

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

**O ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO NA HIPERTENSÃO PORTAL -  
AÇÃO DA QUERCETINA**

**Andrea Cristiane Janz Moreira**

**Orientadora  
Profª Drª Norma Anair Possa Marroni**

**Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas: Fisiologia para  
obtenção do Título de Mestre.**

**Porto Alegre, 2004**

*Este trabalho é dedicado*

***Aos meus pais e irmãs, pelo amor;***

***Ao Paulo, pela presença;***

***Ao Pedro, pelo novo sentido em minha vida;***

***À Prof. Norma, pelo exemplo;***

***E a DEUS, por ter me presenteado com todas essas pessoas.***

## AGRADECIMENTOS

À *Profa. Dra Norma Marroni*, pela dedicação incondicional à orientação deste trabalho, pela amizade demonstrada ao longo destes anos, pelo exemplo de educadora e pelo contagiante amor à pesquisa.

Ao *Prof. Dr. Cláudio Galleano Zettler*, pela análise anatomopatológica, fundamental para a credibilidade dos resultados obtidos.

À *Christina Fraga*, pela presença constante na execução deste trabalho, pelas várias horas de cirurgias, pelas idéias e sugestões sempre pertinentes e, acima de tudo, pela amizade.

Ao *Prof Javier Gallego Gonzalez e equipe*, pelo apoio científico.

À *Universidade Luterana do Brasil*, na pessoa do *Pró-Reitor Prof. Dr. Edmundo Kanan Marques*, pelo apoio dedicado à pesquisa e à qualificação de seus docentes.

À *Bióloga Inês Rodrigues* pelo conhecimento e presença constante no dia-a-dia do Laboratório.

À *Jaqueline Barp*, pelo conhecimento, presteza e disponibilidade na análise dos nitritos e nitratos.

Ao *peçoal do Laboratório 3 da UFRGS*, pelo convívio agradável, pela solidariedade e pelo carinho demonstrado ao longo deste período.

Aos *alunos do Curso de Fisioterapia da ULBRA*, por serem uma das minhas razões para buscar constante aperfeiçoamento.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1 SISTEMA VENOSO PORTAL.....	15
1.2 CIRROSE .....	16
1.3 SÍNDROME DA HIPERTENSÃO PORTAL (HP) .....	17
1.4 MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTENSÃO PORTAL .....	19
1.5. ÓXIDO NÍTRICO: MECANISMOS FISIOLÓGICOS E FISIOPATOLÓGICOS.....	20
1.6. RADICAIS LIVRES (RL) E ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO (EAO).....	25
1.7. DEFESAS ANTIOXIDANTES .....	29
1.7.1. <i>Defesas Antioxidantes Enzimáticas</i> .....	30
1.7.2. <i>Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas</i> .....	32
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>36</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	36
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1. ANIMAIS.....	37
3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	37
3.3. MARCAÇÃO E PESAGEM.....	38
3.4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	38
3.4.1. <i>Desenvolvimento do Modelo de Hipertensão Portal (HP) por Ligadura Parcial de Veia Porta (LPVP)</i> .....	38
3.4.2. <i>Administração da droga</i> .....	40
3.5. AFERIÇÃO DA PRESSÃO VENOSA PORTAL .....	40
3.6. COLETA DE SANGUE E TESTES DE FUNÇÃO HEPÁTICA.....	42
3.7. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS.....	42
3.7.1. <i>Sacrifício dos Animais</i> .....	42
3.7.2. <i>Preparo dos Homogeneizados</i> .....	43

3.8. AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA DOS TECIDOS .....	44
3.9. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	44
3.10. AVALIAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO) .....	44
3.10.1. <i>Determinação da Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)</i> .....	45
3.10.2. <i>Determinação da Quimiluminescência (QL)</i> .....	45
3.11. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	46
3.11.1. <i>Avaliação da Atividade da Catalase (CAT)</i> .....	46
3.11.2. <i>Avaliação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)</i> .....	47
3.12. DOSAGEM DE NITRITOS E NITRATOS .....	48
3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	49
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
4.1. EFEITOS DO FLAVONÓIDE QUERCETINA SOBRE A HIPERTENSÃO PORTAL PRÉ- HEPÁTICA INDUZIDA POR LIGADURA PARCIAL DE VEIA PORTA – ASPECTOS GERAIS E HEMODINÂMICOS. ....	50
4.1.1. <i>Alteração do parâmetro de peso corporal dos animais.</i> .....	50
4.1.2. <i>Alterações de parâmetros hemodinâmicos na hipertensão portal e a ação do flavonóide quercetina.</i> .....	51
4.1.3. <i>Testes de função hepática (TFH)</i> .....	54
4.1.4. <i>Análise anatomopatológica em animais com hipertensão portal induzida por ligadura parcial de veia Porta e a ação do flavonóide quercetina.</i> .....	56
4.2. EFEITOS DO FLAVONÓIDE QUERCETINA EM ANIMAIS COM HIPERTENSÃO PORTAL PRÉ-HEPÁTICA INDUZIDA POR LIGADURA PARCIAL DE VEIA PORTA SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO) EM ESTÔMAGO E NO TECIDO HEPÁTICO.....	63
4.2.1 <i>Determinação do dano oxidativo no estômago através dos produtos de reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quimiluminescência (QL) e o efeito do flavonóide quercetina.</i> .....	63
4.2.2 <i>Determinação do dano oxidativo no fígado através dos produtos de reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quimiluminescência (QL) e os efeitos do flavonóide quercetina.</i> .....	65
4.3. EFEITOS DO FLAVONÓIDE QUERCETINA EM ANIMAIS COM HIPERTENSÃO PORTAL SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA NO ESTÔMAGO E NO FÍGADO. ....	67
4.3.1. <i>Determinação da atividade da catalase e SOD no estômago</i> .....	67
4.3.2. <i>Determinação da atividade da catalase e SOD no fígado:</i> .....	69
4.4. EFEITOS DO FLAVONÓIDE QUERCETINA EM ANIMAIS COM HIPERTENSÃO PORTAL SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM ESTÔMAGO E NO FÍGADO. ....	71
4.4.1. <i>Determinação do NO por nitritos (NO<sub>2</sub>) e nitratos (NO<sub>3</sub>) em homogeneizado de estômago (NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub>).</i> .....	71
4.4.2. <i>Determinação do NO por nitritos (NO<sub>2</sub>) e nitratos ( NO<sub>3</sub>) em homogeneizado de fígado (relação NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub>)</i> .....	72
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>88</b>

## RESUMO

Este estudo foi realizado em ratos machos Wistar, nos quais foram investigados os efeitos do flavonóide quercetina sobre a hipertensão portal, o dano oxidativo, a atividade das enzimas antioxidantes, a produção de óxido nítrico avaliada por seus metabólitos: nitratos( $\text{NO}_3$ ) e nitritos ( $\text{NO}_2$ ) em fígado e estômago. Analisou-se ainda a histologia do fígado e do estômago através das técnicas de hematoxilina/eosina e picrossirius. Foram estabelecidos 4 grupos experimentais: **SO** (sham-operated)-controle, no qual foi simulada a ligadura parcial de veia porta (**LPVP**); **SO** administrado com quercetina (**Q**); grupo com ligadura parcial de veia porta (**LPVP**) e o grupo **LPVP Q** que foi ligado e recebe quercetina. A **Q** foi administrada por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 50 mg/Kg de peso corporal, 7 dias após a ligadura até ao 14º dia pós-operatório. No 15º dia, foi aferida a pressão portal (mmHg) constatando-se aumento significativo nos **LPVP** e diminuição significativa nos **LPVP Q**. Através da análise histológica dos tecidos hepáticos e do estômago, foi observado que, no estômago, os animais LPVP apresentaram sinais de edema e vasodilatação; enquanto que os LPVP Q mantiveram aspecto normal. Os resultados da lipoperoxidação (LPO), avaliada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quimiluminescência (QL), demonstraram redução próximo de 40% do grupo LPVP Q comparado com o grupo LPVP, sendo seus valores semelhantes aos valores dos SO, tanto no fígado como no estômago. Quanto às enzimas antioxidantes, foi observado, no estômago, aumento na atividade da Catalase (CAT) no grupo LPVP, enquanto que, no fígado, a atividade da SOD e CAT estão aumentadas no grupo LPVP Q. Na avaliação dos metabólitos do NO, observou-se que a relação nitratos e nitritos no estômago foi mais elevada nos LPVP, e que a quercetina diminuiu essa relação, apresentando valores semelhantes aos do grupo SO. No fígado, essa relação aumentou no grupo SO, sendo indiferenciada nos LPVP e LPVP Q. Esses resultados apontam que a Quercetina pode diminuir a pressão portal e, indiretamente, a circulação hiperdinâmica característica desse modelo experimental, reduzindo o dano oxidativo encontrado nos animais do grupo LPVP tanto no estômago como no fígado, incrementando a atividade das enzimas antioxidantes, protegendo-os. Assim, a partir dessas constatações, pode-se sugerir um efeito benéfico da quercetina neste protocolo experimental.

## ABSTRACT

The present study was designed to investigate the effects of quercetin on portal hypertension (PH) and oxidative stress, as well as the production of nitrite and nitrate levels as a marker of nitric oxide (NO) synthesis in liver and stomach. Male Wistar rats were divided in 4 groups: Sham-operated (SO); SO Q; PPVL and PPVL + quercetin (PPVL Q). PPVL: following anesthesia with ketamine and xylazine, the vein was isolated and partially ligated. A sham operation was performed using the same procedure, with the exception that no ligature was placed around the portal vein. PPVL Q were treated with quercetin administered by one-daily i.p. injection at a dose of 50mg/kg, from 8 days until day 14 post operation. In the day 15 portal pressure (PP) was measured. PP was significantly elevated in PPVL rats. However, PP decreased in PPVL Q. Histological analysis of stomach determined vasodilatation and edema in PPVL vs SO. In PPVL Q were demonstrated histopathological protection to stomach. Liver showed normal architecture in all groups. Lipoperoxidation (LP) levels were significantly reduced by the administration of quercetin in stomach and liver. Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in liver increased significantly in PPVL Q. The  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  levels in PPVL increased in stomach. The administration of quercetin to PPVL reduced  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  levels in stomach, such that  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  levels were similar to controls. These levels in liver were reduced in both PPVL and PPVL Q groups. We conclude that the formation of oxidative stress may be important in the pathogenesis of these hemodynamic changes. The treatment with quercetin prevents the development of portal hypertension and lipid peroxidation in the PPVL model.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>pag</b>
<b>Figura 1:</b> Biossíntese do NO.	22
<b>Figura 2:</b> Mediadores de inflamação, ligação ao receptor e produção de NO	24
<b>Figura 3:</b> O papel crítico do oxigênio na lesão celular. Estímulos que induzem a lesões através de EAO.	26
<b>Figura 4:</b> Esquema da redução do oxigênio em água, na respiração mitocondrial e a geração das EAO.	27
<b>Figura 5:</b> Esquema da interação entre as enzimas antioxidantes.	31
<b>Figura 6:</b> Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração.	33
<b>Figura 7:</b> Esquema da cirurgia experimental da LPVP.	39
<b>Figura 8:</b> Demonstração dos registros da pressão portal de animais SO, LPVP Q e LPVP.	41
<b>Figura 9:</b> Média da pressão portal por grupo.	52
<b>Figura 10:</b> Relação hepatossomática nos diferentes grupos.	53
<b>Figura 11:</b> Relação esplenossomática nos diferentes grupos.	54
<b>Figura 12:</b> Fotomicrografia de estômago nos grupos SO, LPVP, LPVP Q e SO Q.	56
<b>Figura 13:</b> Fotomicrografia de estômago nos grupos SO(A), LPVP (B) e LPVPQ (C).	56
<b>Figura 14:</b> Fotomicrografia do estômago de animal SO.	57
<b>Figura 15:</b> Fotomicrografia do estômago de animal LPVP.	57
<b>Figura 16:</b> Fotomicrografias do estômago de animais SO e LPVP.	58
<b>Figura 17:</b> Fotomicrografias do estômago de animais SO e LPVP Q, coloração hematoxilina eosina.	59
<b>Figura 18:</b> Fotomicrografias do estômago de animais LPVP e LPVP Q.	60
<b>Figura 19:</b> Fotomicrografias de fígado de animal controle (A) comparada aos grupos SO (B), LPVP (C) e LPVPQ (D).	61
<b>Figura 20:</b> Fotomicrografias de fígado de animal controle (A) comparada aos grupos SO (B) e LPVP (C).	62
<b>Figura 21:</b> Valores médios de TBARS em estômago.	64
<b>Figura 22:</b> Valores médios de QL em estômago.	64
<b>Figura 23:</b> Valores médios de TBARS no fígado.	66
<b>Figura 24:</b> Valores médios de QL no fígado.	66
<b>Figura 25:</b> Valores médios da atividade da CAT no estômago.	68
<b>Figura 26:</b> Valores médios da atividade da SOD no estômago.	68
<b>Figura 27:</b> Valores médios da atividade da CAT no fígado.	70

<b>Figura 28:</b> Valores médios da atividade da SOD no fígado.	70
<b>Figura 29:</b> Relação entre nitrato e nitrito em homogeneizado de estômago	71
<b>Figura 30:</b> Relação entre nitrato e nitrito em homogeneizado de fígado.	72

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA</b>	<b>pag</b>
<b>TABELA 01:</b> Valores médios (g) dos pesos iniciais e finais dos animais que não receberam quercetina.	50
<b>TABELA 02:</b> Valores médios (g) dos pesos iniciais e finais dos animais que receberam quercetina.	51
<b>TABELA 03:</b> Valores médios da pressão portal (mmHg) entre os grupos estudados.	51
<b>TABELA 04:</b> Valores médios da relação hepatossomática dos grupos estudados.	52
<b>TABELA 05:</b> Valores médios da relação esplenossomática dos grupos.	53
<b>TABELA 06:</b> Valores médios de AST entre os grupos.	54
<b>TABELA 07:</b> Valores médios de ALT entre os grupos.	55
<b>TABELA 08:</b> Valores médios de FA entre os grupos.	55
<b>TABELA 09:</b> Valores médios de TBARS nos diferentes grupos.	63
<b>TABELA 10:</b> Valores médios de QL nos diferentes grupos.	64
<b>TABELA 11:</b> Valores médios de TBARS de fígado nos diferentes grupos.	65
<b>TABELA 12:</b> Valores médios de QL do fígado nos diferentes grupos.	65
<b>TABELA 13:</b> Valores médios de CAT no estômago nos diferentes grupos.	67
<b>TABELA 14:</b> Valores médios da SOD no estômago nos diferentes grupos.	67
<b>TABELA 15:</b> Valores médios de CAT no fígado nos diferentes grupos.	69
<b>TABELA 16:</b> Valores médios da SOD no fígado nos diferentes grupos.	69
<b>TABELA 17:</b> Valores médios de NO <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub> no estômago nos diferentes grupos.	71
<b>TABELA 18:</b> Valores médios de NO <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub> dos grupos estudados.	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\mu$  - micro
- $\mu\text{m}$  – micrômetro
- $^1\text{O}_2$  – oxigênio *singlet*
- **Ah** – arteríola com hemácia
- **AKT ou PK B** – proteína quinase serina/ teorina
- **ALT** – alanino aminotransferase
- **AST** – aspartato aminotransferase
- **Bcl2** – membro da família de célula B, regula a sobrevivência da célula
- **Ca<sup>++</sup>** - íon cálcio
- **CAT** – catalase
- **CCl<sub>4</sub>** – tetracloreto de carbono
- **cNOS** – óxido nítrico sintetase constitutiva
- **COX-2** – cicloxigenase-2
- **cps** – contagens por segundo
- **CuSO<sub>4</sub>** – sulfato de cobre
- **DNA** – ácido desoxirribonucléico
- **EAO** – espécies ativas de oxigênio
- **EDRF** – fator de relaxamento derivado do endotélio
- **eNOS** - óxido nítrico sintase endotelial
- **FA** – fosfatase alcalina
- **g** – grama
- **G** – região glandular do estômago
- **GSH** – glutatona reduzida
- **GPx** – glutatona peroxidase
- **GS-Rd** – glutatona redutase
- **GSSG** – glutatona oxidada
- **GST** – glutatona transferase
- **H<sup>+</sup>** - íon hidrogênio
- **H<sub>2</sub>O** – água
- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – peróxido de hidrogênio
- **HP** – hipertensão portal
- **HSP90** – proteína de choque térmico
- **iNOS** - óxido nítrico sintase induzida
- **KCl** – Cloreto de potássio

- **Kg** – quilograma
- **L-NAME** – N nitro-L-arginina metil éster
- **L-NMMA** – monometil L-arginina
- **LPO** – lipoperoxidação
- **LPS** – lipopolissacarídeos
- **LPVP** – ligadura parcial de veia porta
- **LPVP Q** – animais com ligadura parcial da veia porta que recebem quercetina
- **MDA** – malondialdeído
- **mg** – miligrama
- **mL** – mililitros
- **MM** – muscular da mucosa
- **mmHg** – milímetro de mercúrio
- **mRNA** – ácido ribonucléico mensageiro
- **n** – nano
- **N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** – trióxido de dinitrogênio
- **Na<sup>+</sup>** - íon sódio
- **NAC** – N-acetilcisteína
- **NADPH** – fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo
- **NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** – fosfato de sódio monobásico
- **NaHCO<sub>3</sub>** – bicarbonato de sódio
- **NaOH** – hidróxido de sódio
- **nNOs** - óxido nítrico sintase neuronal
- **NO** – óxido nítrico
- **NO<sub>2</sub>** – dióxido de nitrogênio
- **NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** - nitrito
- **NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** - nitrato
- **NOS** – óxido nítrico sintase
- **ns** – não-significativo
- **O<sub>2</sub>** – oxigênio
- **O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - radical superóxido
- **°C** – graus Celsius
- **OCI<sup>-</sup>** - ânion hipoclorito
- **OH** – hidroxilas
- **<sup>-</sup>OH** – radical hidroxila
- **ONOO<sup>-</sup>** - peróxido nitrito
- **p** – pico
- **TFH** – testes de função hepática
- **PGE<sub>2</sub>** – prostaglandinas E<sub>2</sub>
- **pH** – potencial de hidrogênio
- **PI3K** – fosfatidilinositol 3 OH quinase
- **Q** – quercetina
- **QL** – quimiluminescência
- **RL** – radicais livres
- **ROO** – radical peroxil
- **rpm** – rotações por minuto
- **SM** – submucosa
- **SO** – *sham operated* ou simulação da cirurgia

- **SO Q** – simulação da cirurgia que recebe quercetina
- **SOD** – superóxido dismutase
- **TBA** – ácido tiobarbitúrico
- **TBARS** – substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
- **t-BOOH** – hidroperóxido de tert-butil
- **TCA** – ácido tricloroacético
- **U/g** – unidade por grama
- **U/L** – unidade por litro
- **V** – vaso
- **Ve** – vênula com sangue hemolisado

## INTRODUÇÃO

A hipertensão portal (HP) é caracterizada pelo aumento na resistência vascular, que provoca aumento na pressão portal e favorece o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica (BOSCH, 1991).

