas e avaliar prováveis mecanismos patogênicos nessa doença.

Neste trabalho, foi utilizado o modelo de ligadura de ducto biliar comum para desenvolvimento da SHP. Avaliamos as alterações hepáticas e pulmonares e os efeitos antioxidantes e antígenotóxicos do flavonoide quercetina nos respectivos tecidos, além de testes em leveduras e bactérias para avaliação dessas atividades em diferentes organismos.

No **experimento I**, conforme descrito no **Artigo I**, foi avaliado o dano ao DNA no modelo experimental de cirrose biliar secundária e verificada a ação da quercetina como agente genotóxico/antigenotóxico, utilizando o teste de micronúcleos e o ensaio cometa, além de elucidação dos efeitos celulares da quercetina como pró-/antioxidante ou como agente mutagênico/antimutagênico, através de testes de sobrevivência em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes em enzimas superóxido dismutase e testes de mutagenicidade com linhagens de *Salmonella typhimurium* (testes de Ames) e de *Escherichia coli* (Mutoxite WP2), que detectam mutagênese oxidativa.

Através do teste de micronúcleos, realizado em medula óssea (**Tabela 1 – Artigo I**), observa-se aumento na frequência de micronúcleos no grupo cirrótico em relação ao grupo controle. Já no grupo controle submetido à administração de quercetina, os resultados foram similares aos encontrados no grupo controle que recebeu apenas veículo. O grupo cirrótico tratado com quercetina mostrou decréscimo significativo na frequência dos micronúcleos em relação aos ratos cirróticos não tratados.

Em relação à avaliação do dano ao DNA nos tecidos sanguíneo, hepático e pulmonar, ele foi realizado neste trabalho por meio da técnica de ensaio cometa. Os dados mostraram aumento significativo do dano ao DNA no fígado e no pulmão, mas não no sangue dos animais cirróticos, mensurados por Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD), em comparação com o grupo controle (**Tabela 2 – Artigo I**). No grupo controle tratado com quercetina, não foi observada diferença significativa de dano ao DNA em relação ao grupo controle que recebeu apenas veículo em nenhum dos três tecidos analisados. Já no grupo cirrótico tratado com quercetina, notou-se redução do dano ao DNA, em relação ao grupo de animais cirróticos não tratados, nos tecidos hepático e pulmonar (**Tabela 2 – Artigo I**).

O aumento da frequência de micronúcleos e dano ao DNA nos animais cirróticos em comparação com o grupo não cirrótico sugere que a SHP pode diminuir a estabilidade genômica. Estudos prévios relatam que, na patofisiologia da cirrose biliar, ocorrem lesões no fígado e no pulmão que são maximizadas pela ação de radicais livres, dados estes também observados no nosso trabalho pela avaliação de LPO e enzimas antioxidantes (Zhang et al., 2003, Vallance and Moncada, 1991, Schattenberg et al., 2005, Singh, 2000). Além disso, na SHP, os níveis de óxido nítrico são aumentados e as defesas antioxidantes naturais são diminuídas (Zhang et al., 2003). Essa superprodução de óxido nítrico na SHP pode levar à geração de peroxinitritos, uma fonte importante de dano oxidativo ao DNA (Lohman et al., 2001).

A quercetina, por si só, não levou ao aumento da frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos e nem induziu danos ao DNA, como pode ser observado pelos resultados obtidos do grupo de animais controle tratados com esse flavonoide (**Tabela 1 e 2 – Artigo I**). De fato, na maioria dos estudos *in vivo* em mamíferos, a genotoxicidade dos flavonoides é predominantemente negativa (Brozmanova et al., 2001). Fato confirmado por estudos com o uso de antioxidantes em animais controles, nos quais não foram mostrados



fenômenos de genotoxicidade, mutagenicidade e nem aumento do estresse oxidativo (Moreira et al., 2004, Pavanato et al., 2003, Dias et al., 2005b, Vercelino et al., 2008a).

Neste estudo, a quercetina foi capaz de proteger o DNA em ratos cirróticos por ligadura de ducto biliar comum (**Tabela 1 e 2 – Artigo I**). Os animais cirróticos tratados com quercetina exibiram uma pequena redução nos eritrócitos policromáticos micronucleados (**Tabela 1 – Artigo I**). Além disso, os danos ao DNA em fígado e pulmão, tecidos alvo acometidos na SHP, foram menores no grupo cirrótico tratado com quercetina em relação ao não tratado (**Tabela 2 – Artigo I**).

Outros mecanismos protetores dos flavonoides em células-alvo têm sido sugeridos em experimentos *in vitro* (culturas de células) (Anderson et al., 1994, Lohman et al., 2001). Tais estudos têm mostrado que a quercetina e outros flavonoides inibem eficazmente a produção de óxido nítrico e do fator de necrose tumoral nas células de Kupffer (Kawada et al., 1998). Os flavonoides podem também proteger essas células da ação de radicais livres, consequentemente inibindo o dano ao DNA e a mutagenicidade (Edenharder and Grunhage, 2003, Salter et al., 2004). Em nosso estudo, utilizando linhagem de *S. cerevisiae*, a quercetina mostrou seu potencial antioxidante, aumentando a sobrevivência em situação de citotoxicidade induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figura 1 – Artigo I**).

Outros mecanismos, para o efeito protetor dos flavonoides, sobre linhagens celulares têm sido sugeridos (Bors and Saran, 1987, Anderson et al., 1994, Ferguson, 2001). Com a utilização das linhagens de *E. coli*, que têm sensibilidade aumentada a danos oxidativos, observou-se que o uso da quercetina tem efeito antimutagênico contra mutação induzida por *t*-BOOH, principalmente em IC203, sugerindo proteção antioxidante. Além disso, a quercetina não foi capaz de induzir, por si só, mutagenicidade nessas linhagens (**Tabela 3 – Artigo I**). Os flavonoides também podem proteger as células, agindo como varredores de radicais livres, inibindo a mutagenicidade e os danos ao DNA (Edenharder and Grunhage, 2003, Salter et al., 2004). Na linhagem TA102, foi observado importante efeito antimutagênico dado pela quercetina contra *t*-BOOH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Tabela 4 – Artigo I**).

Por meio deste trabalho, observamos que o uso da quercetina não provocou danos ao DNA e não apresentou atividade genotóxica nem mutagênica. Para tal, utilizamos diferentes tecidos de animais submetidos à BDL, confirmando que há dano nos tecidos hepático e pulmonar.

Observamos redução do dano nos animais tratados com quercetina na dose de 50mg/Kg. Por outro lado, ao estudarmos a atividade antigenotóxica da quercetina em diferentes linhagens celulares, constatamos que frente a agentes potencialmente oxidantes, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o *t*-BOOH, ela – quercetina - também foi eficaz em diminuir o estresse oxidativo e em aumentar a estabilidade genômica, sugerindo efeitos benéficos, possivelmente por suas propriedades antioxidantes.

O **experimento II**, conforme descrito no **Artigo II**, foi desenvolvido em modelo animal, sendo avaliada a integridade hepática através da análise de enzimas séricas bem como alterações do peso do fígado, do baço e do pulmão desses animais em relação ao seu peso corporal total. Foram verificadas ainda alterações na difusão de gases através de gasometria arterial, alterações na pressão portal, análises histológicas nos tecidos pulmonar e hepático, imuno-histoquímica para  $\alpha$ -SMA em tecido hepático, avaliação de LPO, quantificação da enzima antioxidante SOD e avaliação dos metabólitos do NO em tecido pulmonar, avaliação dos níveis de RNAm de ETBr, eNOS, iNOS e HO-1 no tecido pulmonar dos diferentes grupos estudados, avaliação dos níveis de RNAm de colágeno tipo I, pró-colágeno tipo IV, TGF $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA, ET-1 e HO-1 no tecido hepático dos diferentes grupos estudados, verificação da expressão proteica do marcador de macrófagos ED-1 no tecido pulmonar e também da ativação do NF $\kappa$ B no extrato nuclear de tecido pulmonar nos diferentes grupos estudados.

No presente estudo, o tratamento com quercetina diminuiu o dano oxidativo, a translocação nuclear do NF $\kappa$ B, a expressão de proteínas no tecido pulmonar, como iNOS, eNOS, HO-1 e ETBr, e também reduziu acentuadamente a expressão de colágeno tipo I, procolágeno IV, TGF $\beta$ , ET-1 e HO-1 no tecido hepático, demonstrando efeitos benéficos que poderiam ser explicados devido ao poder antioxidante e antifibrogênico desse flavonoide no fígado.

Na avaliação da integridade hepática (**Table 1 – Artigo II**), através das enzimas séricas AST, ALT, FA e Bilirrubinas total e direta, observamos aumento significativo delas no grupo cirrótico e redução importante no grupo tratado com quercetina. As enzimas AST e ALT que catalisam a transferência do grupo  $\alpha$ -amino do ácido aspártico e da alanina para o grupamento de  $\alpha$ -ceto do cetoglutarato, com formação de ácido oxalacético e pirúvico, respectivamente, e atuam na gliconeogênese, facilitam a síntese de glicose a partir de outras fontes que não

carboidratos. Dessa forma, por estarem diretamente relacionadas à lesão e à necrose celular de tecidos ricos em ALT e AST, ou ainda a alterações da permeabilidade da membrana celular do hepatócito, ocorre liberação e elevação dos valores enzimáticos na corrente sanguínea, em alterações hepáticas estabelecidas (Brandão and Marroni, 2001).

A FA é um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ortofosfatos em pH alcalino, originando fosfato inorgânico e radicais inorgânicos. A elevação dos níveis séricos da FA em pacientes com doença hepatobiliar é secundária à síntese da enzima no fígado e à sua posterior liberação no soro. Os ácidos biliares induzem à síntese de fosfatase alcalina que, por sua vez, atua na membrana do hepatócito levando à ruptura de organelas hepáticas e tornando solúvel a FA ligada às membranas (Kozlov et al., 1994). A dosagem sanguínea de FA é o exame mais comumente solicitado para identificar a presença de colestase em pacientes com enfermidade hepatobiliar ocasionada pela obstrução do fluxo biliar (Santos and Zucoloto, 1998).