As alterações hemodinâmicas presentes na hipertensão portal (HP) seriam decorrentes do excesso de óxido nítrico (NO) na região esplâncnica. A presença da circulação hiperdinâmica e das alterações hemodinâmicas poderia determinar o aumento da geração de espécies ativas de oxigênio (EAO) na mucosa gástrica e, no tecido hepático, acredita-se que deverá existir uma forma de adaptação enzimática para minimizar as espécies ativas de oxigênio (EAO), visto que nesse tecido não são observados danos decorrentes da síndrome de hipertensão pré-hepática.

Com base no fato de que as EAO estarão aumentadas na hipertensão portal, a administração de um antioxidante de origem vegetal, um flavonóide como a quercetina poderia interferir no dano oxidativo.

Pretende-se, neste estudo, avaliar a atividade antioxidante do flavonóide quercetina em modelo de ligadura parcial de veia porta (LPVP), verificar a participação do NO na mucosa gástrica de ratos com hipertensão portal (HP) e tratados com quercetina, além de verificar a ação sobre a pressão portal, sobre os testes de função hepática e os aspectos anatomopatológicos de tecido do estômago.

## 1.1 SISTEMA VENOSO PORTAL

O sistema venoso portal compreende os vasos venosos da região abdominal e está intimamente ligado ao trato gastrointestinal, região esplâncnica e pancreática. A veia porta entra no fígado por dois principais ramos, localizados um em cada lóbulo. Esse vaso é formado a partir da união da veia mesentérica superior com a veia esplênica (ARIAS et al., 1994).

A veia mesentérica superior é formada a partir dos vasos capilares do cólon D, do intestino delgado, da cabeça do pâncreas e pela veia gastroepiplóica direita. A veia esplênica origina-se na polpa esplênica, recebe os vasos curtos gástricos e a veia mesentérica inferior, responsável pelo fluxo sanguíneo do cólon e do reto, antes de unir-se à veia mesentérica superior para formar a veia porta (WILKINS et al., 1990).

A veia porta pode ser considerada como um ponto convergente dos vasos venosos da região abdominal e esplâncnica, dirigindo-se para o fígado. Ela contribui com 2/3 do fluxo sanguíneo hepático e o 1/3 restante procede da artéria hepática. Apresenta um fluxo próximo de 1000-1200 ml/min e mantém uma pressão de 7mmHg, no homem adulto (SHERLOCK et al., 2002).

Em função de ser um conjunto de várias veias que se anastomosam em um mesmo local, sempre que houver uma obstrução na circulação portal ocorrerá aumento da pressão e, possivelmente, desenvolvimento de colaterais que contornarão o local obstruído no fígado, enviando o sangue para a circulação sistêmica. A obstrução da circulação pode ser pré, intra ou pós-hepática (BOSCH, 1991).

Na obstrução pré-hepática ocorre um prejuízo na capacidade regenerativa do fígado e redução de seu tamanho, sem alterar sua consistência. A redução ocorre devido à queda dos fatores hepatotróficos (insulina e glucagon), que são originados no pâncreas. Contudo, os níveis séricos das aminotranferases e fosfatase alcalina apresentam-se normais ( WILKINS et al., 1990; SHERLOCK et al., 2002).

Outras alterações provocadas pela obstrução pré-hepática são esplenomegalia, dilatação dos vasos esplâncnicos e hipertensão portal com ou sem desenvolvimento da circulação hiperdinâmica. Esta última alteração é dependente do tempo de duração da hipertensão portal. O exemplo clínico é o da trombose da veia porta.

Sobre a obstrução da circulação intra-hepática, tem-se como melhor exemplo a cirrose. Na evolução da doença ocorre inflamação, regeneração e necrose do tecido hepático que sofre alterações na sua estrutura morfológica, predispondo à fibrose. Os nódulos passam a oferecer resistência à passagem do fluxo sanguíneo, gerando aumento na pressão portal (ARIAS et al., 1994).

A evolução da HP determina o aparecimento de varizes esofágicas, encefalopatia hepática, ascite e septicemia por microorganismos intestinais (CAHILL et al., 2001).

## **1.2 CIRROSE**

A cirrose caracteriza-se, histologicamente, por regeneração nodular do parênquima, fibrose difusa e desorganização das estruturas lobular e vascular do órgão. Essa doença está entre as dez maiores causas de morte no mundo ocidental, e a sua etiologia está relacionada à doenças virais (B e C) e ao alcoolismo. A principal alteração patogênica na cirrose é a fibrose progressiva do tecido hepático. Em situação normal, o colágeno intersticial localiza-se no trato portal e na região da veia centrolobular. Porém, na cirrose, o colágeno deposita-se no lóbulo, criando septos (COTRAN et al., 2000).

Todas as formas de cirrose podem desencadear hipertensão portal, e a primeira etapa é a obstrução do fluxo sanguíneo portal. O sangue venoso portal é dividido para canais colaterais das veias supra-hepáticas no septo fibroso. Esta anastomose porto-supra-hepática se desenvolve dos sinusóides pré-existentes dentro do septo. A veia centrolobular é deslocada no sentido de um septo fibroso ligado à veia porta pelo sinusóide original. Os nódulos regenerados foram

separados de seu suprimento sangüíneo, sendo supridos pela artéria hepática (ARIAS et al., 1994; SHERLOCK et al., 2002).

A obstrução do fluxo portal é devida, parcialmente, aos nódulos que comprimem as veias centrolobulares e os sinusóides, propiciando o incremento da resistência intra-hepática. Isso acarreta hipertensão portal pós-sinusoidal.

A diferença entre a hipertensão portal pré-sinusoidal e a hipertensão portal na cirrose é que na primeira situação, a pressão portal está aumentada na veia porta e a pressão venosa intra-hepática está normal. Na segunda situação, ambas encontram-se aumentadas (SHERLOCK et al., 2002).

O controle da hipertensão portal está diretamente ligado ao tratamento da doença primária e ao controle da circulação portal. Então, teoricamente, pode-se intervir através da redução do fluxo ou da pressão sangüínea portal, redução do influxo através de vasoconstrição arterial esplâncnica, venodilatação esplâncnica e redução da resistência vascular intra-hepática (BOSCH et al., 2003; ABRALDES et al., 2003).

### **1.3 SÍNDROME DA HIPERTENSÃO PORTAL (HP)**

A Hipertensão Portal (HP) é uma das complicações tardias da cirrose, que se caracteriza pelo aumento da resistência à passagem do fluxo sangüíneo portal. Esse aumento gera um incremento patológico na pressão venosa porta, que propicia o desenvolvimento de colaterais portossistêmicos e o desvio do sangue para a circulação sistêmica, contornando o fígado (BOSCH, 1991; BOSCH et al., 1992; COTRAN et al., 2000).

Um pequeno aumento na pressão venosa portal não significa que se esteja frente a um caso de hipertensão portal, porque existem várias situações em que o gradiente pressórico pode estar aumentado, porém esse aumento não é considerado patológico. Para se determinar um caso de hipertensão portal, os valores da pressão deverão ser superiores a 12 mmHg (BOSCH et al., 1992).

A expressão matemática que explica a relação entre pressão e resistência postula que, se a resistência for aumentada por uma relação direta, a pressão também será aumentada. Para tentar manter o gradiente pressórico invariável ou pouco alterado, deve existir uma compensação no fluxo sanguíneo correspondente ( SIKULER et al., 1985; COSTANZO, 1999).

A resistência à passagem do fluxo de sangue é regida pelas seguintes variáveis: comprimento e calibre do vaso e viscosidade do fluido. Quando em um sistema vascular ocorre redução no raio de um vaso, a resistência aumentará consideravelmente, situação que ocorre na hipertensão portal pré-hepática (BOSCH et al., 1992; GARCÍA-PAGÁN et al., 1999).

Com o desenvolvimento da circulação colateral, o trajeto dessa circulação passa a ser mais longo, além da variação do calibre vascular, o comprimento aumentado também contribui para o aumento da resistência que, por conseqüência, aumentará a pressão ( WIEST et al., 1999a; SHERLOCK et al., 2002).

Outro fato que irá ocorrer para manter a pressão venosa porta elevada é o aumento do fluxo de sangue. Este fenômeno hemodinâmico é considerado por muitos autores como a forma que mantém a hipertensão portal (WIEST et al., 1999b; SHERLOCK et al., 2002).

Gerar aumento na pressão venosa porta, em função do aumento da resistência ao fluxo, pode trazer importantes complicações clínicas. Entre elas: ascite, varizes esofogogástricas, sangramentos, aumento do risco de infecções, esplenomegalia congestiva (COTRAN et al., 2000; BOSCH et al., 2003; GARCIA-TSAO et al., 2003) e gastropatia da hipertensão portal (THULUVATH et al., 2002).

Muitos autores, ao longo das últimas décadas, vêm estudando as relações entre pressão, resistência e a formação da circulação hiperdinâmica. Nesses estudos estabelecem a existência de fenômenos hemodinâmicos mecânicos, porém, especulam ações bioquímicas e humorais que devam interferir nessa

situação de aumento da pressão e no desenvolvimento da circulação hiperdinâmica (SIKULER et al., 1985; GARCIA-PAGÁN et al., 1994; CASADEVALL et al., 1996).

Discute-se, atualmente, a presença e o papel do NO na hipertensão portal, como agente no desenvolvimento e na manutenção da circulação hiperdinâmica (STUMM et al., 2002; WIEST et al., 2002).

Em função de um possível grau de inflamação, existente em regiões circunvizinhas e irrigadas por este sistema vascular, parcialmente obstruído (estômago, fígado e rins), acredita-se que este estado seja capaz de gerar estresse oxidativo (PIZCUETA et al., 1992a; CASADEVALL et al., 1993).

#### **1.4 MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTENSÃO PORTAL**

Os estudos experimentais, que mimetizam esta síndrome clínica, estão bem descritos, porém, para serem bons modelos, o animal deve ter uma sobrevivência que permita desenvolver a HP e suas complicações. A sobrevivência está relacionada à capacidade de desenvolver uma adequada circulação colateral. Animais como cães, gatos e coelhos raramente são utilizados para estudar a HP, pois não conseguem desenvolver satisfatória circulação colateral (BOSCH et al., 1992; SHERLOCK et al., 2002).

Os modelos de HP conhecidos são: obstrução parcial da veia porta, injeção de sílica na veia porta, infecção por esquistossomas e ligadura do ducto biliar (cirrose biliar secundária). Em todos esses modelos ocorre circulação colateral, aumento do baço, porém muito dificilmente se formará ascite.

SIKULER et al., 1985, propuseram um modelo experimental para estudo da Hipertensão Portal isolada ou pré-hepática, conhecida por Ligadura Parcial da Veia Porta (LPVP). Nesse modelo, espera-se que ocorra incremento na pressão portal dos ratos, na faixa de 15 a 22 mmHg. A LPVP consiste em um método bastante

simples, rápido e econômico de gerar elevação da pressão venosa porta e de promover a circulação hiperdinâmica (BOSCH et al., 1992).

Para desenvolver a hipertensão portal através da LPVP, SIKULER et al., (1985) descreveram cada etapa do procedimento cirúrgico e documentaram cronologicamente as alterações hemodinâmicas desencadeadas após a LPVP.

A LPVP gera um acentuado aumento na pressão portal a partir do 2º dia, pela redução do calibre do vaso e pelo edema decorrente da manipulação das estruturas do peritônio. No 4º dia pós-operatório (P.O.), a pressão portal reduz, comparada aos primeiros dois dias, e no 8º dia P.O a pressão se estabiliza na faixa de 15 a 20mmHg, momento em que a circulação hiperdinâmica já está sendo desenvolvida. No estudo de WIEST et al., (1999a ) foi documentado que o aumento na liberação do NO ocorreria próximo ao 4º dia de pós-operatório, precedendo o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica.

Após o 8º dia da ligadura, a hipertensão portal torna-se estável e inicia a circulação hiperdinâmica com o desenvolvimento da circulação colateral. Esse aumento pressórico, juntamente com a circulação hiperdinâmica e vasodilatação, reforçam a presença de óxido nítrico (NO) na região esplâncnica e de mediadores inflamatórios em células e tecidos (SIKULER et al., 1985; WIEST et al., 1999a).

### **1.5. ÓXIDO NÍTRICO: MECANISMOS FISIOLÓGICOS E FISIOPATOLÓGICOS**

No início da década de 80, foi descrita a presença de uma substância endógena no endotélio vascular, que apresentava propriedades vasodilatadoras. Por ser capaz de produzir relaxamento sobre a musculatura lisa do vaso, essa substância foi denominada de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (PIQUÉ, 1992). Furchgott, em 1986, havia proposto que o EDRF poderia corresponder ao óxido nítrico (NO), pela similaridade das características e nas propriedades vasodilatadoras que ambas apresentavam. Esse gás lábil agia de forma muito particular como relaxante muscular vascular, era estimulado pela

enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) e inibido pela hemoglobina (PIQUÉ, 1992; EVORA et al., 1995).

Essas observações foram confirmadas por estudos de PALMER et al., (1987) e MONCADA et al., (1991). Esses autores evidenciaram a liberação de NO de células endoteliais estimuladas através da técnica de quimiluminescência. Fato extremamente importante foi o registro da formação de NO, a partir de L-arginina, comprovado a partir da inibição do NO, quando utilizada a forma metilada do aminoácido, como por exemplo monometil-L-arginina (L-NMMA). Essa descoberta permitiu o controle da formação de NO, através do uso de inibidores capazes de bloquear a síntese do NO (MONCADA et al., 1991).

Achados relevantes para o entendimento do papel do NO são as observações documentadas abaixo (PIQUÉ, 1992; EVORA et al., 1995):

- além das células endoteliais, o NO pode estar presente em fibroblastos de musculatura lisa, plaquetas, macrófagos, neutrófilos e no sistema nervoso central.
- evidência de duas formas de enzimas ligadas à formação desse gás, que são as formas constitutiva e induzida.
- papel fundamental na regulação da pressão arterial. Na inibição da síntese de NO verifica-se aumento na pressão arterial; fato que é revertido quando se administra L-arginina (precursor da formação de NO).
- ação sobre a função plaquetária, que age como um inibidor da agregação plaquetária e da adesão de células sangüíneas à parede vascular.
- seu papel como neurotransmissor.

O NO pode ser caracterizado como uma molécula gasosa originada de L-arginina, que reage com oxigênio e forma dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ). Através de reações diretas ou indiretas podem formar peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ), quando associado ao radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). Essa associação ao radical superóxido permite que o NO seja apresentado como um potente varredor de radicais livres em condições fisiológicas. A forma de nitrito ( $\text{NO}_2$ ), pode reagir com várias

espécies ativas, resultando em nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) produto final estável e medido no plasma (SZABO et al., 1995; WIEST et al., 2002).

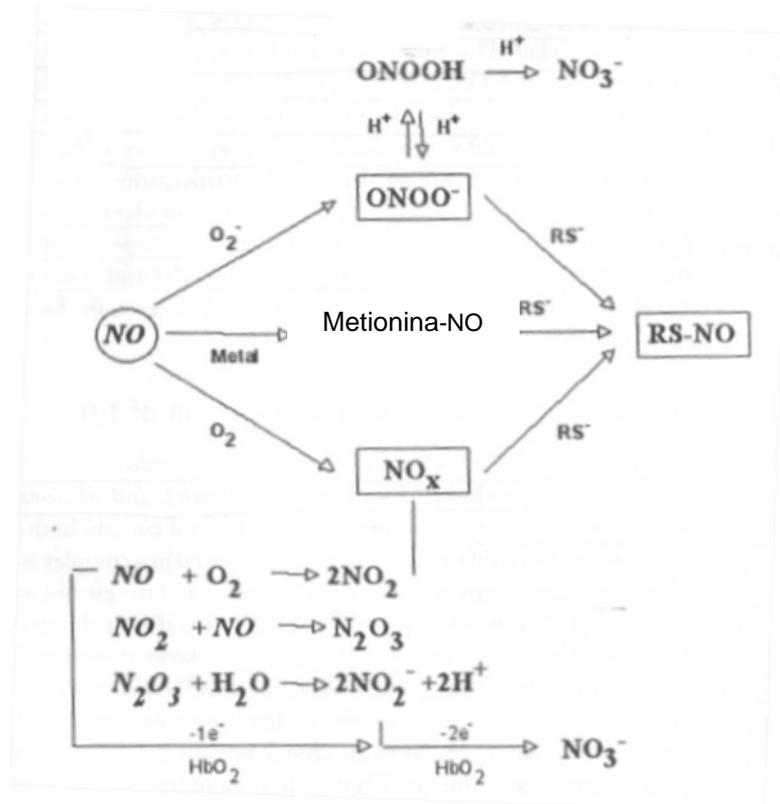


Figura 1: Biossíntese do NO e as reações químicas em que o NO participa, WIEST e GROSZMANN, p.479, 2002. (H+: íon hidrogênio,  $\text{NO}_3^-$ : nitrato,  $\text{ONOO}^-$ : peroxinitrito,  $\text{O}_2$ : oxigênio,  $\text{O}_2^-$ : anion superóxido, NO: óxido nítrico;  $\text{NO}_2^-$ : nitrito;  $\text{NO}_x$ : metabólitos do NO;  $\text{N}_2\text{O}_3$ : trióxido de dinitrogênio)

O NO atua como um mensageiro intracelular em vários tecidos e células. Sua ação é extremamente ampla agindo como estimulador de vasodilatação em inúmeros tecidos, entre eles, o coração, os nervos periféricos e os sistemas imune, respiratório, gastrointestinal e endócrino (PIQUÉ, 1992; PASA e PEDROSA, 2001).

Mesmo sendo uma molécula simples, sua síntese enzimática é bastante complexa. As NO sintases (NOS) pertencem à família enzimática que sintetiza o NO e são enzimas que utilizam como substratos a forma reduzida do fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) e moléculas de oxigênio. São

classificadas, em função da sua atividade, em constitutivas (cNOS) e induzidas (iNOS) (YUNES et al., 2001).

Atualmente, acredita-se que a forma constitutiva também poderia ser induzida conforme algumas circunstâncias. Independente dessa subdivisão, as NOS são descritas como 3 isoformas, baseadas em 3 genes diferentes, já seqüenciados. As isoformas são: óxido nítrico sintase neuronal (nNOS); óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) ( ambas constitutivas) e a óxido nítrico sintase induzida (iNOS). A forma cNOS dependente de cálcio é encontrada em células endoteliais (eNOS) e em células neuronais (nNOS) (GROSS e WOLIN, 1995; MICHEL e FERON, 1997; SZABO et al., 2000).

Quanto à ação de cada uma das NOS, sabe-se que a eNOS, encontrada no endotélio vascular, gera baixas concentrações de NO, favorece a diminuição da pressão sangüínea e auxilia na inibição da agregação plaquetária; a nNOs gera NO, regula a transmissão neuronal e responde por funções de um neurotransmissor; as iNOs formam NO induzido por certas citotoxinas, por hepatócitos independente de  $Ca^{++}$  e dependente de calmodulina, e por macrófagos. Este NO está intimamente ligado aos processos de defesa do organismo e, em função da produção excessiva, relaciona-se aos processos destrutivos teciduais, na inflamação aguda ou crônica, e na apoptose celular (SZABO et al., 2000; PASA e PEDROSA, 2001).

No quadro abaixo são demonstradas similaridades e diferenças entre cNOS e iNOS, conforme MONCADA et al., 1991:

<i>Semelhanças e diferenças entre as duas formas de NO sintases:</i>	
<i>Constitutiva (cNOS)</i>	<i>Induzida (iNOS)</i>
<i>Citosólica</i>	<i>Citosólica</i>
<i>Dependente NADPH</i>	<i>Dependente NADPH</i>
<i>Dioxigenase</i>	<i>Dioxigenase</i>
<i>Inibida por análogos a L-arginina</i>	<i>Inibida por análogos a L-arginina</i>
<i>Ca<sup>2+</sup> / dependente de calmodulina</i>	<i>Ca<sup>2+</sup> / independente de calmodulina</i>
<i>Liberada em picomoles NO</i>	<i>Liberada em nanomoles NO</i>
<i>Sem efeito a glicocorticóides</i>	<i>Inibição induzida por glicocorticóides</i>

Recentemente o radical livre NO tem sido apresentado como importante sinalizador para a manutenção da homeostasia, assim como um notável agente em efeitos citotóxicos que envolvem inúmeras doenças. Estudos *in vivo* demonstraram que o NO produz atividade respiratória na mitocôndria, sugerindo um papel importante na respiração celular e na apoptose ( FIGUEROA et al.,2000).

Apesar dessa duplicidade de funções, acredita-se que os efeitos fisiológicos e fisiopatológicos estejam vinculados aos níveis de concentração e, quando atuam em baixas concentrações, comportam-se como mensageiro e fator de proteção celular (antioxidante), interagindo com metais de transição e outros radicais livres. Em concentrações altas e formando trióxido de dinitrogênio ( $N_2O_3$ ) ou peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), o NO passa a agir como espécie reativa de nitrogênio, responsável por ações citotóxicas causadas por este gás, entre elas as da fisiopatologia da inflamação (figura 2), choque circulatório e lesões por isquemia-reperfusão (HALLIWELL et al., 1989; GROSS e WOLIN, 1995; SZABO et al., 2000). A figura 2 apresenta a relação de mediadores da inflamação quando ligados ao receptor, iniciando o processo de produção de NO. De uma forma semelhante, as forças de cisalhamento presentes no vaso também atuam como estímulo para desencadear a produção de NO.

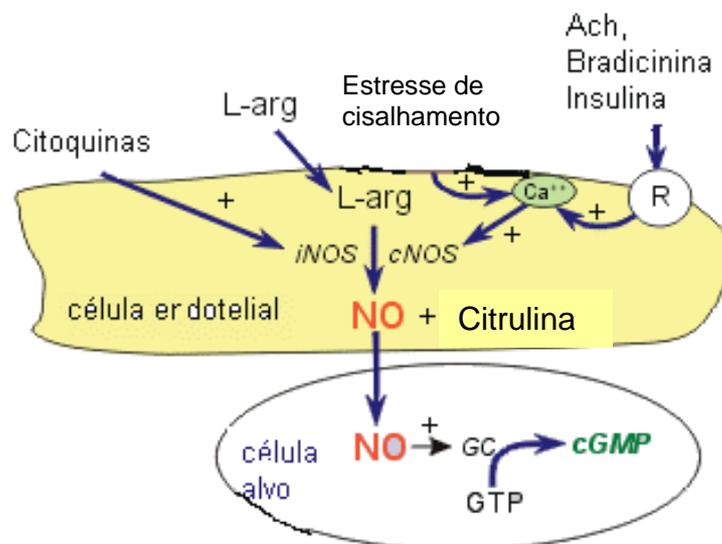


Figura 2: Mediadores da inflamação ligados ao receptor e a produção de NO.

O NO é produzido a partir da L-arginina por uma das três isoformas da óxido nítrico sintase (NOS). Vários fatores podem estimular a produção de NO, muitos

compostos, incluindo citoquinas ou endotoxinas, estimulam a transcrição da iNOS, enquanto que a modulação e produção de NO por eNOS é determinada por estímulos vasculares, como estresse de cisalhamento (WIEST et al., 1999; GOVERS et al., 2001; ROCKEY, 2003).

O peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) contribui para situações fisiológicas como ação vasodilatadora, inibição de agregação plaquetária e leucocitária. Sua ação deletéria está ligada à lipoperoxidação, formando radicais lipídicos hidroperóxidos que amplificam as reações de radicais livres. Os efeitos de NO/ $\text{ONOO}^-$  são pro-apoptóticos, aumentam o p53, causam lesão em DNA e em mitocôndrias e reduzem as taxas de Bcl-2 (GROSS e WOLIN, 1995; SZABO et al., 2000).

Com bases nos trabalhos já publicados, são conhecidas algumas interações do NO no metabolismo dos tecidos, agindo ora como um mecanismo protetor antioxidante e, em outro momento, como um agente citotóxico. (GROSS e WOLIN, 1995).

## **1.6. RADICAIS LIVRES (RL) E ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO (EAO)**

Os radicais livres (RL) do termo latino “radix”, que significa raiz, são moléculas que contêm elétrons desemparelhados no seu último orbital. As moléculas apresentam nos seus orbitais dois elétrons e, devido a isso, são estáveis. No caso dos radicais livres, só existe um elétron, situação que os torna altamente instáveis. Alguns autores os consideram moléculas muito reativas e danosas às células e ao organismo (PERES, 1994).

Os RL reagem através de ligações covalentes ou reações bioquímicas em cadeia. Na primeira situação, uma união covalente ocorre quando dois radicais formam um par, combinando os seus elétrons desemparelhados. As reações bioquímicas em cadeia ocorrem quando reagem com outro não-radical, e, ao final dessa reação, produzir-se-á outro radical. Além dessas duas vias, existem outras formas de obtenção de radicais livres, através da fagocitose na resposta

inflamatória, em situações de exposição do organismo à radiações ionizantes, nas contaminações, poluição, excesso de exercício, hiperóxia e isquemia (figura 3) (PERES, 1994; AFANAS et al., 1995).

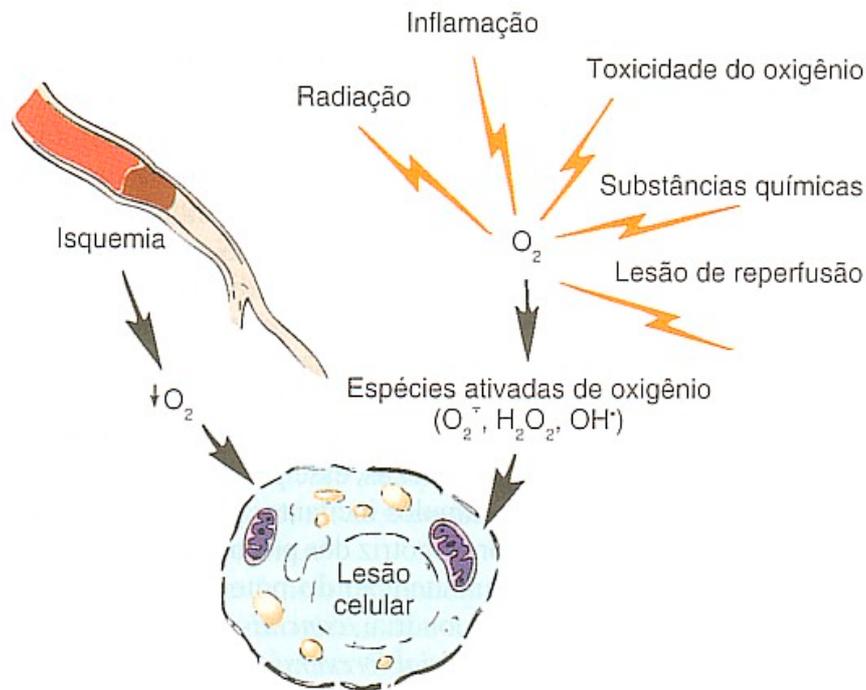


Figura 3: O papel crítico do oxigênio na lesão celular. A isquemia causa lesão celular por redução dos suprimentos celulares de oxigênio, enquanto outros estímulos, induzem lesões através de espécies ativadas tóxicas de oxigênio (COTRAN, p.5, 2000).

Os radicais livres podem causar alterações em ácidos graxos insaturados das membranas celulares e no DNA (HALLIWELL et al., 1989).

Os radicais livres podem ser pequenos como a hidroxila, ou grandes e complexos, contendo átomos de carbono e cadeias laterais. O importante é que possuam um único elétron sem par. Os dois principais radicais livres são o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) e o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (YUNGSON, 1995).

Nem todas as formas que reagem para formar radicais livres têm número desemparelhado de elétrons. A este grupo denomina-se espécies ativas de oxigênio (EAO). Elas incluem o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), o

radical peroxil ( $\text{ROO}^\cdot$ ) e o alcóxil ( $\text{RO}^\cdot$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ânion hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ) e oxigênio *singlet* ( $^1\text{O}_2$ ) (PERES, 1994; YUNGSON, 1995).

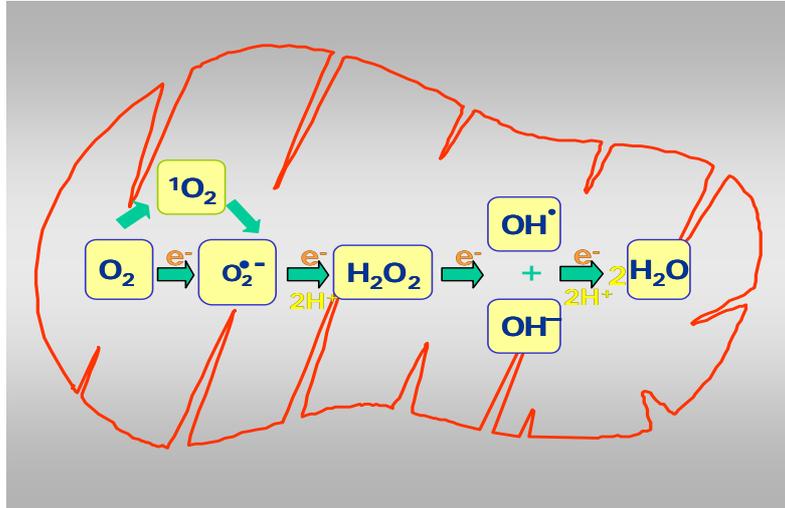


Figura 4: Esquema da redução do  $\text{O}_2$  em água, na respiração mitocondrial, e a geração das espécies ativas de oxigênio.

Nos organismos aeróbios, o  $\text{O}_2$  é reduzido à água no final da respiração mitocondrial (figura 4). A molécula de  $\text{O}_2$  se mantém unida ao complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial até que ocorra a redução total do  $\text{O}_2$  em água. Durante esse processo, por receber apenas 1 elétron de cada vez, ocorre a redução parcial do oxigênio, gerando ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Com a adição de um hidrogênio ao ânion superóxido, este se reduz a peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Posteriormente, se um terceiro elétron for acrescentado, ocorrerá a formação de um radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ). Deste modo, a formação de radicais ou de espécies ativas de oxigênio (EAO) deve-se ao fato do  $\text{O}_2$  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 et al., 2000).

O ânion superóxido é constituído pela redução do  $\text{O}_2$  molecular por um elétron, após aporte energético. Normalmente, é removido pela reação de dismutação, que consiste na reação de dois ânions de superóxido catalisada pela

pela enzima superóxido dismutase (SOD), formando  $1/2 O_2$  e  $H_2O_2$ . 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. Estas enzimas são encontradas nos peroxissomas, dentre as mais comuns encontram-se a catalase, D-aminoácido oxidase, urato oxidase, B-oxidase de ácidos graxos e a glutatona peroxidase. O  $H_2O_2$  apesar de não ser um radical livre, pode reagir com outro ânion superóxido, ou com metais de transição, conforme a reação de Fenton e Haber-Weiss, formando o radical hidroxila (HALLIWELL et al., 1989; FAVIER et al., 1995).

O radical hidroxila é uma EAO instável, sendo formado a partir da reação da  $H_2O_2$  com um ânion superóxido, ou com íons ferro (segundo reação de Fenton) e que não possui enzima que catalise sua remoção. Os radicais peroxil – alcóxil são mais seletivos, reagem com as proteínas da membrana e iniciam a seqüência de reações em cadeia da peroxidação de lipídios, tendo por produto final o malondialdeído (PERES, 1994).

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

Os danos celulares causados pelos radicais livres podem ser a peroxidação lipídica, a inativação enzimática, a alteração do estado redox intracelular e o dano no DNA (FAVIER et al., 1995). Quando um radical reage com proteínas da membrana celular, ocasiona dano estrutural e funcional.

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

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

Os RL e as EAO também são produzidos pelas células durante sua atividade fisiológica, como na cadeia respiratória nas mitocôndrias, na fagocitose (NADPH-oxidase), pelas enzimas oxidativas (xantino-oxidase), na produção de prostaglandinas (enzimas cicloxigenase e lipoxigenase) e na hidroxilação de substratos (citocromos P<sub>450</sub>) (HALLIWELL, 1989). Assim, como na presença de ferro ou cobre, as EAO, por meio da reação de Haber-Weiss, podem reagir e converter-se em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>, pois esses metais intensificam a oxidação, agindo como catalisadores (THANNICKAL et al., 2000).

## **1.7. DEFESAS ANTIOXIDANTES**

Os RL só são eliminados do organismo quando reagem com outro radical ou com o sistema antioxidante. Os antioxidantes agem de várias formas, inativando as EAO ou se ligando aos íons metais de transição.

O sistema de defesa antioxidante para anular a ação do radical livre, pode ser enzimático ou não-enzimático.

As defesas enzimáticas são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione disulfide reductase (GR) e glutathione transferase (GST), (TRAVACIO e LLESUY, 1996). Podem ser divididas em 3 grupos:

- 1 - Antioxidante primário: previne a formação de novos RL. Representam esse grupo, a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx) e as proteínas de união com metais (ferritina e ceruloplasmina)
- 2 - Antioxidante secundário: capta os radicais, evitando as reações em cadeia. Entram nesse grupo a vitamina E, a vitamina C, o ácido úrico e a albumina.
- 3 - Antioxidante terciário: repara moléculas lesadas por radicais, como por exemplo, enzima reparadora de DNA.

As defesas não enzimáticas são compreendidas por  $\alpha$ -tocoferol ou vitamina E,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico ou vitamina C, glutathione e flavonóides (KOUL et al., 2001).

### **1.7.1. Defesas Antioxidantes Enzimáticas**

O sistema antioxidante enzimático é responsável pela manutenção do equilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes, a que muitas vezes o organismo fica exposto.

Esse sistema é composto por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Cada uma delas desempenha um papel específico no controle do balanço oxidativo.

A SOD tem por principal função atuar na dismutação do ânion superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Apresenta-se em três formas: a Cu-ZnSOD, localizada no citosol; a Cu-ZnSOD situada no endotélio vascular e, por último, a SOD-manganês, presente na matriz mitocondrial. Na reação 1, é expressa a ação catalítica da SOD junto ao ânion superóxido.



O produto final da dismutação é o peróxido de hidrogênio e o  $\text{O}_2$ . O  $\text{H}_2\text{O}_2$ , apesar de não ser um radical, facilmente reage originando o radical hidroxila. A remoção dos peróxidos ocorre por meio da CAT e da GPx, tendo a CAT mais afinidade ao peróxido de hidrogênio, de metila e etila, enquanto que a glutathione peroxidase (GPx) catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos (LLESUY, 2002). A ação da catalase sobre o peróxido é apresentada na reação 2.



A GPx também atua sobre peróxidos e está situada no citosol e na matriz mitocondrial e, reduz o peróxido de hidrogênio à água, através da oxidação da glutathione reduzida (GSH). Para restabelecer a glutathione oxidada (GSSG) à reduzida, é necessário que a Glutathione Redutase (GR) promova a regeneração da GSSG, consumindo NADPH, conforme demonstrado na figura 5.