Nossos achados em relação à integridade hepática e à obstrução do fluxo biliar estão de acordo com trabalhos de outros autores que fizeram uso do modelo de ligadura de ducto biliar comum, indicando o comprometimento hepático e a fidelidade deste modelo animal (Pastor et al., 1997, Peres et al., 2000, Montero et al., 2005, Zhang et al., 2003).

Os animais cirróticos por ligadura de ducto biliar comum, submetidos à administração da quercetina, tiveram diminuição da atividade de todas as enzimas séricas avaliadas, mostrando que o flavonoide quercetina, através de seu potencial antioxidante, apresenta ação hepatoprotetora sobre o fígado. Esses dados também foram demonstrados por Peres e colaboradores, em 2003, no mesmo modelo animal e no uso deste flavonóide (Peres et al., 2000). Em outro estudo, Pavanatto e colaboradores, utilizando o modelo de cirrose induzida por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>), obtiveram efeitos similares aos nossos, achados na avaliação dessas enzimas após o uso do flavonoide quercetina em ratos (Pavanato et al., 2003).

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

No diagnóstico da SHP, a hipoxemia arterial, constatada pela gasometria arterial, é um achado fundamental. Os estudos apontam para um considerável desarranjo estrutural na microcirculação pulmonar, suficiente para permitir a passagem de sangue venoso misto para as veias pulmonares, que é representado pela disseminada vasodilatação pré-capilar no leito vascular pulmonar, próximo às áreas de trocas gasosas, permitindo diminuição nas concentrações de gases arteriais (Lima et al., 2004). O diâmetro normal dos capilares é de, aproximadamente, 8 a 15  $\mu\text{m}$ , podendo chegar a 500  $\mu\text{m}$  nos pacientes com Síndrome Hepatopulmonar (Chiesa et al., 1969, Schraufnagel and Kay, 1996).

Em pacientes cirróticos com suspeita de SHP, a análise gasométrica deve apresentar valores de  $\text{PaO}_2$  menores que 80mmHg, saturação de hemoglobina ( $\text{SaO}_2/\text{Hb}$ ) inferior ou igual a 92% e valores de  $\text{PCO}_2$  em torno de 30mmHg, indicando possível diagnóstico de SHP (Rodriguez-Roisin and Krowka, 2008, Martinez et al., 2000).

Na análise da gasometria arterial (**Tabela 1 – Artigo II**), observamos diminuição significativa da pressão parcial de oxigênio ( $\text{PO}_2$ ) e aumento na diferença alvéolo-arterial de oxigênio nos ratos cirróticos, demonstrando alteração na difusão de gases neste modelo. Esses dados confirmam os achados de diversos autores que utilizaram o mesmo modelo para avaliar as alterações pulmonares associadas à cirrose, e esta hipoxemia está relacionada à vasodilatação intrapulmonar, ocasionada por aumento da produção de substâncias vasodilatadoras no endotélio pulmonar, em especial, o óxido nítrico (NO) (Fallon et al., 1997, Zhang et al., 2003, Fallon, 2005, Nunes et al., 2001).

Achados semelhantes foram encontrados em diversos estudos que relatam o aumento do gradiente alvéolo-arterial de oxigênio em ratos submetidos à CBDL, demonstrando anormalidades na difusão de gases (Fallon et al., 1997, Zhang et al., 2003).

Em animais cirróticos que receberam tratamento com quercetina, notou-se, entretanto, aumento da  $\text{PO}_2$  e redução de 72% do gradiente  $\text{AaO}_2$ . Tais achados mostram que a quercetina, possivelmente pelo seu efeito *scavenger* de radicais livres, melhora a função hepática e, conseqüentemente, ameniza as alterações pulmonares características dessa síndrome, como a hipoxemia arterial. Além disso, estudos mostram que os flavonoides têm importante função na manutenção da resistência e da integridade da parede capilar, podendo,

dessa forma, também melhorar a relação ventilação-perfusão, facilitando as trocas gasosas (Havsteen, 1983, Gabor, 1988, Pratico, 2005, Formica and Regelson, 1995).

Como previamente documentado, a administração da quercetina em ratos CBDL normalizou o gradiente alvéolo-arterial de oxigênio, levando à melhora da hipoxemia. Vários estudos, mensurando a concentração de NO exalado, encontraram como resultado maiores concentrações de NO exalado em pacientes com cirrose e SHP do que em pacientes apenas com cirrose, e a diferença AaO<sub>2</sub> foi linearmente relacionada com as concentrações de NO exaladas (Rolla et al., 1997). No presente estudo, houve aumento da AaO<sub>2</sub> paralelo ao aumento do NOx no tecido pulmonar, sugerindo que o NO tem influência considerável sobre a oxigenação arterial.

Considerando-se as relações hepatossomática, esplenossomática e pneumossomática (**Tabela 1 – Artigo II**), podemos observar no grupo cirrótico aumento significativo do peso do fígado, do baço e dos pulmões em relação a todos os demais grupos estudados, salientando que, no grupo cirrótico tratado com quercetina, essa situação foi reduzida significativamente.

Em relação ao peso do fígado e do baço, os dados coincidem com trabalhos nos quais foi mostrado que tais aumentos também foram atenuados após o uso da N-acetilcisteína e da quercetina no modelo de CBDL (Pastor et al., 1997, Peres et al., 2000, Vercelino et al., 2008a). O aumento da relação pneumossomática provavelmente decorre de *shunts* e da dilatação vascular intrapulmonar, o que aumenta o peso do órgão em estudo. Berthelot e colaboradores (1966) encontraram aumento no diâmetro de arteríolas em animais após CBDL, o que poderia influenciar no peso desse órgão nessa situação (Berthelot et al., 1966). Dados parecidos foram encontrados por Vercelino e colaboradores em recente estudo (Vercelino et al., 2008a). O aumento do peso pode decorrer, ainda, da infiltração de células inflamatórias e das proteínas plasmáticas no parênquima pulmonar, em função da endotoxemia presente neste modelo experimental (Chang and Ohara, 1993).

Referente à pressão portal, observamos aumento significativo dela em animais cirróticos demonstrando quadro de hipertensão portal e reversão em animais cirróticos tratados com quercetina. Moreira e colaboradores encontraram dados parecidos em estudo prévio, utilizando modelo experimental de hipertensão portal por ligadura parcial de veia porta e submetendo os animais ao tratamento com quercetina (Moreira et al., 2004).

Por meio da histologia, em fragmentos de fígado e pulmão, foi verificado que ambos os tecidos apresentavam diferenças importantes entre o grupo cirrótico e os grupos controles e cirrótico tratado com quercetina. No exame histológico do tecido hepático pela coloração de hematoxilina-eosina, confirma-se o desenvolvimento de cirrose biliar no grupo com ligadura de ducto biliar comum (**Figura 1 (B e E) – Artigo II**), com nódulos regenerativos, intensa proliferação ductular, pontes fibróticas e focos de necrose. Já os animais cirróticos tratados com quercetina (**Figura 1 (C e F) – Artigo II**) apresentaram diminuição dessas alterações com marcada redução da proliferação ductular, diminuição de fibrose em pontes porta-porta e sem delimitação de nódulos formados. Esses achados estão de acordo com os estudos que utilizaram quercetina e outras substâncias antioxidantes, como a N-acetilcisteína e a rutina, em que se observa a redução da fibrose hepática (Pastor et al., 1997, Peres et al., 2000, Pavanato et al., 2003). A melhora no parênquima hepático acompanha-se da observada nos parâmetros enzimáticos e bioquímicos, assim como a melhora na integridade da membrana plasmática é acompanhada da redução na LPO.

Na análise histológica do pulmão, observamos, através de análise morfométrica, aumento importante do diâmetro dos vasos no grupo cirrótico (**Figura 2 (C) – Artigo II**), denotando-se a vasodilatação, característica chave da síndrome hepatopulmonar. Tais achados estão de acordo com os de outros autores que utilizaram o mesmo modelo para investigação da síndrome hepatopulmonar (Chang and Ohara, 1993, Fallon et al., 1997, Nunes et al., 2001, Zhang et al., 2003). Os animais cirróticos, quando submetidos ao tratamento com quercetina, apresentaram redução da vasodilatação (**Figura 2 (D) – Artigo II**). Isso possivelmente se dá em decorrência do potencial antioxidante da quercetina, que reduz a lesão oxidativa no fígado dos animais com CBDL, acarretando melhora na função hepática e, conseqüentemente, levando à redução da endotoxemia e à diminuição de NO e EAO no tecido pulmonar. O decréscimo da lesão oxidativa, a diminuição dos níveis de NO e a redução da vasodilatação pulmonar possivelmente restabelecem as alterações difusionais dos gases.

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

Sabe-se que todas as células fagocitárias são responsáveis pela geração de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), capaz de oxidar a membrana plasmática e produzir grande quantidade de

espécies reativas do oxigênio (ERO) (Thannickal and Fanburg, 2000). Considerando que neste modelo ocorre o processo de endotoxemia por translocação bacteriana, esse fator deve ser levado em consideração.

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

Na avaliação da lipoperoxidação (**Tabela 2 – Artigo II**) no tecido pulmonar, observamos aumento de 80% das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos animais cirróticos em relação ao grupo controle. Sugere-se que o aumento desse processo esteja relacionado ao aumento do estresse oxidativo.

Como citado anteriormente, tais achados no modelo de CBDL podem ser explicados pela endotoxemia e pelo aumento de ácidos biliares, que poderiam desequilibrar a atividade da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria hepática e, assim, favorecer o aumento da produção de espécies ativas de oxigênio (Pastor et al., 1997, Videla et al., 2004).