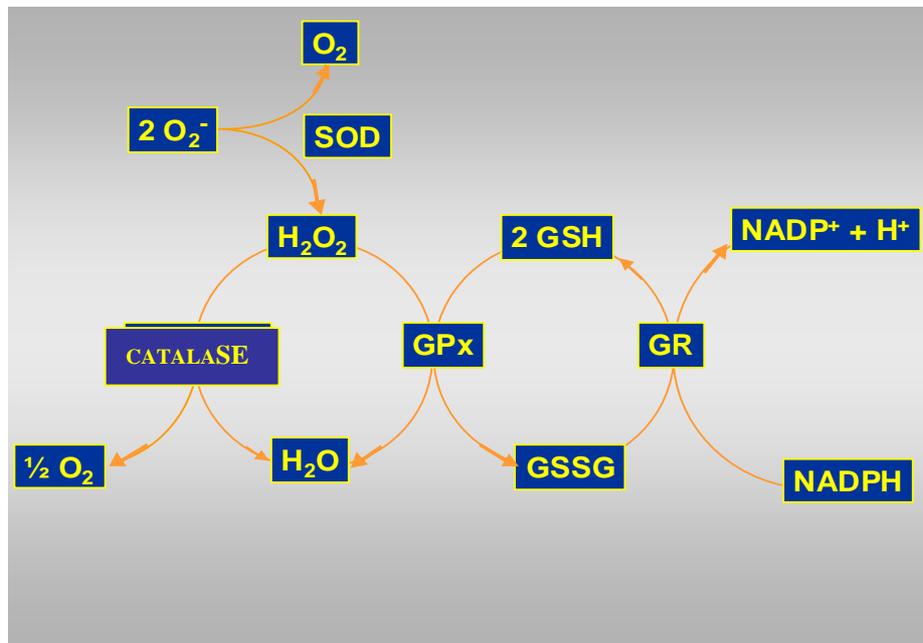


Figura 5: Esquema da interação entre as enzimas antioxidantes.

### 1.7.2. Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas

Assim como as enzimas antioxidantes, que removem radicais ou EAO antes que esses causem dano à membrana, existem substâncias exógenas, que atuam como antioxidantes, evitando a reação em cadeia, como a LPO. Essas são conhecidas por defesas antioxidantes não-enzimáticas. As mais conhecidas são: glutationa, ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -carotenos e flavonóides.

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

A Glutationa é um tripeptídeo de ácido alfa-glutâmico, cisteína e glicina, que atua como substrato da GPx. Este tripeptídeo participa do sistema antioxidante para detoxificação de hidroperóxidos, juntamente com a GPx, GR e NADPD.

A vitamina C é um composto hidrossolúvel que atua como co-substrato na biossíntese do colágeno, catecolaminas e carnitina. A forma da vitamina E com maior atividade química é o  $\alpha$ -tocoferol, que é um composto lipossolúvel, que 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. O beta caroteno age principalmente com o oxigênio *singlet*, sua utilização ocorre em concentrações baixas, tem afinidade à luz, e absorve a energia de excitação do radical.

Os flavonóides são encontrados nas folhas e partes externas das plantas. A maioria dos flavonóides apresentam 15 carbonos em sua estrutura fundamental. Para proteger os tecidos da ação oxidativa, é descrito por vários autores que fitoterápicos, entre eles os flavonóides, têm ação antioxidante. Alguns flavonóides, como a rutina e a quercetina, estão sendo estudados e estão apresentando bons resultados como antioxidantes (ACKER et al., 1996; CAO et al., 1997; PERES et al., 2000). Isto significa que são capazes de proteger a célula ou o tecido de danos

decorrentes de RL ou de LPO (DAY et al., 2001). Esses flavonóides atuam em atividades antilipoperoxidativas, antitumorais, antiinflamatórias e antiplaquetárias, assim como podem atuar como um pró-oxidante (BRUNETON, 1991; CHEN et al., 1996; ACKER et al., 1996; CAO et al., 1997).

### 1.7.2.1 Defesa Antioxidante Não-Enzimática : Flavonóide Quercetina

A quercetina é um flavonol típico (figura 6), com a seguinte descrição científica: 2 - (3,4-dihidroxifenil) - 3,5,7 - trihidroxil - 4H -1 - benzo-piran - 4-ona ou também denominado de 3,3',4',5,7 - pentahidroxi-flavona (Organização Internacional de Química Pura e Aplicada - IUPAC) (HERRMANN, 2002 ). Acredita-se que essa capacidade de doar elétrons, com maior ou menor facilidade, potencializa ou reduz a ação antioxidante dos flavonóides e está associada à relação estrutura-atividade de cada molécula. Para entender essa relação, é importante recordar a estrutura química básica dos flavonóides. Eles são compostos por 15 carbonos, distribuídos em 2 anéis fenólicos, conectados a unidade do carbono 3 e, normalmente, acoplados a uma molécula de açúcar, a qual incrementa sua solubilidade à água (LIN et al., 2001; LIN et al., 2002).

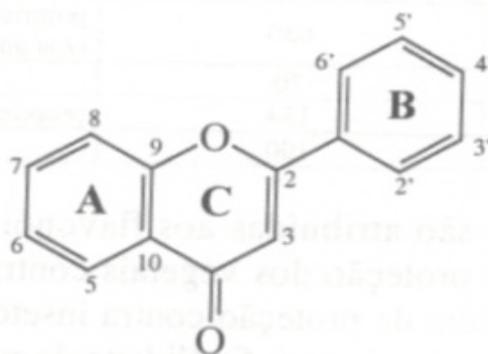


Figura 6: Núcleo Fundamental dos flavonóides e sua numeração SIMÕES et al., p 501, 2002,

Apesar dos estudos sobre a capacidade antioxidante dos flavonóides, existem poucas referências sobre os efeitos da quercetina nas disfunções hepáticas, doenças do trato gastrointestinal, assim como sua ação na hipertensão portal ou sobre a mucosa gástrica.

Trabalhos experimentais, utilizando quercetina, obtiveram redução das lesões no tecido hepático, com diminuição da LPO, menor quantidade de colágeno e diminuição da fibrose, em modelos de cirrose biliar secundária (PERES et al., 2000). Outros, sugerem a ação inibitória do flavonóide sobre peróxidos, CORNISH et al., (2002) observaram, através do ensaio de LOCH (*lens organ culture with hydrogen peroxide*), que cristalinos expostos ao peróxido de hidrogênio (1mM) resultavam em perda da transparência. Porém, quando adicionado 10 $\mu$ M ou 30 $\mu$ M de quercetina, abolia-se quase que completamente o aspecto opaco dos cristalinos de ratos. Esse fato foi embasado na capacidade da quercetina em inibir significativamente o influxo de Ca<sup>++</sup> e Na<sup>+</sup>, que era induzido pelo peróxido de hidrogênio.

Para que um flavonóide apresente potente ação antioxidante, ou seja, atue como um varredor de RL ou EAO, é necessário que esta molécula consiga doar elétrons para estabilizar um RL e que, ao ceder esses elétrons, rapidamente se estabilize (LIN et al., 2001; LIN et al., 2002).

CAO et al., (1997) definiram que as propriedades antioxidantes dos flavonóides estavam associadas ao número de hidroxilas (<sup>-</sup>OH) ligadas aos grupos aromáticos, que formam a molécula. Porém, neste estudo, os autores não salientam a importância das posições desses grupos <sup>-</sup>OH.

Em 2001, HEIJEN et al. propuseram um estudo relacionando a estrutura-atividade dos flavonóides com a capacidade de atuarem como varredores de peróxido nitrito (ONOO<sup>-</sup>). Sua principal conclusão foi que a quantidade de grupos <sup>-</sup>OH é fundamental para a ação de “scavenger” de ONOO<sup>-</sup>. Tal afirmação foi baseada através da metilação da quercetina. Eles observaram que a troca de OH pelo grupo metil provocava a redução na capacidade antioxidante desse flavonóide. E quanto mais grupos metil eram acoplados à molécula, mais se reduzia a capacidade antioxidante.

A outra importante conclusão foi que, além da quantidade de OH, a posição que a hidroxila ocupa é crucial para potencializar a propriedade antioxidante.

Quando o grupo OH está na posição 3, existe uma ação antioxidante, porém essa incrementa-se drasticamente, quando os grupos OH extras são colocados nas posições 2 ou 4, que correspondem à posição *orto* e *para* (HEIJEN et al., 2001).

Nos últimos anos, vários fitoterápicos estão sendo investigados quanto a sua capacidade anti ou pró-oxidativa, ação protetora ao dano da membrana lipídica celular e à atividade mutagênica ( FORMICA et al., 1995; SAIJA et al., 1995; CAO et al., 1997). Estas investigações são necessárias para discutir os mecanismos e os efeitos dos antioxidantes e sua capacidade de interação com as membranas, esclarecendo pontos importantes para melhor definir a interface clínico-terapêutica.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

- Avaliar, no modelo de hipertensão portal, o dano oxidativo, a atividade das enzimas antioxidantes, o envolvimento do óxido nítrico e a ação do flavonóide quercetina.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Mensurar a pressão venosa porta na veia mesentérica.
- Estabelecer as alterações hepato-somáticas e espleno-somáticas dos animais estudados.
- Avaliar os testes de função hepática (TFH), através de medidas de concentração sérica de aminotransaminases (AST e ALT) e fosfatase alcalina (FA).
- Avaliar as alterações anatomopatológicas dos tecidos do estômago e do fígado dos ratos.
- Avaliar a peroxidação lipídica através de produtos de reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quimiluminescência (QL) em homogeneizados de estômago e fígado dos animais estudados.
- Avaliar a atividade antioxidante enzimática (Catalase e Superóxido Dismutase) em homogeneizados de estômago e fígado dos animais estudados.
- Avaliar o metabolismo do NO, através da concentração de nitritos e nitratos de homogeneizados de estômago e fígado.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. ANIMAIS

Os animais utilizados neste trabalho foram ratos Wistar, machos, pesando em média 300 gramas, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Eles foram acondicionados individualmente, em gaiolas de polipropileno, com dimensões de 30x18x13 cm, forradas por maravalha. A luminosidade foi controlada, em ciclos de 12 horas claro / escuro (com luz das 07 às 19 horas). A temperatura do ambiente foi mantida em  $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ . Todos os animais foram alimentados com ração ( Moinhos Purina, Porto Alegre/ RS) e água *ad libitum*. Este trabalho seguiu a legislação vigente e está em conformidade com o comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para experimentos em animais.

### 3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em 4 grupos :

- I. **Controle (SO – *sham operated*)** – foi submetido à cirurgia, porém não foi ligada a Veia Porta.
- II. **Rato com a ligadura parcial da Veia Porta (LPVP)** – foi submetido à cirurgia, tendo sua Veia Porta parcialmente ligada.
- III. **SO + Quercetina (SO Q)**: foi submetido à cirurgia, porém não foi ligada a Veia Porta e, a partir do 8º dia de pós-operatório, passou a receber flavonóide Quercetina (Q) por via intraperitoneal.
- IV. **LPVP + Quercetina(LPVP Q)**: foi submetido à cirurgia, tendo sua Veia Porta parcialmente ligada e, a partir do 8º dia de pós-operatório, passou a receber flavonóide Quercetina (Q) por via intraperitoneal.

### **3.3. MARCAÇÃO E PESAGEM**

Os animais foram mantidos, após o procedimento cirúrgico, em gaiolas individuais devidamente identificadas. Foram registrados seus pesos no início do experimento (momento da cirurgia) e no momento do sacrifício. Para a pesagem, foi utilizada uma balança marca Sartorius, com peso em gramas.

### **3.4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

#### **3.4.1. Desenvolvimento do Modelo de Hipertensão Portal (HP) por LPVP**

Os animais foram anestesiados com cetamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) por via intraperitoneal. A técnica inicia por uma laparotomia (na linha alba), com o animal previamente anestesiado. Após realizada a abertura da região abdominal, exteriorizam-se as alças intestinais que são umedecidas por soro fisiológico. A finalidade dessa etapa é visualizar a veia porta. Para isso, sempre que as alças forem exteriorizadas, deverão ser rebatidas para o lado esquerdo do animal.

Concluída essa fase, o próximo passo é o de visualizar a veia porta. Então, foi isolado o vaso, com auxílio de material cirúrgico de precisão (pinças), a fim de passar fio de seda 3.0 em torno de sua circunferência. Feito isso, deve ser colocado em paralelo ao vaso uma agulha de calibre 20G, que foi amarrada juntamente com a veia. Nesse momento as alças intestinais alteraram sua coloração de avermelhada para roxa.

Rapidamente, porém com muito cuidado, retira-se a agulha para que o fluxo retorne parcialmente. Observa-se, novamente, alteração na coloração das alças. Para minimizar o risco de trombose venosa massageia-se a veia de forma lenta e delicada, com um cotonete limpo e umedecido em soro fisiológico.

Conclui-se a cirurgia, com a recolocação das alças, na cavidade peritoneal, juntamente com a adição de 10 ml de soro fisiológico, efetua-se o fechamento da parede muscular abdominal com pontos contínuos e da parede cutânea com pontos isolados. Sobre esses pontos coloca-se solução antisséptica.

A figura 7 ilustra o procedimento realizado durante a ligadura parcial de veia Porta. Demonstra as possíveis repercussões fisiopatológicas decorrentes da redução parcial no calibre do vaso, entre elas, aumento na pressão portal, vasodilatação esplâncnica e aumento do baço.

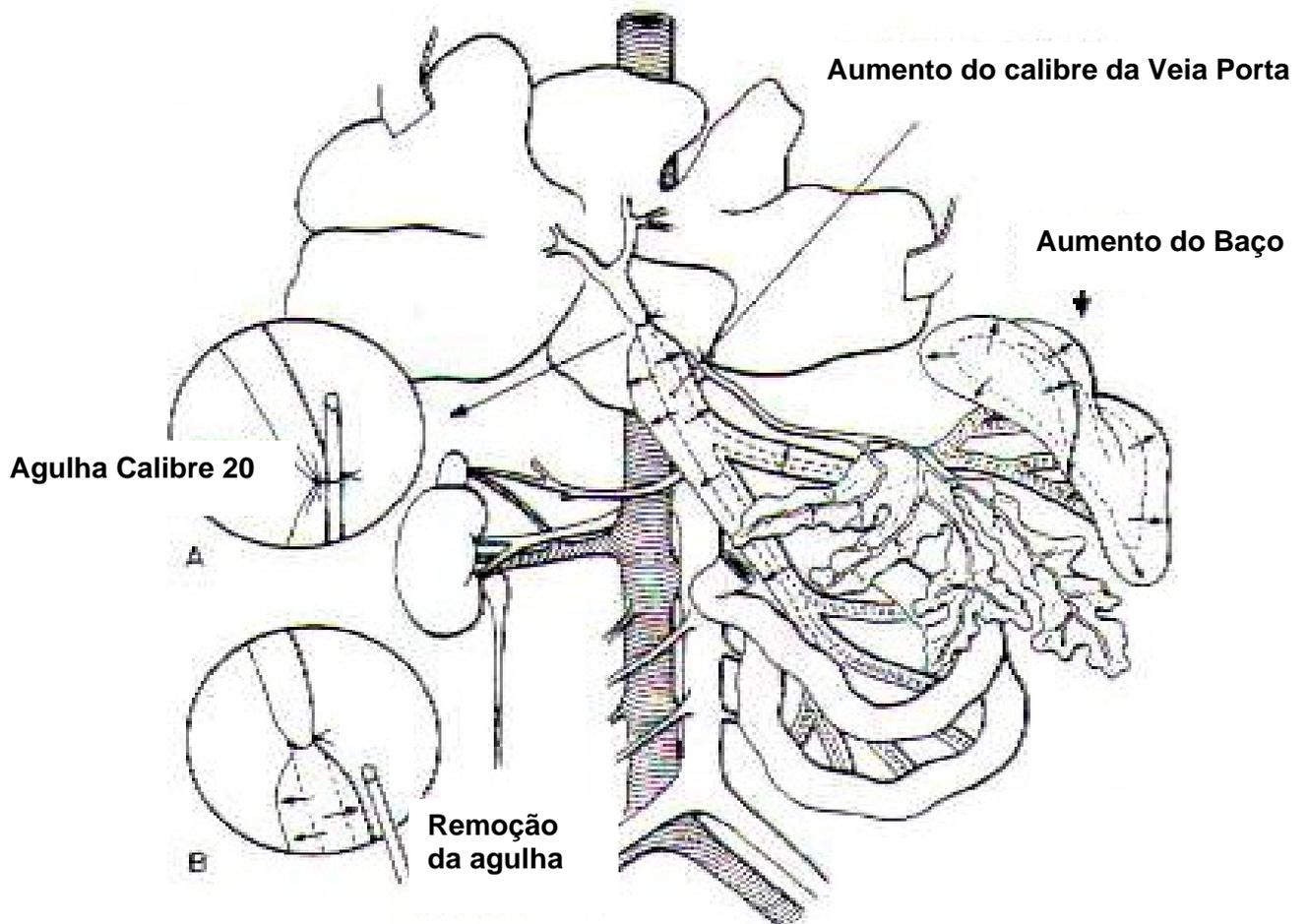


Figura 7: Esquema da cirurgia experimental ligadura parcial de veia porta, Castro e Silva et al., 1998.

Os animais permaneceram em gaiolas individuais até o final do experimento.

Para formar o grupo SO, repetiram-se todas as etapas do procedimento cirúrgico, exceto a que liga a veia Porta. Neste grupo, apenas se visualizou a veia e se reiniciou o processo de fechamento.

### **3.4.2. Administração da droga**

No 8º dia de procedimento de LPVP, os animais iniciaram a receber flavonóide quercetina diariamente por 7 dias, em dose de 50mg/kg/dia (PERES et al., 2000) por via intraperitoneal. A quercetina foi previamente dissolvida em Tween e água destilada. O flavonóide foi administrado nos grupos SO Q e LPVP Q.

### **3.5. AFERIÇÃO DA PRESSÃO VENOSA PORTAL**

No 15º dia de pós-operatório os ratos foram anestesiados com cetamina e xilazina para permitir a aferição da pressão portal. A aferição foi realizada através de um cateter introduzido na veia mesentérica, ligado a um polígrafo da marca Letica, o qual registra graficamente a pressão e a converte para um valor numérico em mmHg.

Foram estabelecidos os seguintes passos para aferir a pressão portal:

- 1º Com o animal previamente anestesiado, realizou-se laparotomia seguindo a linha alba. Expondo as alças sobre uma gaze úmida e limpa, visualizou-se a veia mesentérica.
- 2º Ligou-se o aparelho, calibrando-o. Para calibrá-lo, deve-se fornecer uma pressão conhecida (usou-se 50 mmHg) que foi marcada pelo polígrafo no papel milimetrado.
- 3º Pegou-se, então a agulha (cânula que está acoplada ao polígrafo) que foi introduzida no vaso a ser aferido. Nesse momento, o polígrafo marcou um registro gráfico no papel milimetrado.

- 4º Depois, sabendo quantos milímetros equivalem à pressão de 50 mmHg, realizou-se uma regra de 3 para obter o valor da pressão portal.

A figura 8 exemplifica os registros das pressões porta obtidos em um animal SO, LPVP Q e LPVP.

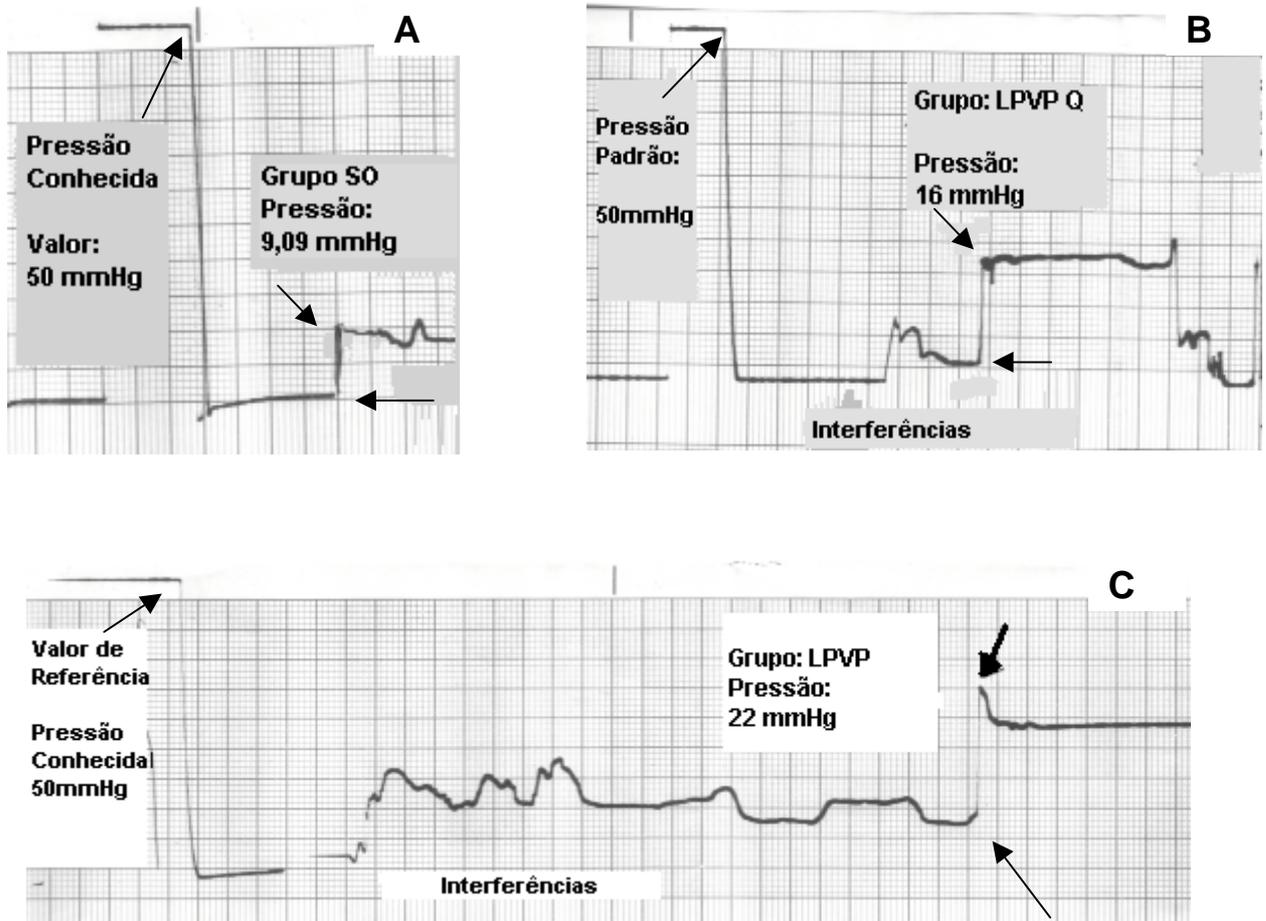


Figura 8: demonstração dos registros de pressões porta de animais SO (A), LPVP Q (B) e LPVP (C).

### **3.6. COLETA DE SANGUE E TESTES DE FUNÇÃO HEPÁTICA**

No dia do sacrifício, com os animais previamente anestesiados por cetamina (100mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg), foi coletado cerca de 1 ml de sangue, pela técnica da punção do plexo venoso retro-orbital com tubo de capilar de vidro (heparinizado). Esse sangue foi utilizado para os testes de função hepática (TFH): Fosfatase alcalina (FA), Alanino aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST), realizadas no Laboratório Central da Santa Casa.

As aminotransferases são enzimas que permitem a formação de ácido oxalacético e pirúvico, através da transferência do grupo  $\alpha$ -amino do ácido aspártico e da alanina para o grupo  $\alpha$ -ceto do cetoglutarato. Acredita-se que a elevação de seus valores plasmáticos esteja relacionada a lesões, destruição de tecidos ou a alteração da permeabilidade celular. Tanto a ALT como a AST se elevam nas doenças hepáticas.

A Fosfatase Alcalina é conhecida como grupo enzimático que catalisa a hidrólise de ortofosfato em pH alcalino. A FA é utilizada na investigação de colestase de indivíduos com doença hepatobiliar ( BRANDÃO e MARRONI, 2001).

### **3.7. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS**

#### **3.7.1. Sacrifício dos Animais**

No 15º dia da realização da LPVP, os animais foram pesados e anestesiados. Realizou-se uma laparotomia sobre a linha alba, as alças foram colocadas sobre gaze limpa e umedecidas com soro fisiológico. Localizou-se a veia mesentérica para obter o registro da pressão portal.

Após a medida da pressão portal, foram retirados o baço, o fígado e o estômago. O baço foi pesado, para estabelecer a relação esplênossomática. Os órgãos fígado e estômago foram pesados, retirados fragmentos para o exame anatomopatológico e para o preparo dos homogeneizados. Os tecidos, após

pesagem, foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a temperatura de -70°C.

### 3.7.2. Preparo dos Homogeneizados

#### 3.7.2.1. Preparo da solução tampão

Utilizou-se para o preparo do tampão fosfato (KCl 140mM + fosfato 20mM, pH 7,4):

##### Solução A:

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.1H<sub>2</sub>O .....27,6 g  
H<sub>2</sub>O dest. q.s.p. ....1000 mL

##### Solução B:

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O .....35,5 g  
H<sub>2</sub>O dest. q.s.p. ....1000 mL

##### Tampão:

Solução A.....95mL  
Solução B ..... 405 mL  
KCl ..... 10,43 g  
H<sub>2</sub>O dest. q.s.p. ....1000 mL

#### 3.7.2.2. Preparação dos homogeneizados de tecidos de estômago e fígado

Colocam-se 9 mL de tampão fosfato ( KCl 140 mM, fosfato 20 mM) por grama de tecido, em seguida homogeneizado em Ultra-Turrax (IKA-WERK) por um minuto à temperatura de 0-2°C. Esse homogeneizado foi centrifugado em centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B *Refrigerated Superspeed Centrifuge*) por 10 minutos a 3000 rpm (LLESUY *et al.*, 1985). O precipitado foi desprezado, e o sobrenadante utilizado para as medidas de lipoperoxidação (LPO) (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quimiluminescência iniciada por hidroperóxido de Tert-Butil), na dosagem de proteína, na quantificação de nitritos e nitratos e na atividade de enzimas antioxidantes.

### 3.8. AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA DOS TECIDOS

Para o exame anatomopatológico, uma porção de estômago e de fígado foi incluída em blocos de parafina, sendo posteriormente cortada em micrótomo rotativo na espessura de 5 $\mu$ m. Foram realizadas as técnicas de coloração hematoxilina-eosina e de picosírus, para avaliação histológica habitual. As lâminas foram analisadas em microscópio binocular *Nikon Labophot* nos diferentes aumentos (10 e 40x). Todas as amostras foram analisadas no departamento de Patologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA)

### 3.9. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas do homogeneizado foi determinada através do método de LOWRY et al., (1951). Esse método utiliza como padrão uma solução de albumina bovina (SIGMA) 1 mg/mL ( no caso utilizam-se volumes de 50, 100 e 150 microlitros).

Colocou-se uma alíquota do homogeneizado (20 microlitros) em 0,8 mL de água destilada e 2,0 mL do reativo C. Esse último foi preparado no momento e consistiu na mistura de 50,0 mL do **reativo A** ( NaHCO<sub>3</sub> 2% em NaOH 0,10 N), 0,5 mL do **reativo B1** (CuSO<sub>4</sub> . 5 H<sub>2</sub>O 1%) e 0,5 mL do **reativo B2** ( tartarato de sódio e potássio 2%).

Após a adição do **reativo C**, foram aguardados 10 minutos e colocou-se 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteau 2 N (Laborclin), na concentração de 1:3 em água destilada. Após 30 minutos, desenvolve a cor azul que pode ser medida espectrofotometricamente a 625 nm.

### 3.10. AVALIAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)

Neste trabalho foram utilizados dois métodos para a avaliar a LPO. Um método conhecido por TBARS, que quantifica os produtos de LPO, cujas

substâncias finais da LPO reagem ao ácido tiobarbitúrico. Este método é considerado uma mensuração indireta de LPO, pois nem todo o malondialdeído e outros aldeídos produzidos são necessariamente oriundos da peroxidação de lipídios de membrana.

O outro método utilizado para quantificar a LPO foi a quimiluminescência (QL), que avalia a capacidade de resposta da amostra frente a adição de um hidroperóxido orgânico de origem sintética. A QL é considerada um método bastante sensível para avaliação da LPO.

### **3.10.1. Determinação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)**

A técnica de TBARS consiste em medir espectrofotometricamente, sob condições ácidas, o malondialdeído através da cor do produto formado pelo aquecimento do material biológico a ser analisado na presença de ácido tiobarbitúrico (BUEGE e AUST, 1978).

Colocou-se em um tubo de ensaio 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% 0,5 mL do homogeneizado, 1,0 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67% e 0,5 mL de água destilada para atingir um volume adequado da cubeta, nesta ordem de adição. Agitou-se cada tubo e fez-se a incubação a 100°C por 15 minutos. Após a fervura, observou-se a formação do produto corado. Os tubos foram refrigerados, e foram acrescentados 3,0 mL de butanol. Depois disso, foram colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos cada e centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi colocado na cubeta do espectrofotômetro ( CARY 3E – UV – Visible Spectrophotometr Varian) para a leitura ( 535 nm).

A concentração de TBARS nos homogeneizados foi expressa em nmol por mg de proteína utilizando um coeficiente de extinção =  $156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **3.10.2. Determinação da Quimiluminescência (QL)**

O método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (hidroperóxido de tert-butil) ao homogeneizado de tecido. Avalia-se a

capacidade de resposta mediante a determinação de quimiluminescência (QL) produzida pela amostra.

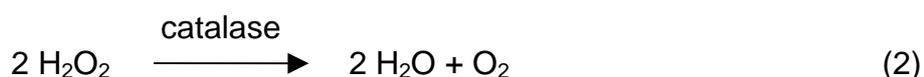
Em tecidos expostos a estresse oxidativo, o valor da QL iniciado por hidroperóxido de tert-butil (t-BOOH) é maior que o valor correspondente ao tecido em condições fisiológicas ( pré-estresse).

A QL foi medida em um contador com o circuito de coincidência desconectado, utilizando-se o canal de trítio ( Liquid Scintillation Counter, 1209 Rack beta, LKB WALLAE). Os homogeneizados de tecido (0,5 mL) foram colocados em vials de vidro de 25 mm de diâmetro por 50 mm de altura. Para evitar a fosforescência dos vials, ativada pela luz fluorescente, eles foram conservados na obscuridade até o momento do uso e as determinações em sala escura. As condições gerais do ensaio foram meio de reação, consistindo numa solução reguladora de KCl 120 mM; fosfatos 40 mM, pH 7,4, cuja concentração de proteínas do homogeneizado é, aproximadamente, 1mg/mL, concentração de t-BOOH 3mM (30 $\mu$ L). Os resultados foram expressos em contagens por segundos (cps) por mg de proteína (GONZALEZ FLECHA et al., 1991).

### **3.11. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

#### **3.11.1. Avaliação da Atividade da Catalase (CAT)**

A atividade catalase se determina pelo método de Chance (1954) (AEBI,1984). A catalase é uma hemoproteína peroxissomal que realiza a catálise do peróxido de hidrogênio, formando água e oxigênio molecular. Essa reação está demonstrada na equação 2 (LLESUY, 2002):



A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se mede espectrofotometricamente a 240 nm, e neste comprimento de onda o  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem a máxima absorbância.

Processo: a mistura de incubação contém em volume final 1000 $\mu\text{l}$  dos seguintes reagentes:

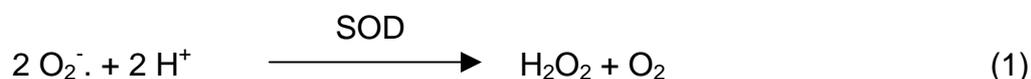
- tampão fosfato a 50mM, pH 7,4
- $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3M

Na cubeta de quartzo foram adicionados 955 $\mu\text{L}$  de tampão fosfato e 10 $\mu\text{L}$  de amostra do tecido de estômago, que foram colocados no espectrofotômetro e descontado o branco. Adicionou-se, então, 35 $\mu\text{L}$  do peróxido de hidrogênio e realizaram-se leituras em 240nm. Para o tecido de fígado, foi executado o mesmo procedimento, com alteração para 25 $\mu\text{L}$  nos volumes de amostra de tecido e de peróxido de hidrogênio concentrado.

Os resultados foram expressos em pmoles/g de tecido.

### 3.11.2. Avaliação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Foi utilizado o método de MISRA e FRIDOVICH (1972) que se baseia na inibição da formação de adrenocromo na auto-oxidação da adrenalina pela superóxido dismutase (SOD). A formação de adrenocromo é medida pela dismutação do ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio, ocorrendo a diminuição deste radical conforme reação abaixo ( equação 1 ):



A adrenalina permanece estável em soluções ácidas, porém espontaneamente se oxida em soluções básicas, favorecendo a formação do adenocromo ( equação 3 ). Quanto maior a concentração de SOD da amostra, menor a auto-oxidação da adrenalina. Baseando-se nesse fenômeno, a SOD se

pode medir espectrofotometricamente seguindo a mudança de absorbância da adrenalina a 480 nm, quando presencia um pico de absorção.



Processo: a mistura da reação contém em volume final de 1ml os seguintes reagentes:

- tampão de glicina (0,05 M; pH 11,0).
- amostra (homogeneizado de tecido)
- adrenalina (4mM).

A absorbância foi medida a 480nm, na temperatura de 30°C. Elaborou-se uma reta padrão com concentrações crescentes de SOD ( 10, 25 e 75µL) para determinar a qual concentração a mesma produz uma inibição na auto-oxidação da adrenalina em 50%.

Os resultados foram expressos em U/g de tecido. Uma unidade de atividade enzimática se define como a quantidade de enzima capaz de inibir a 50% a auto-oxidação da adrenalina.

### 3.12. DOSAGEM DE NITRITOS E NITRATOS

Foram utilizados 500µL de homogeneizado de estômago e de fígado para a dosagem de nitritos e nitratos. Esse método consiste na transformação de nitratos e nitritos por meio da nitrato redutase. Para isso, utiliza-se posteriormente, o reativo de Griess.

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

Após o procedimento, utilizaram-se 750 $\mu$ l dessa mistura e foram adicionados 750 $\mu$ l do reativo de Griess, incubado novamente à temperatura ambiente, durante 10 minutos.

A leitura foi realizada a 550 nm e para os cálculos foi necessário a criação de uma curva padrão para determinar nitratos e nitritos. Os valores foram expressos em  $\mu$ mol/L.

### **3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os valores individuais formaram as médias dos grupos, sendo calculado seu erro padrão. Os 4 grupos foram submetidos ao teste de Student-Newman-Keuls, sendo a diferença considerada significativa para  $p < 0,05$  ( significância de 5%). Para a análise estatística, utilizaram-se o *software Graph Pad*. Os gráficos foram desenvolvidos no *software Sigma plot*.

## 4 RESULTADOS

### 4.1. EFEITOS DO FLAVONÓIDE QUERCETINA SOBRE A HIPERTENSÃO PORTAL PRÉ-HEPÁTICA INDUZIDA POR LIGADURA PARCIAL DE VEIA PORTA – ASPECTOS GERAIS E HEMODINÂMICOS

#### 4.1.1. Alteração do parâmetro de peso corporal dos animais

Os animais SO e LPVP apresentaram aumento de peso durante o período do estudo. Enquanto que, os animais que receberam quercetina, tanto do grupo SOQ quanto dos LPVPQ, apresentaram redução de peso durante o mesmo período. Tanto a redução, quanto o aumento de peso são estatisticamente significativos (TABELAS 1 e 2)

TABELA 1: Valores médios (g) dos pesos iniciais e finais dos animais que não receberam quercetina.

Peso	n	Gramas	p
Peso Inicial	20	293,35 ± 10,2	0,006*
Peso Final	20	303,85 ± 8,8	

n = número de animais dos grupos SO e LPVP.

Dados representam média e erro padrão

\* diferença significativa do peso final comparado ao inicial  $p < 0,05$ .

TABELA 2: Valores médios (g) dos pesos iniciais e finais dos animais que receberam quercetina.

Com Quercetina	n	Média (gramas) e Erro Padrão	p
Peso Inicial	20	292,30 ± 10,5	0,022*
Peso Final	20	286,40 ± 9,4	

n = número de animais dos grupos SOQ e LPVPQ

Dados representam média e erro padrão.

\* diferença significativa do peso final vs inicial  $p < 0,05$

#### 4.1.2. Alterações de parâmetros hemodinâmicos na hipertensão portal e ação do flavonóide quercetina

##### 4.1.2.1. Pressão portal

Houve redução estatisticamente significativa na pressão portal nos grupos com LPVP que receberam quercetina. A média da pressão portal (mmHg) por grupo é apresentada na tabela 3. O aumento da pressão portal foi de 65,7% para os animais LPVP comparados ao SO. Quando se administra o flavonóide, ocorre redução de pressão portal de 19,67 para 13,01mmHg (queda de 33,4 %) (figura 9).

TABELA 3: Valores médios da pressão portal (mmHg) entre os grupos estudados.