Em animais cirróticos que foram tratados com quercetina, entretanto, observaram-se valores de TBARS próximos aos dos grupos controle, reforçando o potencial antioxidante desse flavonoide. A diminuição da lipoperoxidação em situações de cirrose já foi demonstrada pelo uso de outras substâncias com ação antioxidante, como a rutina, a melatonina e a N-acetilcisteína neste modelo de cirrose biliar secundária (Pastor et al., 1997, Peres et al., 2000, Esrefoglu et al., 2005).

Na cirrose, ocorre um desbalanço entre as substâncias oxidativas e as antioxidativas, levando ao processo de estresse oxidativo. A quercetina, por sua ação antioxidante, parece proteger o tecido hepático (dados não publicados), melhorando a função hepática e, através desta, de forma secundária diminui a translocação bacteriana do trato gastrointestinal e, conseqüentemente, a atenuação das alterações pulmonares encontradas nessa síndrome (Formica and Regelson, 1995).

Vários trabalhos têm evidenciado o envolvimento do estresse oxidativo e da ação das enzimas antioxidantes na cirrose, na tentativa de proteger o fígado da ação lesiva dos radicais livres (Peres et al., 2000, Videla et al., 2004). As células têm um sistema de defesa antioxidante enzimático, que converte espécies oxidantes em moléculas não tóxicas, e protegem o organismo dos efeitos deletérios do estresse oxidativo (Formica and Regelson, 1995).

A enzima superóxido dismutase (SOD) constitui a primeira linha de defesa da célula contra o estresse oxidativo (Halliwell, 1994). Na análise enzimática, comparando a atividade da enzima SOD no tecido pulmonar, observa-se aumento significativo nos animais cirróticos tratados com quercetina, quando comparada aos não tratados, reforçando os mecanismos de proteção antioxidante da quercetina nesse modelo.

Vários trabalhos relacionam a diminuição da atividade da enzima SOD ao aumento do estresse oxidativo (Hodgson and Fridovich, 1975, Santiard et al., 1995). No presente estudo, observou-se diminuição de 69% da atividade da enzima SOD (**Tabela 2 – Artigo II**) no tecido pulmonar do grupo cirrótico em relação aos demais grupos. Em contrapartida, os animais cirróticos que foram tratados com quercetina mantiveram os valores da atividade da enzima SOD próximos aos do grupo controle. Tais dados, semelhantes aos nossos achados, foram também observados por Peres e colaboradores, em 2000, no tecido hepático, ao utilizar o flavonoide quercetina, e por Pastor e colaboradores, em 1997, ao utilizar NAC na avaliação do tecido hepático no modelo de cirrose por CBDL, levando-nos a pensar que, quando o fígado está protegido pela quercetina, a SOD é preservada.

Pavanatto e colaboradores obtiveram resultados semelhantes aos nossos em um estudo com animais cirróticos por tetracloreto de carbono. Nele, as enzimas antioxidantes CAT e SOD mostravam-se significativamente reduzidas no fígado dos animais cirróticos em relação aos grupos controle e se elevavam em 70% (SOD) e 80% (CAT) após a administração da quercetina (Pavanatto et al., 2003).

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



potentes varredores de radicais livres, como o radical hidroxil e o ânion superóxido, pois, após seu uso, a SOD está aumentada em níveis semelhantes aos dos controles, fato observado também por nós neste estudo (Robak and Gryglewski, 1988).

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

Acredita-se que a dilatação vascular intrapulmonar pode estar relacionada à translocação bacteriana do trato gastrointestinal, fenômeno que expõe o pulmão ao efeito de endotoxinas e citocinas inflamatórias (Falchuk et al., 1980). Esse aumento de endotoxinas na circulação pulmonar promove o acúmulo de macrófagos intravasculares na microcirculação pulmonar e se correlaciona com o aumento da expressão da óxido nítrico induzível (iNOS) (Nunes et al., 2001).

O NO funciona como sinalizador molecular mediando a vasodilatação, quando produzido em baixas concentrações pela óxido nítrico sintase (NOS) em células vasculares endoteliais, mas como uma fonte altamente tóxica e oxidante, quando produzido em altas concentrações, pela NOS em macrófagos no processo patológico (Russo et al., 2005).

Na avaliação da produção de nitratos totais no homogeneizado de pulmão (**Tabela 2 – Artigo II**), dos grupos estudados, observamos aumento de 70% na produção desses metabólitos no grupo cirrótico em relação aos demais grupos. Esses dados estão de acordo com os estudos que correlacionam a vasodilatação intrapulmonar de ratos cirróticos por CBDL à presença de óxido nítrico (NO) no tecido pulmonar (Nunes et al., 2001, Zhang et al., 2003, Fallon and Abrams, 2000).

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

Em nosso estudo, os valores de nitratos totais dos animais que receberam tratamento com quercetina (**Tabela 2 – Artigo II**) permaneceram próximos aos do grupo controle, sendo significativamente menores que os dos níveis encontrados no grupo cirrótico sem tratamento. A quercetina parece apresentar efeitos sobre a produção de NO, provavelmente por melhorar a função hepática e reduzir a produção de endotelina pelas células estreladas do fígado e, subsequentemente, a produção da eNOS, e por diminuir a translocação bacteriana, minimizando o acúmulo de citocinas e células de defesa no endotélio pulmonar com conseqüente redução da produção da iNOS.

O aumento da produção hepática e das concentrações plasmáticas de ET-1 também foram observados em situações de cirrose experimental e em humana. A ET-1, como o NO, é um importante mediador endotelial que modula o tônus vascular (Ling et al., 2004). Outros estudos têm revelado o aumento da produção hepática da ET-1 com liberação para a circulação sistêmica como importante mecanismo de desencadeamento do aumento da eNOS pulmonar, podendo também ser responsável pela vasodilatação intrapulmonar após a CBDL e, conseqüentemente, pelas alterações das trocas gasosas (Zhang et al., 1999). Esse efeito pode ser impulsionado por aumento na expressão de ETBr, o que aumenta a produção endotelial de NO secundariamente à ação da ET-1 (Tang et al., 2007). Da mesma forma, em outro estudo experimental, a administração de um antagonista seletivo de ETBr em ratos após CBDL

diminuiu a expressão de eNOS e ETBr no tecido pulmonar, ocasionando melhora significativa do quadro de SHP (Ling et al., 2004).

O presente estudo suporta a hipótese de que a superexpressão de ETBr na microvasculatura pulmonar (**Tabela 3 – Artigo II**) contribui para o aumento da ativação da eNOS e consequente aumento da produção de NO em resposta à CBDL. Após administração da quercetina, observou-se normalização dos níveis de RNAm de ETBr e de eNOS (**Tabela 3 – Artigo II**), e também das concentrações de NO em tecido pulmonar (**Tabela 2 – Artigo II**), o que possivelmente levou ao impedimento da progressão da SHP.

Estudos utilizando inibidores das NOS têm mostrado que a superprodução de NO desempenha um papel central na evolução da SHP (Nunes et al., 2001, Sztrymf et al., 2004). Alguns pesquisadores demonstram que somente a expressão de eNOS, não a iNOS, está aumentada no leito vascular sistêmico (Sogni et al., 1997). Em contrapartida, outros têm sugerido que a superexpressão da iNOS, mais que a eNOS, provoca o aumento da atividade do NO nas artérias pulmonares (Chabot et al., 1996).

Nossos dados são consistentes com o aumento da expressão da iNOS e, em menor medida, da eNOS nos pulmões de ratos cirróticos não tratados (**Tabela 3 – Artigo II**), levando a aumento da produção pulmonar de NO, o que contribui para a gênese do SHP. Outro estudo, realizado por Nunes e colaboradores, em 2001, também com ratos cirróticos verificou o aumento da produção de NO pulmonar, correlacionada principalmente com a superexpressão da iNOS em macrófagos sequestrados de microvasos pulmonares, e constatou que a inibição por agentes antioxidantes previne a SHP. Em nosso estudo, também ocorreu acúmulo de macrófagos intravasculares pulmonares nos animais cirróticos, o que foi refletido pelo aumento dos níveis de ED1, visualizados por Western Blot. O tratamento com quercetina diminuiu em torno de 54% o recrutamento de macrófagos intravasculares (**Figura 3 – Artigo II**), em comparação com ratos cirróticos não tratados.

Devido ao constante acúmulo de macrófagos intravasculares na progressão da SHP experimental, ocorreu, além da superprodução de iNOS, consequente aumento dos níveis de HO-1 (Zhang et al., 2003, Nunes et al., 2001, Palma and Fallon, 2006). Esses eventos contribuem para maior vasodilatação através da superprodução de NO derivado da iNOS e de

CO derivado da HO-1. Há evidências sólidas do envolvimento dessas substâncias na vasodilatação intrapulmonar presente nessa doença.

Nossos achados estão em concordância com os estudos que sugerem que o NO derivado de iNOS e da eNOS está significativamente associado ao aumento da expressão de HO-1 no tecido pulmonar (Zhang et al., 2003). Nós encontramos a superexpressão da isoforma HO-1 apenas no grupo cirrótico sem tratamento (**Tabela 3 – Artigo II**). Considerando que a HO-1 tem papel protetor contra os efeitos do aumento do estresse oxidativo nas funções celulares (Chen et al., 2004), investigamos se a HO-1 pode ser superexpressa em situações de cirrose como um mecanismo homeostático contra o aumento do estresse oxidativo. Desse modo, a diminuição do estresse oxidativo após o tratamento com quercetina em ratos cirróticos, representada pelo restabelecimento dos níveis de TBARS, NO, e SOD (**Tabela 2 – Artigo II**), poderia estar relacionada com a normalização dos níveis de RNAm de HO-1 neste grupo de animais (**Tabela 3 – Artigo II**). Uma segunda possibilidade é sugerida por dados reveladores de que a inibição da NOS pode bloquear o aumento da pulmonar HO-1 após CBDL (Carter et al., 2002). Tomadas em conjunto, ambas as explicações poderiam estar relacionadas à potencial inativação de fatores de transcrição sensíveis ao estado redox, que regulam a expressão dessas enzimas.