Grupos	n	Pressão Portal(mmHg)	p
SO	9	11,87 ± 1,55	*
SO Q	7	10,84 ± 1,13	
LPVP	7	19,67 ± 1,9	
LPVP Q	9	13,01 ± 0,86	

n = número de animais. Dados representam média e erro padrão

\* Apresenta significância estatística à comparação entre a média da pressão do grupo LPVP com os demais grupos, obtendo  $p < 0,05$ .

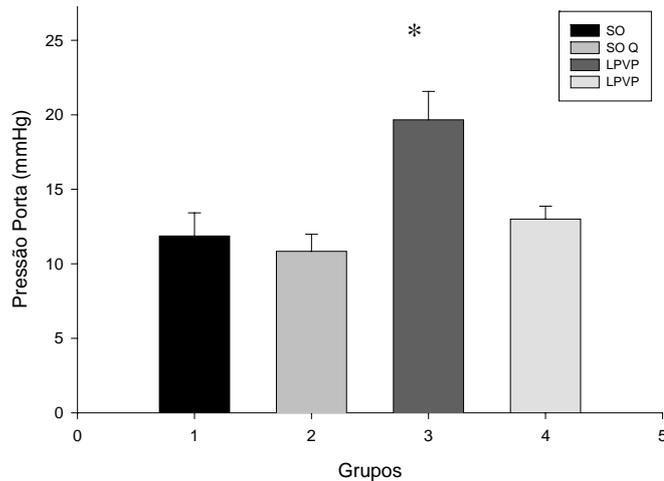


Figura 9: Média da pressão porta por grupo.  
\* Apresenta  $p < 0,05$  LPVP comparado aos demais grupos.

#### 4.1.2.2. Relação hepatossomática

Referente ao valor % correspondente do fígado em relação ao peso corporal total do animal, foi observado que animais submetidos à LPVP (independentemente de receberem ou não a quercetina) apresentaram percentuais médios menores que os animais sem ligadura parcial. Os valores estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4: Valores médios (em %) da relação hepatossomática dos grupos estudados.

Grupos	n	Relação hepatossomática (%)	p
SO	10	3,68 ± 0,08	
SO Q	10	3,41 ± 0,09	
LPVP	10	3,15 ± 0,10	*
LPVP Q	11	3,07 ± 0,13	*

n = número de animais. Dados representam média e erro padrão.

\*Apresenta significância estatística a comparação entre os grupos LPVP e LPVPQ com SO e SOQ,  $p=0,001$ .

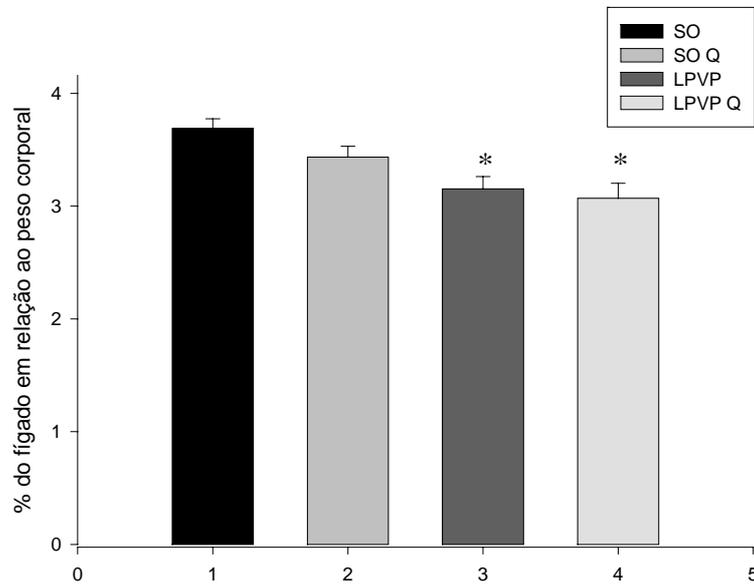


Figura 10: Relação hepatossomática nos diferentes grupos.  
# apresenta diferença significativa o grupo SO vs LPVP e LPVP Q,  $p < 0,001$ .

#### 4.1.2.3. Relação esplenossomática:

Referente ao valor correspondente do baço em relação ao peso corporal total do animal, foi observado que animais submetidos a LPVP (independentemente de receberem ou não a quercetina) apresentaram percentuais médios maiores que os animais sem ligadura parcial. Os valores estão apresentados na Tabela 5 e figura 11.

TABELA 5: Valores médios da relação esplenossomática dos grupos estudados.

Grupos	n	Relação esplenossomática (%)	p
SO	10	0,27 ± 0,02	
SO Q	11	0,27 ± 0,02	
LPVP	10	0,34 ± 0,02	
LPVP Q	10	0,36 ± 0,02	*

n = número de animais, dados representam média e erro padrão.

\*Apresenta diferença significativa o grupo LPVP Q comparado aos grupos SO e SO Q, obtendo valores para  $p=0,007$ .

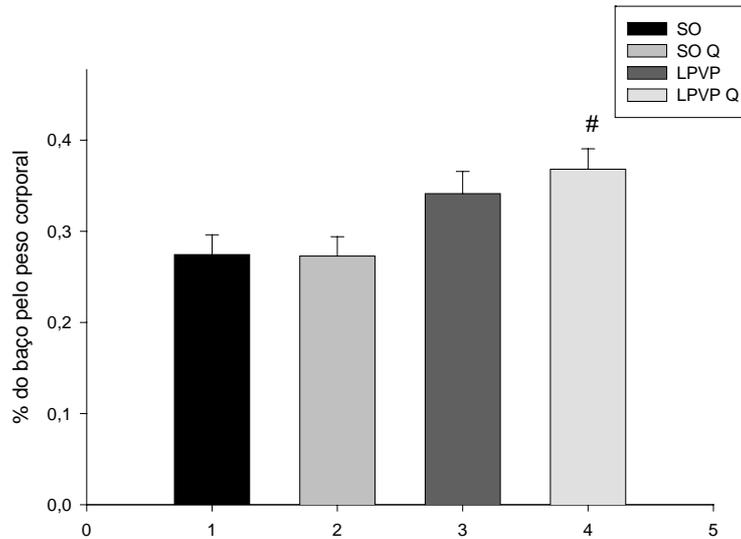


Figura 11: Relação esplenossomática nos diferentes grupos.  
# apresenta diferença significativa LPVP Q vs SO e SOQ,  $p < 0,05$ .

#### 4.1.3. Testes de função hepática (TFH)

Nos testes de função hepática (TFH) foram avaliadas a fosfatase alcalina (FA) e as transaminases (AST e ALT) expressas em U/L. Os valores encontrados para as TFH não foram estatisticamente significativos entre os quatro grupos (TABELAS 6, 7 e 8).

TABELA 6: Valores médios de AST entre os grupos estudados.

Grupos	n	AST (U/L)	p
SO	9	166,0 ± 14,6	ns
SO	10	170,5 ± 19,7	
LPVP	9	159,2 ± 21,3	
LPVP Q	10	174,0 ± 15,7	

n = número de animais, dados representam média e erro padrão.

Não apresenta significância estatística a comparação entre as médias das AST entre os grupos, com  $p > 0,05$ .

TABELA 7: Valores médios de ALT entre os grupos estudados.

Grupos	n	ALT (U/L)	p
SO	9	95,1 ± 8,0	ns
SO Q	10	70,6 ± 5,2	
LPVP	9	91,0 ± 9,2	
LPVP Q	10	72,3 ± 6,2	

n = número de animais, dados representam média e erro padrão.

Não apresenta significância estatística a comparação entre as médias das ALT entre os grupos, com  $p > 0,05$ .

TABELA 8: Valores médios de FA entre os grupos estudados.

Grupos	n	FA (U/L)	p
SO	9	191,0 ± 16,3	ns
SO Q	9	171,1 ± 14,5	
LPVP	8	170,0 ± 20,2	
LPVP Q	10	163,8 ± 28,82	

n = número de animais, valores, dados representam média e erro padrão.

Não apresenta significância estatística a comparação entre as médias das FA entre os grupos, com  $p > 0,05$ .

#### 4.1.4. Análise anatomopatológica em animais com hipertensão portal induzida por ligadura parcial de veia Porta e a ação do flavonóide quercetina.

A análise anatomopatológica foi realizada em tecidos de estômago e de fígado, pela coloração hematoxilina-eosina e picrossírius. As alterações histológicas observadas no **estômago** foram: presença de edema e vasodilatação nos animais LPVP.

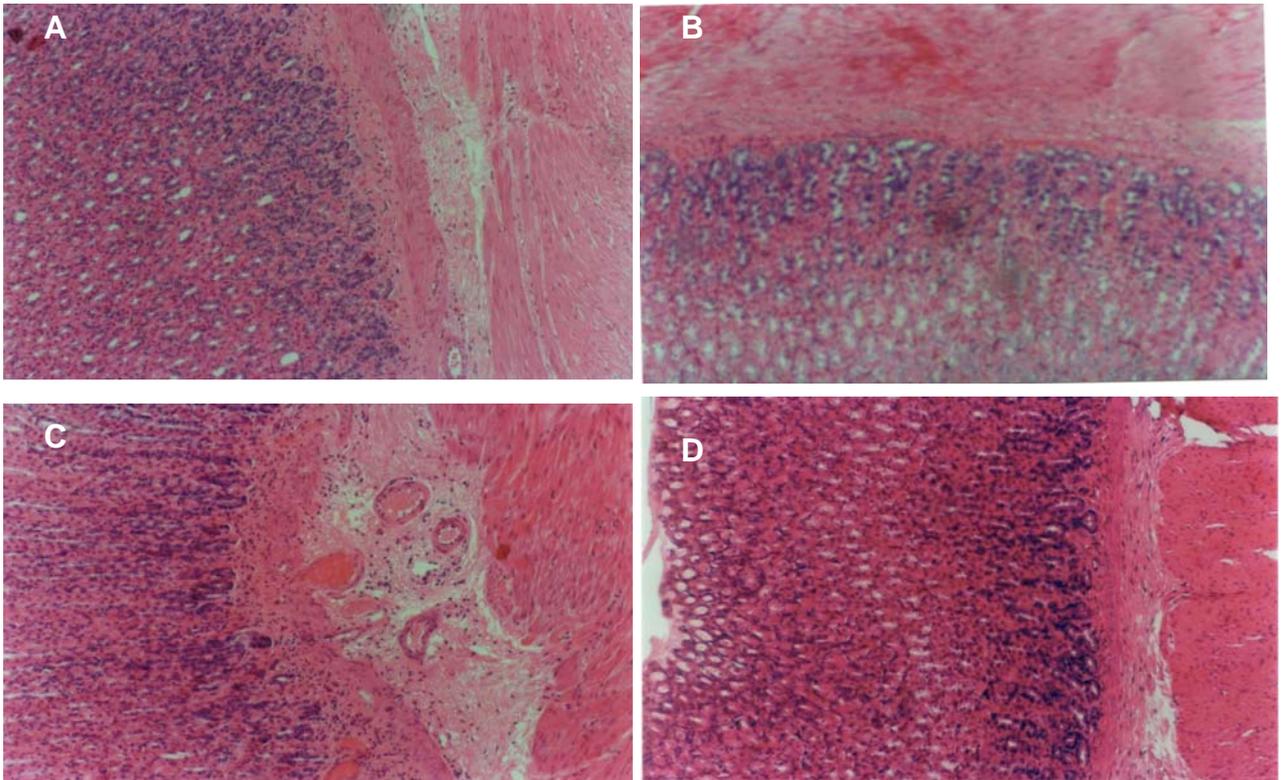


Figura 12: Fotomicrografia de estômago grupos SO (A) e SO Q (B) acima, e abaixo grupos LPVP (C) e LPVPQ (D) ( coloração hematoxilina e eosina 10x)

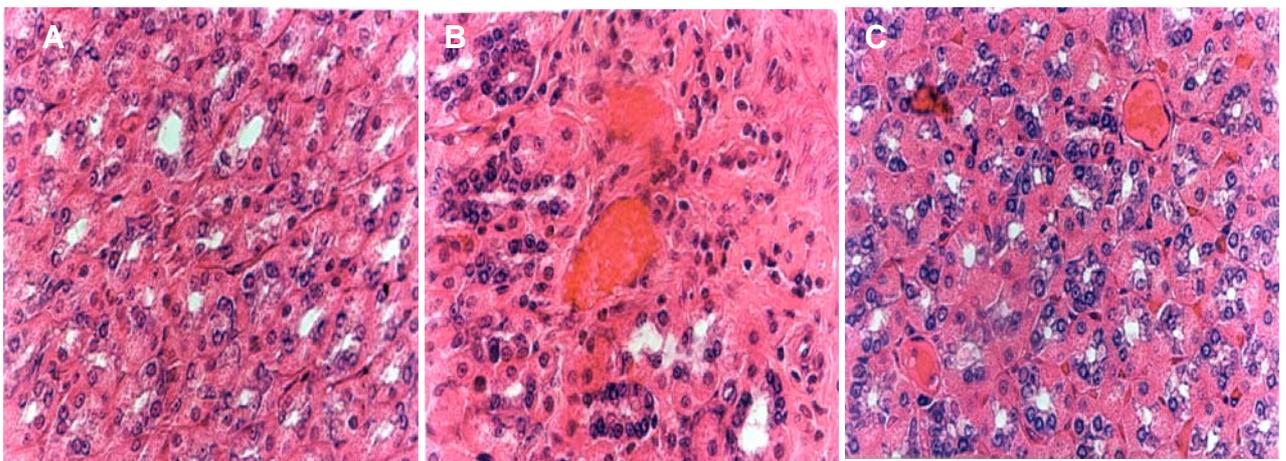


Figura 13: Fotomicrografia de estômago grupos SO (A), LPVP (B) e LPVPQ (C) (coloração hematoxilina eosina 40 x).

As figuras de 12 e 18 demonstram o aspecto histológico do estômago, para cada grupo.

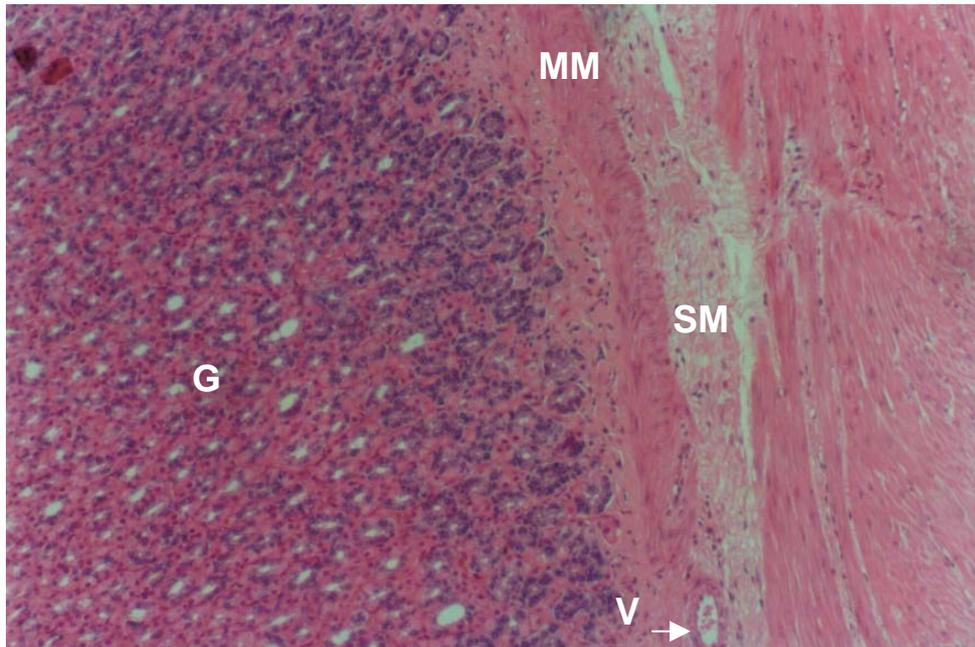


Figura 14: Fotomicrografia do estômago de animal SO, coloração hematoxilina eosina em aumento 10x. Observa-se o aspecto normal do estômago de rato, a região glandular (G), a muscular da mucosa (MM), submucosa (SM) e vaso (V).

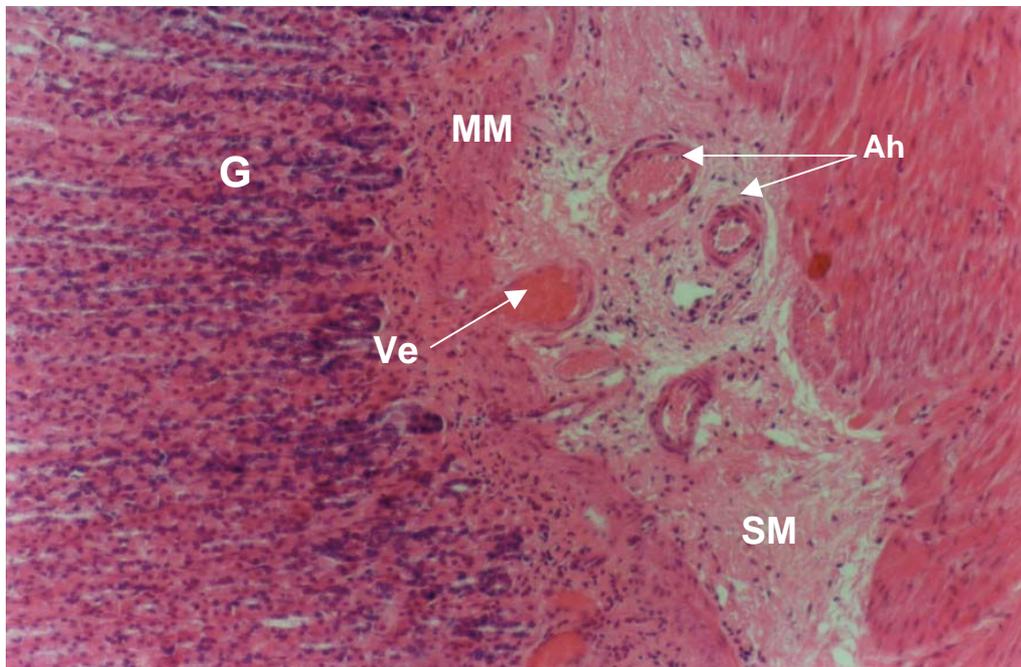
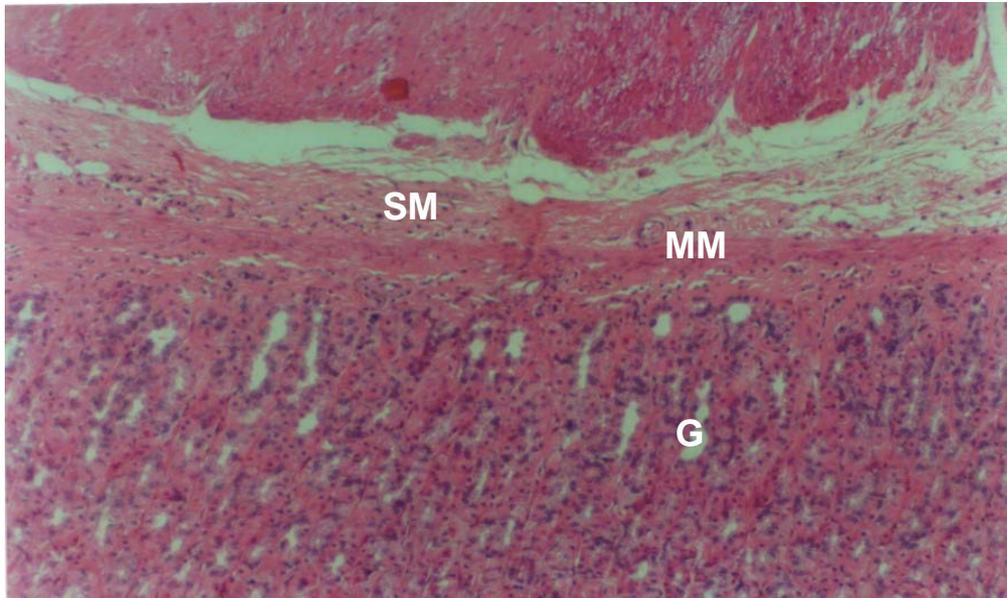


Figura 15: Fotomicrografia do estômago de animal LPVP, coloração hematoxilina eosina em aumento 10x. Observa-se distensão da Muscular da Mucosa (MM) e da região glandular (G), arteríolas com hemácias na sua luz (Ah), vênulas com sangue hemolisado (Ve) e a submucosa congesta e com edema (SM).

A análise anatomopatológica de estômago segue com a comparação entre grupos, visto nas figuras 16 a 18.

**SO**



**LPVP**

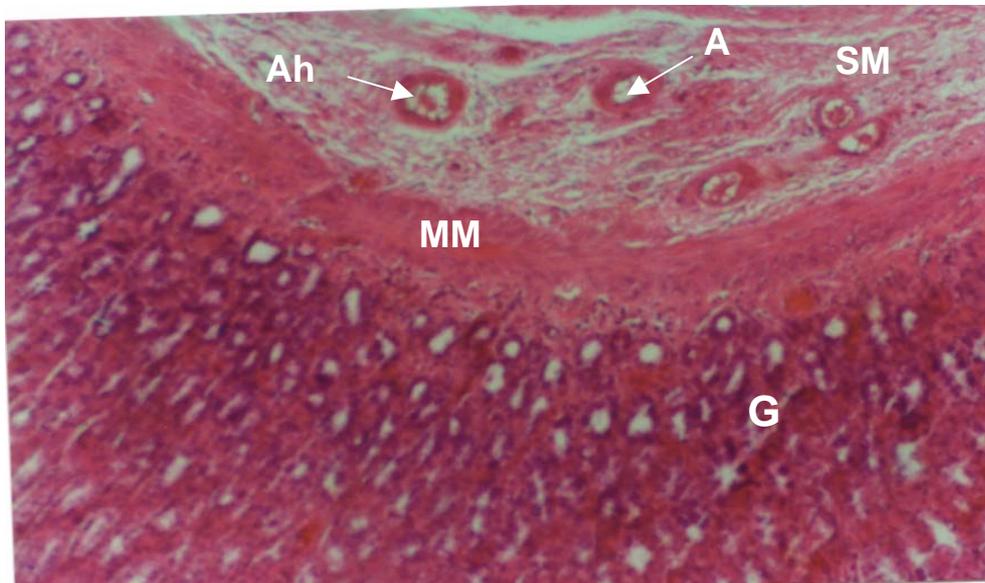


Figura 16: Fotomicrografias de estômago de animais SO e LPVP. Observa-se que o grupo LPVP apresenta arteríolas com e sem hemáceas (Ah e A), a submucosa (SM), a muscular da mucosa (MM) e a região glandular estão distendidas. Essas alterações não são observadas no grupo SO.

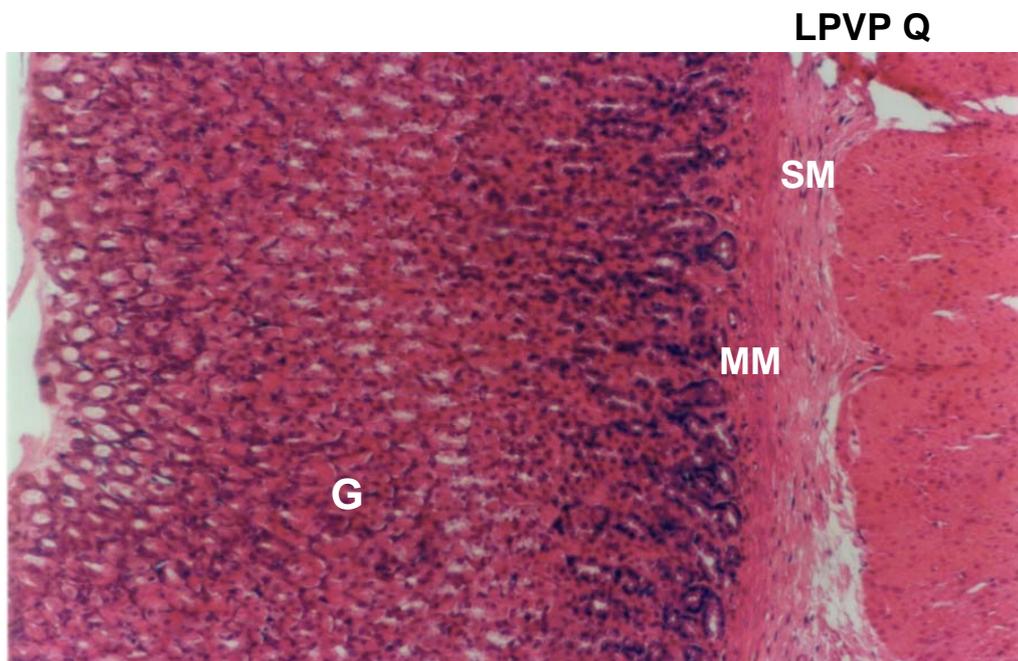
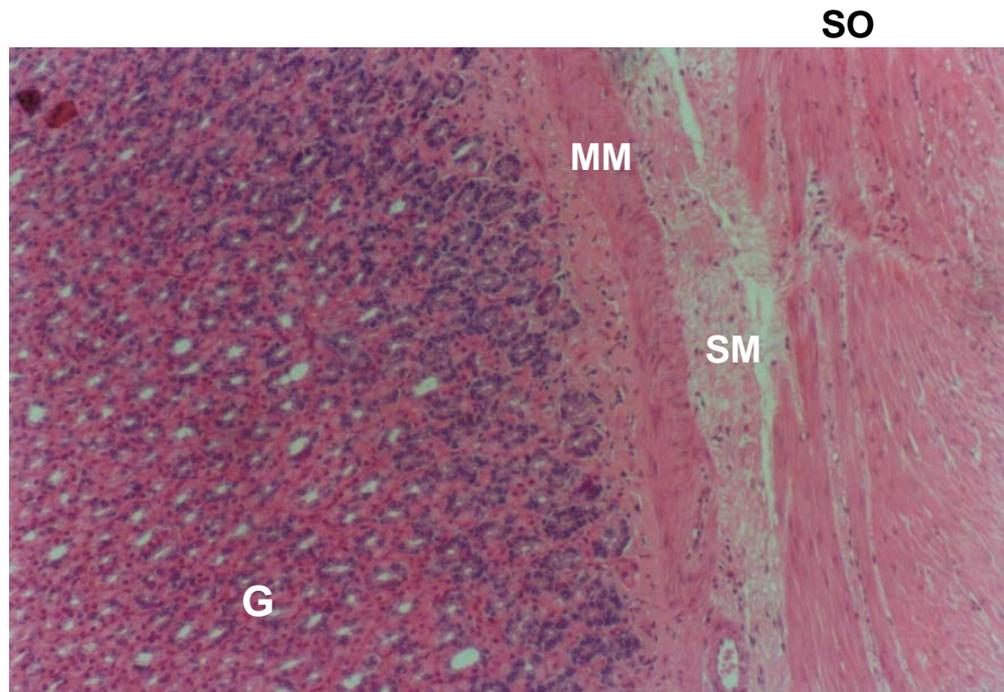


Figura 17: Fotomicrografias do estômago de animal SO e animal LPVP Q, coloração hematoxilina eosina em aumento 10x. Ambas apresentam submucosa (SM), muscular da mucosa (MM) e glandular (G) com aspecto normais.

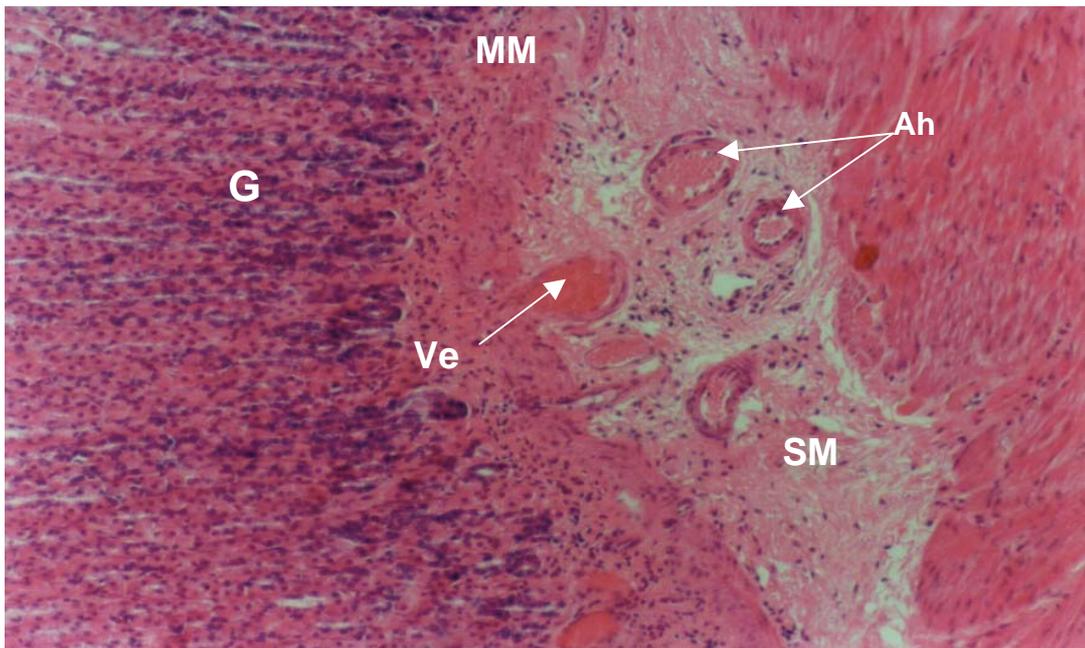
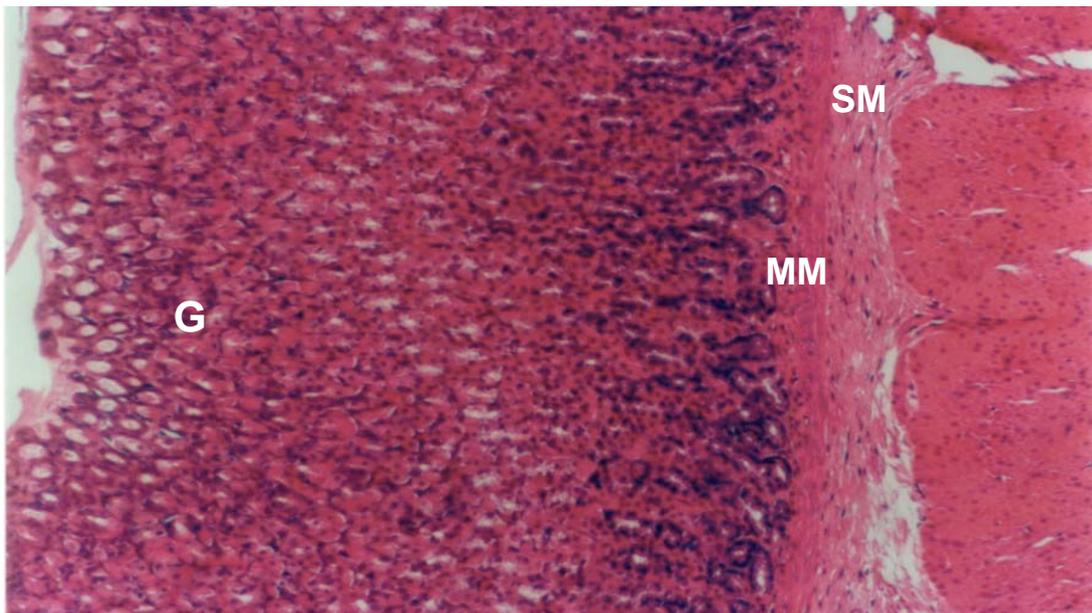
**LPVP****LPVP Q**

Figura 18: Fotomicrografias do estômago de animal LPVP e animal LPVP Q, coloração hematoxilina eosina em aumento 10x. Observa-se que o grupo LPVP apresenta submucosa (SM) com edema, muscular da mucosa (MM) e glandular (G) distendidas, vênulas (Ve) com sangue hemolisado e arteríolas com hemáceas. O grupo LPVP Q tem aspecto normal.

O **tecido hepático** não apresentou alterações histológicas entre os grupos, conforme as figuras 19 e 20.

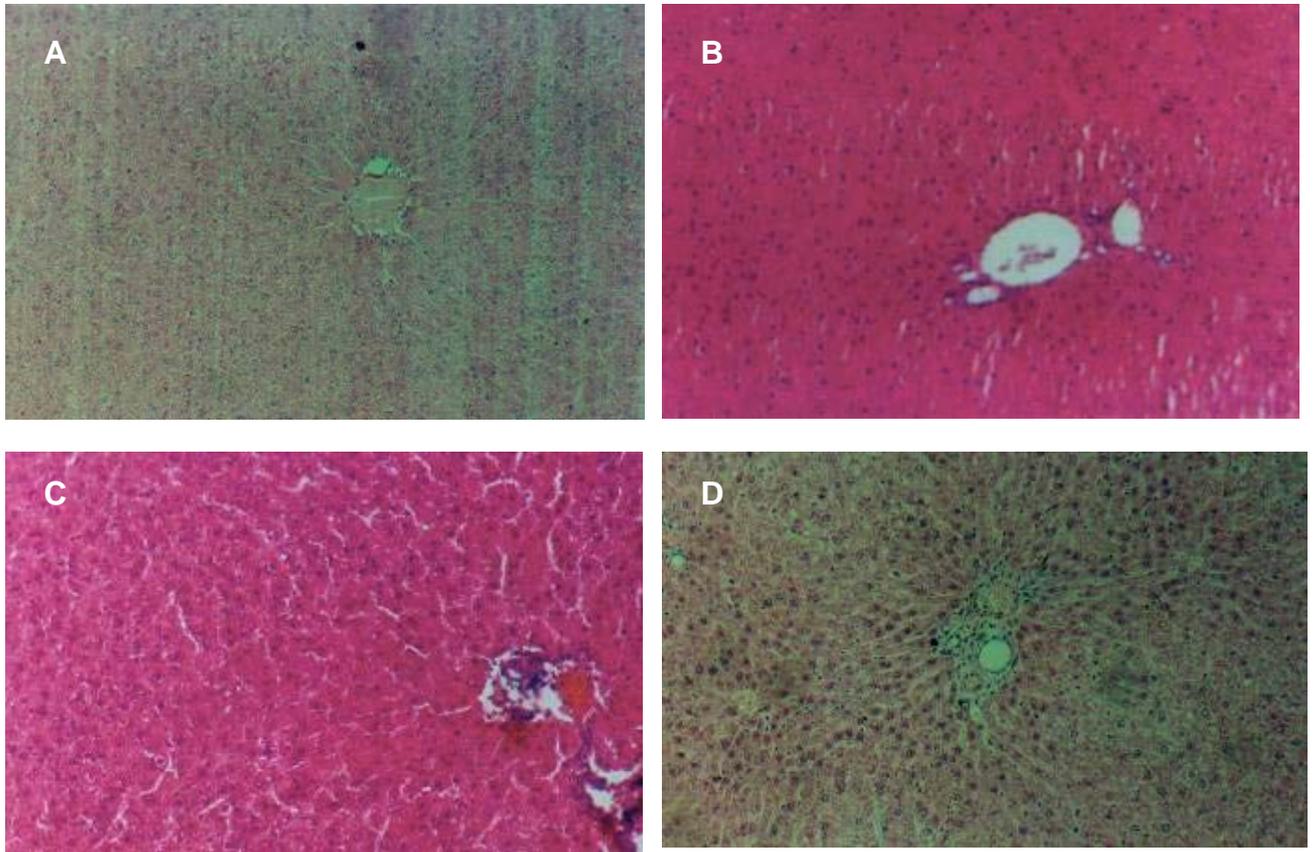


Figura 19: Fotomicrografias de fígado de animal controle (A) comparada aos grupos SO (B) acima, e abaixo, grupos LPVP (C) e LPVPQ (D) ( coloração hematoxilina e eosina 10x).