Uma das mais importantes vias sinalizadoras que poderia ser ativada durante a SHP é a do fator de transcrição NFκB, uma vez que é ativado por uma variedade de estímulos externos, incluindo espécies reativas de oxigênio, citocinas e estresse de cisalhamento vascular. Após a ativação desse fator, ele migra para o núcleo, resultando em alterações na expressão de diferentes enzimas, incluindo a NOS e a HO-1 (Majano et al., 2001, Lavrovsky et al., 2000).

No presente estudo, observamos que os níveis de RNAm da iNOS, da eNOS, da HO-1 e dos ETBr (**Tabela 3 – Artigo II**) aumentaram em paralelo com a ativação do NFκB (50% em relação aos controles) no tecido pulmonar de ratos cirróticos (**Figura 4 – Artigo II**). A quercetina administrada após o aparecimento de lesões hepáticas atenuou significativamente o desenvolvimento da SHP, abolindo a ativação do NFκB (**Figura 4 – Artigo II**), e devido a isso reduziu os níveis de RNAm de ETBr, iNOS, eNOS, e HO-1 (**Tabela 3 – Artigo II**).

Os achados histológicos mostraram que os animais cirróticos não tratados tinham cirrose biliar estabelecida (**Figura 1 (B e E) – Artigo II**). O acúmulo excessivo de fibras de colágenos tipos I, III e IV leva à produção de um grande conjunto de moléculas pró-fibrogênicas que aceleram rapidamente o desenvolvimento de fibrose (Friedman, 2004). A expressão de genes de colágeno tipo I e pró-colágeno tipo IV foi consideravelmente mais baixa no grupo de animais cirróticos que receberam tratamento com quercetina em comparação ao grupo sem tratamento (**Tabela 3 – Artigo II**), o que poderia ser explicado pelos efeitos protetores da quercetina contra o estresse oxidativo, prevenindo a progressão da doença.

Coerente com esses achados, o TGF $\beta$ , o mais potente indutor de fibrose, imensamente citado na literatura por desempenhar papel chave na transformação de células estreladas quiescentes em miofibroblastos fibrogênicos e por estimular a síntese de proteínas da matriz extracelular e inibir a sua degradação (Gressner and Weiskirchen, 2006, Dooley et al., 2003), teve seus níveis significativamente reduzidos após o tratamento com a quercetina (**Tabela 3 – Artigo II**), confirmando seu papel antifibrogênico (Peres et al., 2000). Tais efeitos podem ser correlacionados ao efeito inibitório da quercetina sobre a indução da expressão do TGF $\beta$  pela matriz das células hepáticas estreladas. Podem também ser explicados pela redução na proliferação e diferenciação dessas células, conforme mostrado pela diminuição dos níveis de RNAm da  $\alpha$ -SMA e pela sua imunopositividade no tecido hepático, recordando que se trata de um fiel marcador da ativação de células estreladas (**Figura 5 – Artigo II**). Além disso, como citado anteriormente, a quercetina tem efeito protetor contra o dano hepático, observado pela melhoria nos marcadores de dano hepático, incluindo ALT, AST, ALP, e concentrações de bilirrubina em ratos cirróticos tratados com o flavonoide (**Tabela 1 – Artigo II**).

Nossos dados também demonstraram que a lesão hepática após CBDL resultou em aumento dos níveis de RNAm de ET-1 e HO-1 no tecido hepático, associados com o desenvolvimento de alterações moleculares e funcionais da SHP. A melhora do dano hepático em ratos cirróticos tratados com quercetina está intimamente relacionada à diminuição dos níveis de RNAm de ET-1 e HO-1 no fígado, respectivamente em 33% e 25% (**Tabela 3 – Artigo II**). Sendo assim, a quercetina foi particularmente eficaz na diminuição da expressão

gênica de mediadores hepáticos envolvidos na SHP após a CBDL, sugerindo que os efeitos desse antioxidante sobre a síndrome estão relacionados à prevenção da evolução da cirrose.

Os presentes achados têm, portanto, potencial importância clínica e implicações nos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no tratamento e na melhor compreensão da SHP, sugerindo que os efeitos protetores da quercetina poderiam ocorrer devido à combinação de diferentes mecanismos de ação em diferentes tipos celulares. Em primeiro lugar, nossos resultados mostram que, no modelo murino de ligadura de ducto biliar comum, a quercetina administrada após o aparecimento da lesão hepática leva à melhora significativa da SHP. Em segundo lugar, a partir de um ponto de vista prático, demonstramos que o tratamento com quercetina, iniciado na sequência do estabelecimento de lesões hepáticas em modelo experimental de cirrose biliar secundária, reduz a severidade da SHP e que o efeito positivo da quercetina sobre a evolução da cirrose contribui para esse efeito protetor. Além disso, demonstramos, como visto em nosso primeiro trabalho, que a quercetina não exerceu atividade genotóxica e nem mutagênica, não acarretando, pois, dano ao DNA das células.

Tendo em vista as diferentes discussões e as complicações advindas da doença – cirrose –, o alto custo do tratamento, os problemas sociais dela decorrentes e as altas taxas de mortalidade, o estudo de substâncias que possam impedir ou diminuir os danos ocasionados é de extrema relevância e importância.

Devido às evidências apresentadas nos resultados deste trabalho, podemos sugerir que o modelo desenvolvido é realmente efetivo para o estudo da SHP e que a quercetina poderá ser, uma terapia de escolha para essa doença. Dessa forma, denotamos a necessidade do seguimento de estudos ainda mais avançados, envolvendo novas perspectivas de tratamento em modelos experimentais, a fim de aproximar cada vez mais nossos estudos da realidade clínica.

**CONCLUSÕES**

## **CONCLUSÕES**

Pelos dados obtidos nos trabalhos apresentados, concluiu-se que a administração de quercetina

No experimento I:

- reduziu a frequência de micronúcleos e o dano ao DNA no fígado e no pulmão dos animais cirróticos tratados. Não mostrou indícios de efeitos genotóxicos;
- aumentou a sobrevivência celular em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e exerceu atividade antimutagênica em linhagens de *Salmonella typhimurium* e de *Escherichia coli*;

No experimento II:

- diminuiu os níveis séricos das enzimas relacionadas à integridade hepática, manteve o peso do fígado, baço e pulmão, reestabeleceu a pressão portal e os valores de gasometria arterial nos animais cirróticos, diminuindo a diferença alvéolo-arterial de oxigênio neste grupo;
- na histologia do fígado, ocorreu redução da proliferação ductular, atenuação dos sinais de necrose e dos nódulos regenerativos. Na histologia do pulmão, ocorreu redução da vasodilatação.
- reduziu a imunorreatividade de células  $\alpha$ -SMA positivas;



- diminuiu o dano sobre os lipídios das membranas e manteve os valores da SOD no tecido pulmonar;
- reduziu os níveis de nitratos totais no tecido pulmonar;
- reduziu os níveis de RNAm de ETBr, eNOS, iNOS e HO-1 no tecido pulmonar;
- em tecido hepático, diminuiu os níveis de RNAm de colágeno tipo I, pró-colágeno tipo IV, TGF $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA, ET-1 e HO-1;
- reduziu a expressão proteica de ED-1 no tecido pulmonar, indicando redução do recrutamento de macrófagos intravasculares pulmonares;
- reduziu a ativação do fator de transcrição NF $\kappa$ B no extrato nuclear de tecido pulmonar.

A partir dos resultados obtidos, verificamos que o flavonoide quercetina mostrou efeito secundário de melhora da condição pulmonar por reduzir significativamente o dano hepático causado pela cirrose biliar. Visto que os problemas pulmonares são decorrentes do problema hepático, nossas conclusões tornam-se pertinentes, considerando a quercetina como agente terapêutico promissor nessa doença. O fato estimula-nos a maiores investigações, visto que, além de suas propriedades antioxidante e antiinflamatória, ela não exerce efeito genotóxico e mutagênico sobre os tecidos estudados.

**PERSPECTIVAS FUTURAS**

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Por essas evidências, 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 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 desse flavonoide em níveis moleculares, e aperfeiçoar a forma de administração, na tentativa de aproximar cada vez mais nossos estudos da realidade clínica.

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

(2007b) AVMA updates its euthanasia guidelines. *Veterinary Records [S.I.]*, 161, 502-502.

ABDEL-AZIZ, G., LEBEAU, G., RESCAN, P. Y., CLEMENT, B., RISSEL, M., DEUGNIER, Y., CAMPION, J. P. & GUILLOUZO, A. (1990) Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat. *Am J Pathol*, 137, 1333-42.

ABOUSSOUAN, L. S. & STOLLER, J. K. (2000) The hepatopulmonary syndrome. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 14, 1033-48.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, A. (2007a) AVMA releases updated euthanasia guidelines. *JAVMA - Journal of the American Veterinary Medical Association [S.I.]*, 231, 827-827.

AMES, B. N. (2001) DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat Res*, 475, 7-20.

ANDERSEN, B. L., GORDON, L. & BUSE, M. G. (1982) Intrapulmonary shunting associated with cirrhosis: incidental diagnosis by perfusion lung scan. *Clin Nucl Med*, 7, 108-10.

ANDERSON, D., YU, T. W., PHILLIPS, B. J. & SCHMEZER, P. (1994) The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat Res*, 307, 261-71.

ARGUEDAS, M. R., ABRAMS, G. A., KROWKA, M. J. & FALLON, M. B. (2003) Prospective evaluation of outcomes and predictors of mortality in patients with hepatopulmonary syndrome undergoing liver transplantation. *Hepatology*, 37, 192-7.

- BARP, J., ARAUJO, A. S., FERNANDES, T. R., RIGATTO, K. V., LLESUY, S., BELLO-KLEIN, A. & SINGAL, P. (2002) Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Braz J Med Biol Res*, 35, 1075-81.
- BATALLER, R. & BRENNER, D. A. (2005) Liver fibrosis. *J Clin Invest*, 115, 209-18.
- BATTISTINI, B., CHAILLER, P., D'ORLEANS-JUSTE, P., BRIERE, N. & SIROIS, P. (1993) Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides*, 14, 385-99.
- BERTHELOT, P., WALKER, J. G., SHERLOCK, S. & REID, L. (1966) Arterial changes in the lungs in cirrhosis of the liver--lung spider nevi. *N Engl J Med*, 274, 291-8.
- BITENCOUTT, P. (2007) Metabolismo do Ácido Araquidômico na Sepse. IN MANOLE (Ed.) *Sepse*. São Paulo.
- BOEIRA, J. M., VIANA, A. F., PICADA, J. N. & HENRIQUES, J. A. (2002) Genotoxic and recombinogenic activities of the two beta-carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*, 500, 39-48.
- BORKHAM-KAMPHORST, E., HERRMANN, J., STOLL, D., TREPTAU, J., GRESSNER, A. M. & WEISKIRCHEN, R. (2004) Dominant-negative soluble PDGF-beta receptor inhibits hepatic stellate cell activation and attenuates liver fibrosis. *Lab Invest*, 84, 766-77.
- BORS, W. & SARAN, M. (1987) Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radic Res Commun*, 2, 289-94.
- BOVERIS, A. & CHANCE, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*, 134, 707-16.
- BOVERIS, A., FRAGA, C. G., VARSAVSKY, A. I. & KOCH, O. R. (1983) Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch Biochem Biophys*, 227, 534-41.
- BOVERIS, A., VALDEZ, L. B., ZAOBORNÝ, T. & BUSTAMANTE, J. (2006) Mitochondrial metabolic states regulate nitric oxide and hydrogen peroxide diffusion to the cytosol. *Biochim Biophys Acta*, 1757, 535-42.
- BRANDÃO, A. B. & MARRONI, C. A. (2001) Testes de Função Hepática. IN MATTOS, A. A. & DANTAS, W. (Eds.) *Compêndio de Hepatologia*. São Paulo, Fundação BYK.

- BRENDEL, M. & HENRIQUES, J. A. (2001) The pso mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. *Mutat Res*, 489, 79-96.
- BRENNAN, R. J. & SCHIESTL, R. H. (1998) Free radicals generated in yeast by the Salmonella test-negative carcinogens benzene, urethane, thiourea and auramine O. *Mutat Res*, 403, 65-73.
- BRITTON, R. S. & BACON, B. R. (1994) Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepatogastroenterology*, 41, 343-8.
- BROZMANOVA, J., DUDAS, A. & HENRIQUES, J. A. (2001) Repair of oxidative DNA damage--an important factor reducing cancer risk. Minireview. *Neoplasma*, 48, 85-93.
- BUEGE, J. A. & AUST, S. D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52, 302-10.
- CAMPBELL, M. (2000) *Bioquímica*, Porto Alegre, Artes Médicas Sul.
- CARLONI, V., DEFRANCO, R. M., CALIGIURI, A., GENTILINI, A., SCIAMMETTA, S. C., BALDI, E., LOTTINI, B., GENTILINI, P. & PINZANI, M. (2002) Cell adhesion regulates platelet-derived growth factor-induced MAP kinase and PI-3 kinase activation in stellate cells. *Hepatology*, 36, 582-91.
- CARTER, E. P., HARTSFIELD, C. L., MIYAZONO, M., JAKKULA, M., MORRIS, K. G., JR. & MCMURTRY, I. F. (2002) Regulation of heme oxygenase-1 by nitric oxide during hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283, L346-53.
- CHABOT, F., MESTIRI, H., SABRY, S., DALL'AVA-SANTUCCI, J., LOCKHART, A. & DINH-XUAN, A. T. (1996) Role of NO in the pulmonary artery hyporeactivity to phenylephrine in experimental biliary cirrhosis. *Eur Respir J*, 9, 560-4.
- CHANCE, B., SIES, H. & BOVERIS, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59, 527-605.
- CHANG, S. W. & OHARA, N. (1993) Increased pulmonary vascular permeability in rats with biliary cirrhosis: role of thromboxane A2. *Am J Physiol*, 264, L245-52.
- CHAUDIERE, J. & FERRARI-ILIOU, R. (1999) Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol*, 37, 949-62.

- CHEN, Y. C., GINES, P., YANG, J., SUMMER, S. N., FALK, S., RUSSELL, N. S. & SCHRIER, R. W. (2004) Increased vascular heme oxygenase-1 expression contributes to arterial vasodilation in experimental cirrhosis in rats. *Hepatology*, 39, 1075-87.
- CHIESA, A., CIAPPI, G., BALBI, L. & CHIANDUSSI, L. (1969) Role of various causes of arterial desaturation in liver cirrhosis. *Clin Sci*, 37, 803-14.
- CHO, J. J., HOCHER, B., HERBST, H., JIA, J. D., RUEHL, M., HAHN, E. G., RIECKEN, E. O. & SCHUPPAN, D. (2000) An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology*, 118, 1169-78.
- DA SILVA, J., HERRMANN, S. M., HEUSER, V., PERES, W., POSSA MARRONI, N., GONZALEZ-GALLEGO, J. & ERDTMANN, B. (2002) Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol*, 40, 941-7.
- DAL PALU, C., DONAGGIO, G., DAL ZOTTO, I. & PESSINA, A. C. (1968) Arteriovenous shunts in cirrhotic patients studied with human serum albumin macroaggregates tagged with I-131 (MAA131-I). *Scand J Gastroenterol*, 3, 425-31.
- DE FLORA, S. (1988) Problems and prospects in antimutagenesis and anticarcinogenesis. *Mutat Res*, 202, 279-83.
- DE FLORA, S. & RAMEL, C. (1988) Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. *Mutat Res*, 202, 285-306.
- DEARFIELD, K. L., CIMINO, M. C., MCCARROLL, N. E., MAUER, I. & VALCOVIC, L. R. (2002) Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutat Res*, 521, 121-35.
- DIAS, A. S., PORAWSKI, M., ALONSO, M., MARRONI, N., COLLADO, P. S. & GONZALEZ-GALLEGO, J. (2005a) Quercetin Decreases Oxidative Stress, NF- $\kappa$ B Activation, and iNOS Overexpression in Liver of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Nutr*, 135, 2299-304.
- DOOLEY, S., HAMZAVI, J., BREITKOPF, K., WIERCINSKA, E., SAID, H. M., LORENZEN, J., TEN DIJKE, P. & GRESSNER, A. M. (2003) Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology*, 125, 178-91.
- DRÖGE, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82, 47-95.



- DUTHIE, S. J., COLLINS, A. R., DUTHIE, G. G. & DOBSON, V. L. (1997) Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. *Mutat Res*, 393, 223-31.
- EDENHARDER, R. & GRUNHAGE, D. (2003) Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat Res*, 540, 1-18.
- EDENHARDER, R., WORF-WANDELBURG, A., DECKER, M. & PLATT, K. L. (1999) Antimutagenic effects and possible mechanisms of action of vitamins and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food. *Mutat Res*, 444, 235-48.
- ERDEN INAL, M., KAHRAMAN, A. & KOKEN, T. (2001) Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. *Clin Exp Dermatol*, 26, 536-9.
- ERIKSSON, L. S. (1990) Hypoxemia in patients with liver cirrhosis. *Acta Gastroenterol Belg*, 53, 209-15.
- ESREFOGLU, M., GUL, M., EMRE, M. H., POLAT, A. & SELIMOGLU, M. A. (2005) Protective effect of low dose of melatonin against cholestatic oxidative stress after common bile duct ligation in rats. *World J Gastroenterol*, 11, 1951-6.
- ESSANI, N. A., FISHER, M. A. & JAESCHKE, H. (1997) Inhibition of NF-kappa B activation by dimethyl sulfoxide correlates with suppression of TNF-alpha formation, reduced ICAM-1 gene transcription, and protection against endotoxin-induced liver injury. *Shock*, 7, 90-6.
- FAIRBAIRN, D. W., OLIVE, P. L. & O'NEILL, K. L. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*, 339, 37-59.
- FALCHUK, K. R., FISKE, S. C., HAGGITT, R. C., FEDERMAN, M. & TREY, C. (1980) Pericentral hepatic fibrosis and intracellular hyalin in diabetes mellitus. *Gastroenterology*, 78, 535-41.
- FALLON, M. B. (2005) Mechanisms of pulmonary vascular complications of liver disease: hepatopulmonary syndrome. *J Clin Gastroenterol*, 39, S138-42.
- FALLON, M. B. (2006) Hepatopulmonary syndrome: more than just a matter of tone? *Hepatology*, 43, 912-4.

- FALLON, M. B. & ABRAMS, G. A. (2000) Pulmonary dysfunction in chronic liver disease. *Hepatology*, 32, 859-65.
- FALLON, M. B., ABRAMS, G. A., MCGRATH, J. W., HOU, Z. & LUO, B. (1997) Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol*, 272, G779-84.
- FARBER, J. L., KYLE, M. E. & COLEMAN, J. B. (1990) Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest*, 62, 670-9.
- FERGUSON, L. R. (2001) Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res*, 475, 89-111.
- FERNANDES, A. & MIES, S. (1998) Hipertensão Portal. IN ROBE (Ed.) *Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia*. São Paulo, Silva, OC; Zucoloto S.
- FERNANDO, B., MARLEY, R., HOLT, S., ANAND, R., HARRY, D., SANDERSON, P., SMITH, R., HAMILTON, G. & MOORE, K. (1998) N-acetylcysteine prevents development of the hyperdynamic circulation in the portal hypertensive rat. *Hepatology*, 28, 689-94.
- FORESTIER, M., SOLIOZ, M., ISBEKI, F., TALOS, C., REICHEN, J. & KRAHENBUHL, S. (1997) Hepatic mitochondrial proliferation in rats with secondary biliary cirrhosis: time course and mechanisms. *Hepatology*, 26, 386-91.
- FORMICA, J. V. & REGELSON, W. (1995) Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*, 33, 1061-80.
- FRIEDMAN, S. L. (2004) Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 1, 98-105.
- FUHRMANN, V., MADL, C., MUELLER, C., HOLZINGER, U., KITZBERGER, R., FUNK, G. C. & SCHENK, P. (2006) Hepatopulmonary syndrome in patients with hypoxic hepatitis. *Gastroenterology*, 131, 69-75.
- GABOR, M. (1988) Szent-Gyorgyi and the bioflavonoids: new results and perspectives of pharmacological research into benzo-pyrone derivatives. Commemoration on the 50th anniversary of the award of the Nobel Prize. *Prog Clin Biol Res*, 280, 1-15.
- GAINES, D. I. & FALLON, M. B. (2004) Hepatopulmonary syndrome. *Liver Int*, 24, 397-401.

- GALLOIS, C., HABIB, A., TAO, J., MOULIN, S., MACLOUF, J., MALLAT, A. & LOTERSZTAJN, S. (1998) Role of NF-kappaB in the antiproliferative effect of endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha in human hepatic stellate cells. Involvement of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 273, 23183-90.
- GARCIA-MEDIAVILLA, V., CRESPO, I., COLLADO, P. S., ESTELLER, A., SANCHEZ-CAMPOS, S., TUNON, M. J. & GONZALEZ-GALLEGO, J. (2007) The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol*, 557, 221-9.
- GATE, L., PAUL, J., BA, G. N., TEW, K. D. & TAPIERO, H. (1999) Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother*, 53, 169-80.
- GAWRIEH, S., PAPOUCHADO, B. G., BURGART, L. J., KOBAYASHI, S., CHARLTON, M. R. & GORES, G. J. (2005) Early hepatic stellate cell activation predicts severe hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl*, 11, 1207-13.
- GOLDIN, J. R. & RAYMUNDO, M. M. (1997) Pesquisa em saúde e direitos dos animais. *HCPA*, 2ª ed.
- GRANGER, D. L., ANSTEY, N. M., MILLER, W. C. & WEINBERG, J. B. (1999) Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol*, 301, 49-61.
- GRESSNER, A. M. & WEISKIRCHEN, R. (2006) Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med*, 10, 76-99.
- GROSS, S. S. & WOLIN, M. S. (1995) Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol*, 57, 737-69.
- GUIMARAES, E. L., FRANCESCHI, M. F., GRIVICICH, I., DAL-PIZZOL, F., MOREIRA, J. C., GUARAGNA, R. M., BOROJEVIC, R., MARGIS, R. & GUMA, F. C. (2006) Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. *Liver Int*, 26, 477-85.
- HALLIWELL, B. (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344, 721-4.
- HALLIWELL, B. (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*, 31, 261-72.

- HALLIWELL, B. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*, 141, 312-22.
- HALLIWELL, B. (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 35, 1147-50.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett*, 307, 108-12.
- HALPERN, B. N. & PACAUD, A. (1951) [Technique of obtaining blood samples from small laboratory animals by puncture of ophthalmic plexus.]. *C R Seances Soc Biol Fil*, 145, 1465-6.
- HARRIS, E. D. (1992) Regulation of antioxidant enzymes. *Faseb J*, 6, 2675-83.
- HAVSTEEN, B. (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*, 32, 1141-8.
- HEO, M. Y., SOHN, S. J. & AU, W. W. (2001) Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutat Res*, 488, 135-50.
- HERTOG, M. G. & HOLLMAN, P. C. (1996) Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur J Clin Nutr*, 50, 63-71.
- HODGSON, E. K. & FRIDOVICH, I. (1975) The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation. *Biochemistry*, 14, 5299-303.
- HUI, A. & FRIEDMAN, S. (2003) Molecular basis of hepatic fibrosis. *Expert Rev Mol Med*, 5, 1-23.
- HUNT, D. R. (1980) The identification of risk factors and their application to the management of obstructive jaundice. *Aust N Z J Surg*, 50, 476-80.
- HWANG, E. & KIM, G. (2007) Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology*, 229, 1-10.
- KAREKAR, V., JOSHI, S. & SHINDE, S. L. (2000) Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res*, 468, 183-94.

- KAUR, I. P. & SAINI, A. (2000) Sesamol exhibits antimutagenic activity against oxygen species mediated mutagenicity. *Mutat Res*, 470, 71-6.
- KAWADA, N., SEKI, S., INOUE, M. & KUROKI, T. (1998) Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology*, 27, 1265-74.
- KENNEDY, T. C. & KNUDSON, R. J. (1977) Exercise-aggravated hypoxemia and orthodeoxia in cirrhosis. *Chest*, 72, 305-9.
- KINANE, T. B. & WESTRA, S. J. (2004) Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 31-2004. A four-year-old boy with hypoxemia. *N Engl J Med*, 351, 1667-75.
- KOUNTOURAS, J., BILLING, B. H. & SCHEUER, P. J. (1984) Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol*, 65, 305-11.
- KOZLOV, A. B., OSTRACHOVITCH, E. A. & AFANAS'EV, I. B. (1994) Mechanism of inhibitory effects of chelating drugs on lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Biochem Pharmacol*, 47, 795-9.
- KRINSKY, N. I. (1989) Carotenoids as chemopreventive agents. *Prev Med*, 18, 592-602.
- KURIHARA, Y., KURIHARA, H., SUZUKI, H., KODAMA, T., MAEMURA, K., NAGAI, R., ODA, H., KUWAKI, T., CAO, W. H., KAMADA, N. & ET AL. (1994) Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature*, 368, 703-10.
- LAEMMLI, U. K., MOLBERT, E., SHOWE, M. & KELLENBERGER, E. (1970) Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Mol Biol*, 49, 99-113.
- LANDVIK, S. (2004) Vitamin E from supplements has good bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 80, 784-5; author reply 785-6.
- LAVAL, J., JURADO, J., SAPARBAEV, M. & SIDORKINA, O. (1998) Antimutagenic role of base-excision repair enzymes upon free radical-induced DNA damage. *Mutat Res*, 402, 93-102.

- LAVROVSKY, Y., SONG, C. S., CHATTERJEE, B. & ROY, A. K. (2000) Age-dependent increase of heme oxygenase-1 gene expression in the liver mediated by NFkappaB. *Mech Ageing Dev*, 114, 49-60.
- LEE, K. N., YOON, S. K., LEE, J. W., KIM, K. N., PARK, B. H., KWAK, J. Y., JEONG, J. S. & KIM, Y. H. (2004) Hepatopulmonary syndrome induced by common bile duct ligation in a rabbit model: correlation between pulmonary vascular dilatation on thin-section CT and angiography and serum nitrite concentration or endothelial nitric oxide synthase (eNOS)1 expression. *Korean J Radiol*, 5, 149-56.
- LEE, S. S. (1989) Cardiac abnormalities in liver cirrhosis. *West J Med*, 151, 530-5.
- LIAUDET, L., SORIANO, F. G. & SZABO, C. (2000) Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med*, 28, N37-52.
- LIMA, B., MARTINELLI, A. & FRANCA, A. V. (2004) [Hepatopulmonary syndrome: pathogenesis, diagnosis and treatment]. *Arq Gastroenterol*, 41, 250-8.
- LING, Y., ZHANG, J., LUO, B., SONG, D., LIU, L., TANG, L., STOCKARD, C. R., GRIZZLE, W. E., KU, D. D. & FALLON, M. B. (2004) The role of endothelin-1 and the endothelin B receptor in the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome in the rat. *Hepatology*, 39, 1593-602.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LOHMAN, P. H., GENTILE, J. M., GENTILE, G. & FERGUSON, L. R. (2001) Antimutagenesis/anticarcinogenesis 2001: screening, methods and biomarkers. *Mutat Res*, 496, 1-4.
- LONGO, V. D., GRALLA, E. B. & VALENTINE, J. S. (1996) Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J Biol Chem*, 271, 12275-80.
- MACGREGOR, J. T., CASCIANO, D. & MULLER, L. (2000) Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutat Res*, 455, 3-20.
- MACGREGOR, J. T., HEDDLE, J. A., HITE, M., MARGOLIN, B. H., RAMEL, C., SALAMONE, M. F., TICE, R. R. & WILD, D. (1987) Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res*, 189, 103-12.

- MAJANO, P., LARA-PEZZI, E., LOPEZ-CABRERA, M., APOLINARIO, A., MORENO-OTERO, R. & GARCIA-MONZON, C. (2001) Hepatitis B virus X protein transactivates inducible nitric oxide synthase gene promoter through the proximal nuclear factor kappaB-binding site: evidence that cytoplasmic location of X protein is essential for gene transactivation. *Hepatology*, 34, 1218-24.
- MARIS, A. F., ASSUMPCAO, A. L., BONATTO, D., BRENDEL, M. & HENRIQUES, J. A. (2001) 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*, 39, 137-49.
- MARIS, A. F., KERN, A. L., PICADA, J. N., BOCCARDI, F., BRENDEL, M. & HENRIQUES, J. A. (2000) Glutathione, but not transcription factor Yap1, is required for carbon source-dependent resistance to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 37, 175-82.
- MARON, D. M. & AMES, B. N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res*, 113, 173-215.
- MARTINEZ-FLOREZ, S., GUTIERREZ-FERNANDEZ, B., SANCHEZ-CAMPOS, S., GONZALEZ-GALLEGO, J. & TUNON, M. J. (2005) Quercetin attenuates nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide production in interleukin-1beta-activated rat hepatocytes. *J Nutr*, 135, 1359-65.
- MARTINEZ, A., URIOS, A. & BLANCO, M. (2000) Mutagenicity of 80 chemicals in *Escherichia coli* tester strains IC203, deficient in OxyR, and its oxyR(+) parent WP2 uvrA/pKM101: detection of 31 oxidative mutagens. *Mutat Res*, 467, 41-53.
- MATSUMOTO, A., OGURA, K., HIRATA, Y., KAKOKI, M., WATANABE, F., TAKENAKA, K., SHIRATORI, Y., MOMOMURA, S. & OMATA, M. (1995) Increased nitric oxide in the exhaled air of patients with decompensated liver cirrhosis. *Ann Intern Med*, 123, 110-3.
- MAVOURNIN, K. H., BLAKEY, D. H., CIMINO, M. C., SALAMONE, M. F. & HEDDLE, J. A. (1990) The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res*, 239, 29-80.
- MAXWELL, S. R. (1995) Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, 49, 345-61.
- MENEGHINI, R. A. (1987) Toxicidade do Oxigênio. *Ciência Hoje*. 28 ed.

- MINNUNNI, M., WOLLEB, U., MUELLER, O., PFEIFER, A. & AESCHBACHER, H. U. (1992) Natural antioxidants as inhibitors of oxygen species induced mutagenicity. *Mutat Res*, 269, 193-200.
- MISRA, H. P. & FRIDOVICH, I. (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 247, 3170-5.
- MONTERO, E. F., QUIREZE, C., JR. & D'OLIVEIRA, D. M. (2005) Bile duct exclusion from selective vascular inflow occlusion in rat liver: role of ischemic preconditioning and N-acetylcysteine on hepatic reperfusion injury. *Transplant Proc*, 37, 425-7.
- MOREIRA, A. J., FRAGA, C., ALONSO, M., COLLADO, P. S., ZETLLER, C., MARRONI, C., MARRONI, N. & GONZALEZ-GALLEGO, J. (2004) Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol*, 68, 1939-46.
- MOREIRA, R. K. (2007) Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med*, 131, 1728-34.
- MORTELMANS, K. & ZEIGER, E. (2000) The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res*, 455, 29-60.
- MOUSTACCHI, E. (2000) DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutat Res*, 464, 35-40.
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-50.
- MURIEL, P., SUAREZ, O. R., GONZALEZ, P. & ZUNIGA, L. (1994) Protective effect of S-adenosyl-l-methionine on liver damage induced by biliary obstruction in rats: a histological, ultrastructural and biochemical approach. *J Hepatol*, 21, 95-102.
- MYERS, L., ADAMS, N., KIER, L., RAO, T. K., SHAW, B. & WILLIAMS, L. (1991) Microcomputer software for data management and a statistical analysis of the Ames/Salmonella test. IN KREWSKI, D. & FRANSKLIN, C. A. (Eds.) *Statistical in Toxicology*. New York, Gordon and Breach.
- NASCHITZ, J. E., SLOBODIN, G., LEWIS, R. J., ZUCKERMAN, E. & YESHURUN, D. (2000) Heart diseases affecting the liver and liver diseases affecting the heart. *Am Heart J*, 140, 111-20.



- NIJVELDT, R. J., VAN NOOD, E., VAN HOORN, D. E., BOELENS, P. G., VAN NORREN, K. & VAN LEEUWEN, P. A. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 74, 418-25.
- NUNES, H., LEBREC, D., MAZMANIAN, M., CAPRON, F., HELLER, J., TAZI, K. A., ZERBIB, E., DULMET, E., MOREAU, R., DINH-XUAN, A. T., SIMONNEAU, G. & HERVE, P. (2001) Role of nitric oxide in hepatopulmonary syndrome in cirrhotic rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 164, 879-85.
- OKTYABRSKY, O. & SMIRNOVA, G. (2007) Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry (Mosc)*, 72, 132-45.
- ORRENIUS, S., GOGVADZE, V. & ZHIVOTOVSKY, B. (2007) Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 143-83.
- OTTERBEIN, L. E., SOARES, M. P., YAMASHITA, K. & BACH, F. H. (2003) Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol*, 24, 449-55.
- PALMA, D. T. & FALLON, M. B. (2006) The hepatopulmonary syndrome. *J Hepatol*, 45, 617-25.
- PANOS, R. J. & BAKER, S. K. (1996) Mediators, cytokines, and growth factors in liver-lung interactions. *Clin Chest Med*, 17, 151-69.
- PAROLA, M., LEONARDUZZI, G., ROBINO, G., ALBANO, E., POLI, G. & DIANZANI, M. U. (1996) On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Radic Biol Med*, 20, 351-9.
- PASTOR, A., COLLADO, P. S., ALMAR, M. & GONZALEZ-GALLEGO, J. (1997) Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *J Hepatol*, 27, 363-70.
- PAVANATO, A., TUNON, M. J., SANCHEZ-CAMPOS, S., MARRONI, C. A., LLESUY, S., GONZALEZ-GALLEGO, J. & MARRONI, N. (2003) Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci*, 48, 824-9.
- PERES, W., TUNON, M. J., COLLADO, P. S., HERRMANN, S., MARRONI, N. & GONZALEZ-GALLEGO, J. (2000) The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol*, 33, 742-50.

- PERRELLA, M. A., EDELL, E. S., KROWKA, M. J., CORTESE, D. A. & BURNETT, J. C., JR. (1992) Endothelium-derived relaxing factor in pulmonary and renal circulations during hypoxia. *Am J Physiol*, 263, R45-50.
- PICADA, J. N., FLORES, D. G., ZETTLER, C. G., MARRONI, N. P., ROESLER, R. & HENRIQUES, J. A. (2003a) DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Brain Res Mol Brain Res*, 114, 80-5.
- PICADA, J. N., MARIS, A. F., CKLESS, K., SALVADOR, M., KHROMOV-BORISOV, N. N. & HENRIQUES, J. A. (2003b) Differential mutagenic, antimutagenic and cytotoxic responses induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in bacteria and yeast. *Mutat Res*, 539, 29-41.
- PLUMB, G. W., PRICE, K. R. & WILLIAMSON, G. (1999) Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea. *Redox Rep*, 4, 13-6.
- PRATICO, D. (2005) Antioxidants and endothelium protection. *Atherosclerosis*, 181, 215-24.
- PUNGARTNIK, C., PICADA, J., BRENDEL, M. & HENRIQUES, J. A. (2002) Further phenotypic characterization of pso mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with respect to DNA repair and response to oxidative stress. *Genet Mol Res*, 1, 79-89.
- RABILLER, A., NUNES, H., LEBREC, D., TAZI, K. A., WARTSKI, M., DULMET, E., LIBERT, J. M., MOUGEOT, C., MOREAU, R., MAZMANIAN, M., HUMBERT, M. & HERVE, P. (2002) Prevention of gram-negative translocation reduces the severity of hepatopulmonary syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 166, 514-7.
- REPETTO, M. G. & LLESUY, S. F. (2002) Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res*, 35, 523-34.
- RICE-EVANS, C. A. & MILLER, N. J. (1996) Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans*, 24, 790-5.
- ROBAK, J. & GRYGLEWSKI, R. J. (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol*, 37, 837-41.
- ROBAK, J. & GRYGLEWSKI, R. J. (1996) Bioactivity of flavonoids. *Pol J Pharmacol*, 48, 555-64.
- ROCKEY, D. C. (2003) Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology*, 37, 4-12.

- RODRÍGUEZ-ROISIN, R., KROWKA, M., HERVÉ, P. & FALLON, M. (2004) Pulmonary-Hepatic vascular Disorders (PHD). *Eur Respir J*, 24, 861-80.
- RODRIGUEZ-ROISIN, R. & KROWKA, M. J. (2008) Hepatopulmonary syndrome--a liver-induced lung vascular disorder. *N Engl J Med*, 358, 2378-87.
- RODRIGUEZ-ROISIN, R., ROCA, J., AGUSTI, A. G., MASTAI, R., WAGNER, P. D. & BOSCH, J. (1987) Gas exchange and pulmonary vascular reactivity in patients with liver cirrhosis. *Am Rev Respir Dis*, 135, 1085-92.
- ROJKIND, M. & PONCE-NOYOLA, P. (1982) The extracellular matrix of the liver. *Coll Relat Res*, 2, 151-75.
- ROLLA, G. (2004) Hepatopulmonary syndrome: role of nitric oxide and clinical aspects. *Dig Liver Dis*, 36, 303-8.
- ROLLA, G., BRUSSINO, L., COLAGRANDE, P., DUTTO, L., POLIZZI, S., SCAPPATICCI, E., BERGERONE, S., MORELLO, M., MARZANO, A., MARTINASSO, G., SALIZZONI, M. & BUCCA, C. (1997) Exhaled nitric oxide and oxygenation abnormalities in hepatic cirrhosis. *Hepatology*, 26, 842-7.
- ROSENKRANZ, H. (2002) A paradigm for determining the relevance of short-term assays: application to oxidative mutagenesis. *Mutat Res*, 508, 21-7.
- ROULOT, D., SEVCSIK, A. M., COSTE, T., STROSBURG, A. D. & MARULLO, S. (1999) Role of transforming growth factor beta type II receptor in hepatic fibrosis: studies of human chronic hepatitis C and experimental fibrosis in rats. *Hepatology*, 29, 1730-8.
- RUSSO, M. W., FIRPI, R. J., NELSON, D. R., SCHOONHOVEN, R., SHRESTHA, R. & FRIED, M. W. (2005) Early hepatic stellate cell activation is associated with advanced fibrosis after liver transplantation in recipients with hepatitis C. *Liver Transpl*, 11, 1235-41.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-91.
- SAKURAI, T. & MASAKI, T. (1991) [Endothelin receptors--an overview]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 36, 2381-8.
- SALTER, L., CLIFFORD, T., MORLEY, N., GOULD, D., CAMPBELL, S. & CURNOW, A. (2004) The use of comet assay data with a simple reaction mechanism to evaluate

the relative effectiveness of free radical scavenging by quercetin, epigallocatechin gallate and N-acetylcysteine in UV-irradiated MRC5 lung fibroblasts. *J Photochem Photobiol B*, 75, 57-61.

SALVEMINI, D., DOYLE, T. & CUZZOCREA, S. (2006) Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation. *Biochem Soc Trans*, 34, 965-70.

SANCHEZ-CAMPOS, S., LOPEZ-ACEBO, R., GONZALEZ, P., CULEBRAS, J. M., TUNON, M. J. & GONZALEZ-GALLEGU, J. (1998) Cholestasis and alterations of glutathione metabolism induced by tacrolimus (FK506) in the rat. *Transplantation*, 66, 84-8.

SANTIARD, D., RIBIERE, C., NORDMANN, R. & HOUEE-LEVIN, C. (1995) Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by free radicals derived from ethanol metabolism: a gamma radiolysis study. *Free Radic Biol Med*, 19, 121-7.

SANTOS, J. S. & ZUCOLOTO, S. (1998) Cirrose Biliar Secundária. IN SILVA, O. C. & ZUCOLOTO, S. (Eds.) *Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia*. São Paulo, Robe.

SAXENA, N. K., TITUS, M. A., DING, X., FLOYD, J., SRINIVASAN, S., SITARAMAN, S. V. & ANANIA, F. A. (2004) Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *Faseb J*, 18, 1612-4.

SCHATTENBERG, J. M., WANG, Y., SINGH, R., RIGOLI, R. M. & CZAJA, M. J. (2005) Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J Biol Chem*, 280, 9887-94.

SCHRAUFNAGEL, D. E. & KAY, J. M. (1996) Structural and pathologic changes in the lung vasculature in chronic liver disease. *Clin Chest Med*, 17, 1-15.

SHAO, R., YAN, W. & ROCKEY, D. C. (1999) Regulation of endothelin-1 synthesis by endothelin-converting enzyme-1 during wound healing. *J Biol Chem*, 274, 3228-34.

SHERLOCK, S. (1993) European livers. *Lancet*, 342, 1127-8.

SHUKLA, Y., ARORA, A. & TANEJA, P. (2002) Antimutagenic potential of curcumin on chromosomal aberrations in Wistar rats. *Mutat Res*, 515, 197-202.

SIES, H. (1991) Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr*, 69, 965-8.

- SILVA, A. & D'ALBUQUERQUE, L. (1986) *Hepatologia clínica e cirúrgica*, São Paulo, Sarvier.
- SINGH, N. P. (2000) Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat Res*, 455, 111-27.
- SOGNI, P., SMITH, A. P., GADANO, A., LEBREC, D. & HIGENBOTTAM, T. W. (1997) Induction of nitric oxide synthase II does not account for excess vascular nitric oxide production in experimental cirrhosis. *J Hepatol*, 26, 1120-7.
- SOUTHORN, P. A. & POWIS, G. (1988a) Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc*, 63, 381-9.
- SOUTHORN, P. A. & POWIS, G. (1988b) Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc*, 63, 390-408.
- SPEIT, G. & HARTMANN, A. (1999) The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol*, 113, 203-12.
- SQUADRITO, G. L. & PRYOR, W. A. (1995) The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide. *Chem Biol Interact*, 96, 203-6.
- SZTRYMF, B., RABILLER, A., NUNES, H., SAVALE, L., LEBREC, D., LE PAPE, A., DE MONTPREVILLE, V., MAZMANIAN, M., HUMBERT, M. & HERVE, P. (2004) Prevention of hepatopulmonary syndrome and hyperdynamic state by pentoxifylline in cirrhotic rats. *Eur Respir J*, 23, 752-8.
- TAMION, F., RICHARD, V., RENET, S. & THUILLEZ, C. (2006) Protective effects of heme-oxygenase expression against endotoxic shock: inhibition of tumor necrosis factor-alpha and augmentation of interleukin-10. *J Trauma*, 61, 1078-84.
- TANG, L., LUO, B., PATEL, R. P., LING, Y., ZHANG, J. & FALLON, M. B. (2007) Modulation of pulmonary endothelial endothelin B receptor expression and signaling: implications for experimental hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 292, L1467-72.
- THANNICKAL, V. J. & FANBURG, B. L. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279, L1005-28.
- TIANO, H. F., LOFTIN, C. D., AKUNDA, J., LEE, C. A., SPALDING, J., SESSOMS, A., DUNSON, D. B., ROGAN, E. G., MORHAM, S. G., SMART, R. C. &

- LANGENBACH, R. (2002) Deficiency of either cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 alters epidermal differentiation and reduces mouse skin tumorigenesis. *Cancer Res*, 62, 3395-401.
- TICE, R. R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J. C. & SASAKI, Y. F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 35, 206-21.
- TICE, R. R., FUREDI-MACHACEK, M., SATTERFIELD, D., UDUMUDI, A., VASQUEZ, M. & DUNNICK, J. K. (1998) Measurement of micronucleated erythrocytes and DNA damage during chronic ingestion of phenolphthalein in transgenic female mice heterozygous for the p53 gene. *Environ Mol Mutagen*, 31, 113-24.
- TIEPPO, J., CUEVAS, M. J., VERCELINO, R., TUNON, M. J., MARRONI, N. P. & GONZALEZ-GALLEGO, J. (2009) Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats. *J Nutr*, 139, 1339-46.
- TIEPPO, J., VERCELINO, R., DIAS, A. S., MARRONI, C. A. & MARRONI, N. (2005) [Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress]. *Arq Gastroenterol*, 42, 244-8.
- TIEPPO, J., VERCELINO, R., DIAS, A. S., SILVA VAZ, M. F., SILVEIRA, T. R., MARRONI, C. A., MARRONI, N. P., HENRIQUES, J. A. & PICADA, J. N. (2007) Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food Chem Toxicol*, 45, 1140-6.
- TITHERADGE, M. A. (1999) Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta*, 1411, 437-55.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.
- TREVISANI, F., COLANTONI, A., GERBES, A. L., GULBERG, V., SICA, G., CARACENI, P., DE NOTARIIS, S., MORSELLI-LABATE, A. M., LIGABUE, A., GASBARRINI, G. & BERNARDI, M. (1997) Daily profile of plasma endothelin-1 and -3 in pre-ascitic cirrhosis: relationships with the arterial pressure and renal function. *J Hepatol*, 26, 808-15.
- TUNON, M. J., SANCHEZ-CAMPOS, S., GUTIERREZ, B., CULEBRAS, J. M. & GONZALEZ-GALLEGO, J. (2003) Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, 66, 439-45.

- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M., MAZUR, M. & TELSER, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 44-84.
- VALLANCE, P. & MONCADA, S. (1991) Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet*, 337, 776-8.
- VAN ACKER, S. A., VAN DEN BERG, D. J., TROMP, M. N., GRIFFIOEN, D. H., VAN BENNEKOM, W. P., VAN DER VIJGH, W. J. & BAST, A. (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med*, 20, 331-42.
- VAN HOORN, D. E., NIJVELDT, R. J., VAN LEEUWEN, P. A., HOFMAN, Z., M'RABET, L., DE BONT, D. B. & VAN NORREN, K. (2002) Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Eur J Pharmacol*, 451, 111-8.
- VERCELINO, R., TIEPPO, J., DIAS, A. S., MARRONI, C. A., GARCIA, E., MEURER, L., PICADA, J. N. & MARRONI, N. P. (2008a) N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 102, 370-6.
- VERCELINO, R., TIEPPO, J., FORGIARINI JUNIOR, L. A., DIAS, A. S., MARRONI, C. A. & MARRONI, N. P. (2008b) [Experimental models for assessment of pulmonary alterations in hepatopulmonary syndrome]. *J Bras Pneumol*, 34, 453-60.
- VIDELA, L. A., RODRIGO, R., ORELLANA, M., FERNANDEZ, V., TAPIA, G., QUINONES, L., VARELA, N., CONTRERAS, J., LAZARTE, R., CSENDES, A., ROJAS, J., MALUENDA, F., BURDILES, P., DIAZ, J. C., SMOK, G., THIELEMANN, L. & PONIACHIK, J. (2004) Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin Sci (Lond)*, 106, 261-8.
- WATERS, M. D., STACK, H. F. & JACKSON, M. A. (1999) Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mutat Res*, 437, 21-49.
- WEISBURGER, J. H. (2001) Antimutagenesis and anticarcinogenesis, from the past to the future. *Mutat Res*, 480-481, 23-35.
- YAARI, A., SIKULER, E., KEYNAN, A. & BEN-ZVI, Z. (1992) Bromosulphophthalein disposition in chronically bile duct obstructed rats. *J Hepatol*, 15, 67-72.
- YANAGISAWA, M., INOUE, A., ISHIKAWA, T., KASUYA, Y., KIMURA, S., KUMAGAYE, S., NAKAJIMA, K., WATANABE, T. X., SAKAKIBARA, S., GOTO, K. & ET AL. (1988) Primary structure, synthesis, and biological activity of rat

endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 6964-7.

YOKOZAWA, T., DONG, E., OURA, H., KASHIWAGI, H., NONAKA, G. & NISHIOKA, I. (1997) Magnesium lithospermate B suppresses the increase of active oxygen in rats after subtotal nephrectomy. *Nephron*, 75, 88-93.

YOSHIJI, H., KURIYAMA, S., NOGUCHI, R., IKENAKA, Y., YOSHII, J., YANASE, K., NAMISAKI, T., KITADE, M., YAMAZAKI, M., ASADA, K., AKAHANE, T., TSUJIMOTO, T., UEMURA, M. & FUKUI, H. (2006) Amelioration of liver fibrogenesis by dual inhibition of PDGF and TGF-beta with a combination of imatinib mesylate and ACE inhibitor in rats. *Int J Mol Med*, 17, 899-904.

ZHANG, J., LING, Y., LUO, B., TANG, L., RYTER, S. W., STOCKARD, C. R., GRIZZLE, W. E. & FALLON, M. B. (2003) Analysis of pulmonary heme oxygenase-1 and nitric oxide synthase alterations in experimental hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology*, 125, 1441-51.

ZHANG, J., LING, Y., TANG, L., LUO, B., CHACKO, B. K., PATEL, R. P. & FALLON, M. B. (2007) Pentoxifylline attenuation of experimental hepatopulmonary syndrome. *J Appl Physiol*, 102, 949-55.

ZHANG, M., LUO, B., CHEN, S. J., ABRAMS, G. A. & FALLON, M. B. (1999) Endothelin-1 stimulation of endothelial nitric oxide synthase in the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol*, 277, G944-52.