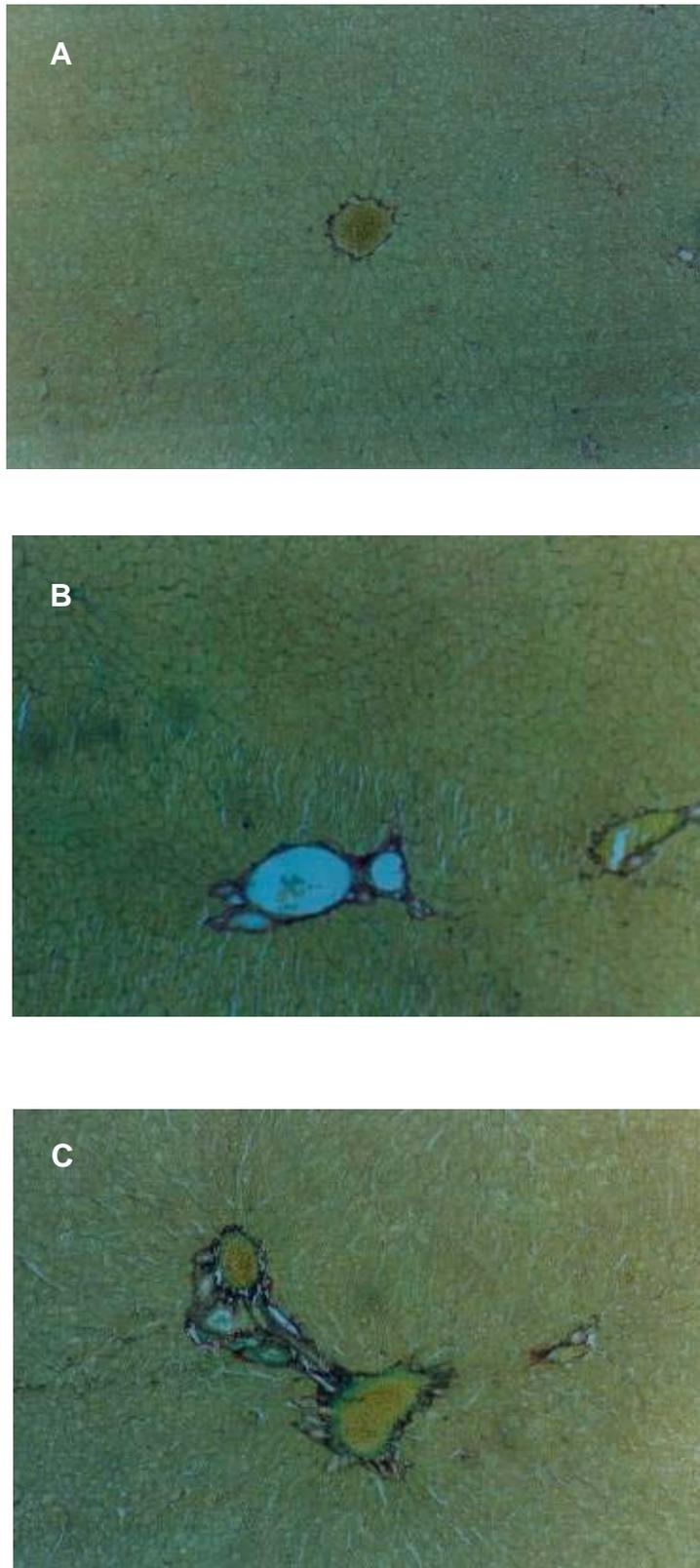


Figura 20: Fotomicrografias de fígado de animal controle (A) comparada aos grupos SO (B) e LPVP (C) (coloração picosírius 10x).

## 4.2. EFEITOS DO FLAVONÓIDE QUERCETINA EM ANIMAIS COM HIPERTENSÃO PORTAL PRÉ-HEPÁTICA INDUZIDA POR LIGADURA PARCIAL DE VEIA PORTA SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO) EM ESTÔMAGO E NO TECIDO HEPÁTICO

Para avaliar a LPO, foram utilizados dois métodos: substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quimiluminescência (QL) nos homogeneizados dos tecidos de estômago e de fígado.

### 4.2.1 Determinação do dano oxidativo no estômago através dos produtos de reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quimiluminescência (QL) e o efeito do flavonóide quercetina

A LPO no grupo LPVP foi mais elevada, sendo superior a 90%, quando comparado aos controles, enquanto os animais com ligadura, que recebiam quercetina, apresentaram redução próxima a 40% na LPO de estômago comparado ao grupo com ligadura parcial (LPVP) (figuras 21 e 22). A LPO na mucosa gástrica foi maior no grupo com LPVP comparada ao grupo LPVP Q, e esse resultado foi observado nos dois métodos, TBARS e QL, sendo estatisticamente significativo ( TABELAS 9 e 10).

TABELA 9: Valores médios de TBARS nos diferentes grupos estudados.

Grupos	n	TBARS(nmoles/mg de proteína)	p
SO	9	0,258 ± 0,04	
SO Q	9	0,219 ± 0,05	
LPVP	9	0,525 ± 0,10	*
LPVP Q	7	0,309 ± 0,06	

n = número de animais, dados representam média e erro padrão.

\* Apresenta significância estatística a comparação entre a média do TBARS do grupo LPVP com os demais grupos, obtendo  $p < 0,05$ .

TABELA 10: Valores médios de QL dos grupos estudados.

Grupos	n	QL (cps/mg de proteína)	p
SO	8	550,98 ± 72,1	
SO Q	9	535,22 ± 85,1	
LPVP	8	1109,70 ± 215	*
LPVP Q	8	673,67 ± 136	

n = número de animais. Dados representam média e erro padrão.\* Apresenta significância estatística a comparação entre a média da QL do grupo LPVP com os demais grupos, obtendo  $p < 0,05$ .

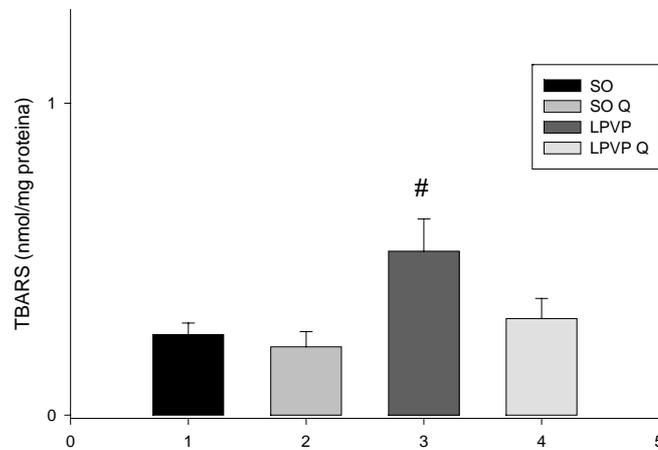


Figura 21: Valores médios de TBARS em estômago.  
# apresenta diferença significativa LPVP vs demais grupos,  $p < 0,05$ .

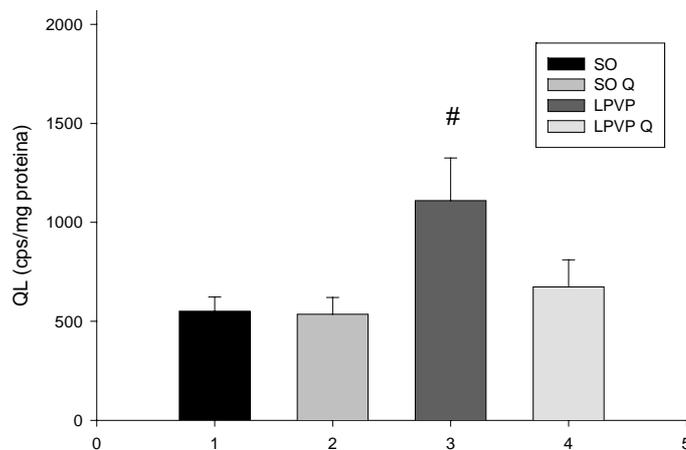


Figura 22: Valores médios de QL em estômago.  
# apresenta diferença significativa LPVP vs demais grupos,  $p < 0,05$ .

#### 4.2.2 Determinação do dano oxidativo no fígado através dos produtos de reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quimiluminescência (QL) e os efeitos do flavonóide quercetina

Foi observado através dos métodos de TBARS e QL que a LPO no fígado foi maior no grupo com LPVP, comparada aos demais grupos, sendo estatisticamente significativa para TBARS o aumento do grupo LPVP em relação aos grupos SO e SO Q (TABELA 11).

No método QL, observou-se diferença estatisticamente significativa na comparação entre o grupo LPVP com os grupos SO e LPVP Q, conforme tabela 12. Apesar de se tratar de hipertensão pré-hepática, o grupo LPVP teve aumento de 44% na LPO em fígado comparado ao controle (SO) (figuras 23 e 24).

TABELA 11: Valores médios de TBARS de fígado dos grupos estudados.

Grupos	n	TBARS (nmoles/mg de proteína)	p
SO	8	0,697 ± 0,09	
SO Q	8	0,623 ± 0,07	
LPVP	8	1,01 ± 0,11	*
LPVP Q	8	0,812 ± 0,06	

n = número de animais, dados representam média e erro padrão.

\* Apresenta significância estatística a comparação entre a média do TBARS do grupo LPVP com os grupos SO e SO Q, obtendo  $p < 0,05$ .

TABELA 12: Valores médios de QL de fígado dos grupos estudados.

Grupos	n	QL (cps/mg de proteína)	p
SO	8	3623,2 ± 646	
SO Q	8	5346,49 ± 535	
LPVP	8	6170,3 ± 656	*
LPVP Q	9	4180,9 ± 395	

n = número de animais, dados representam média e erro padrão.

\* Apresenta significância estatística a comparação entre a média da QL do grupo LPVP com os grupos SO e LPVP Q, obtendo  $p < 0,05$ .

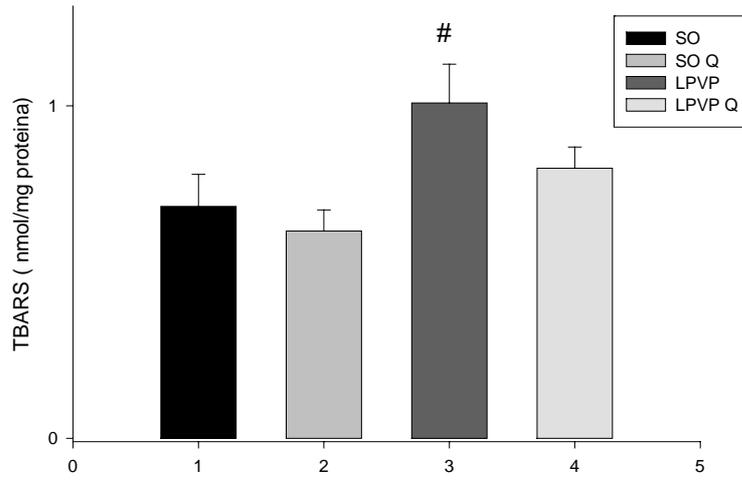


Figura 23: Valores médios de TBARS no fígado.  
# apresenta diferença significativa LPVP vs SO e SO Q,  $p < 0,05$ .

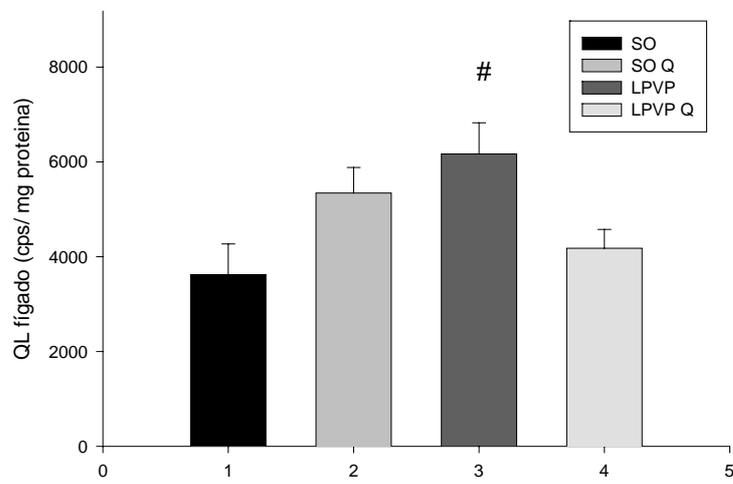


Figura 24: Valores médios de QL no fígado.  
# apresenta diferença significativa LPVP vs SO e LPVP Q,  $p < 0,05$ .

### 4.3. EFEITOS DO FLAVONÓIDE QUERCETINA EM ANIMAIS COM HIPERTENSÃO PORTAL SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA NO ESTÔMAGO E NO FÍGADO

#### 4.3.1. Determinação da atividade da catalase e SOD no estômago

A atividade da catalase e SOD foram avaliadas em homogeneizado de estômago. No estômago observou-se valores maiores para atividade da catalase no grupo LPVP comparados aos demais grupos. O aumento foi estatisticamente significativo, entre os grupos LPVP vs SO e LPVP Q (TABELA 13 e figura 25).

TABELA 13: Valores médios da atividade da CAT no estômago dos grupos estudados.

Grupos	n	CAT (pmoles/g de tecido)	p
SO	8	0,625 ± 0,15	
SO Q	7	0,739 ± 0,18	
LPVP	8	1,309 ± 0,3	*
LPVP Q	9	0,444 ± 0,08	

n = número de animais. Dados representam média e erro padrão. \* Apresentam significância estatística as médias da catalase no estômago, quando comparado o grupo LPVP com os grupos SO e LPVP Q, obtendo  $p < 0,05$ .

A atividade da SOD no estômago (TABELA 14 e figura 26), apesar da diminuição no grupo LPVP, não houve diferenças entre os grupos

TABELA 14: Valores médios da SOD no estômago dos grupos estudados.

Grupos	n	SOD (U/g de tecido)	p
SO	8	28,3 ± 4,2	
SO Q	8	30,01 ± 6,4	ns
LPVP	9	22,7 ± 1,9	
LPVP Q	9	29,09 ± 4,4	

n = número de animais. Dados representam média e erro padrão. Não apresentam significância estatística as médias da SOD no estômago, obtendo  $p > 0,05$ .

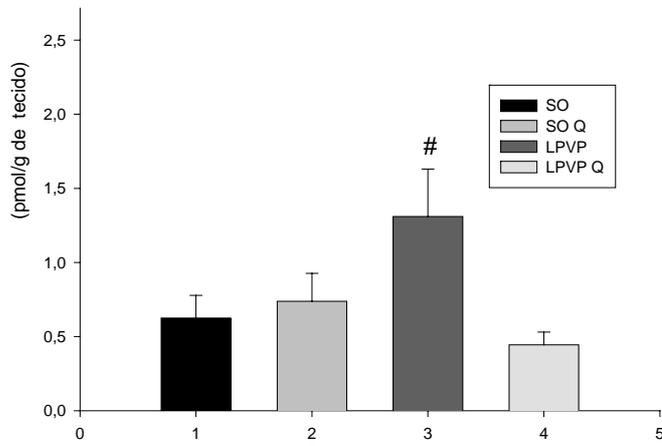


Figura 25: Valores médios da atividade da Catalase no estômago.  
# apresenta diferença significativa LPVP vs SO e LPVP Q,  $p < 0,05$ .

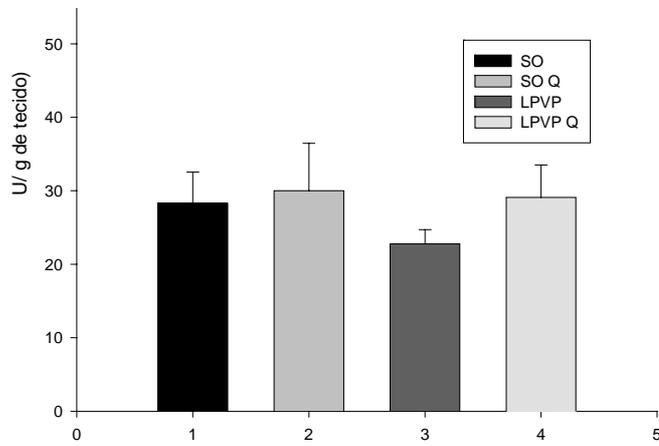


Figura 26: Valores médios da atividade da SOD no estômago.  
Não apresenta diferença significativa entre os grupos,  $p > 0,05$ .

#### 4.3.2. Determinação da atividade da catalase e SOD no fígado

A atividade da catalase e SOD foi avaliada no homogeneizado de fígado. Com base nos valores encontrados não houveram diferenças entre os grupos quando analisada a atividade da catalase no fígado ( tabela 15 e figura 27). A atividade da SOD no homogeneizado de fígado apresentou aumento nos animais com LPVP Q comparado ao controle (SO). Esse aumento é significativo, conforme a tabela 16.

TABELA 15: Valores médios de catalase no fígado.

Grupos	n	CAT(pmoles/g de tecido)	p
SO	10	0,750 ± 0,20	ns
SO Q	8	0,741 ± 0,21	
LPVP	9	1,02 ± 0,15	
LPVP Q	9	1,43 ± 0,29	

n = número de animais, dados representam média e erro padrão.

Não apresentam significância estatística as médias da catalase no fígado entre os grupos, obtendo  $p > 0,05$ .

TABELA 16: Valores médios da SOD no fígado dos grupos.

Grupos	n	SOD (U/g de tecido)	p
SO	9	4,98 ± 1,1	*
SO Q	8	4,86 ± 1,2	
LPVP	10	6,99 ± 1,2	
LPVP Q	9	16,73 ± 3,1	

n = número de animais, dados representam média e erro padrão.

\* Apresentam significância estatística as médias da SOD no fígado, quando comparado o grupo LPVP Q aos grupos SO, SO Q e LPVP, obtendo  $p < 0,05$ .

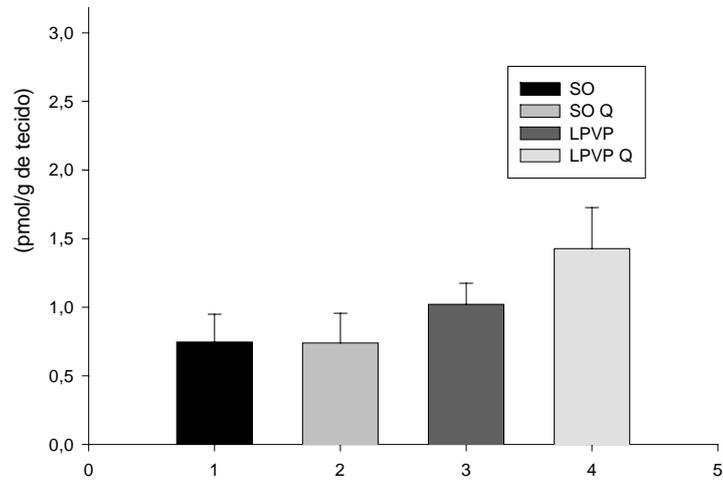


Figura 27: Valores médios da atividade da Catalase no fígado. Não apresenta diferença significativa entre os grupos,  $p > 0,05$ .

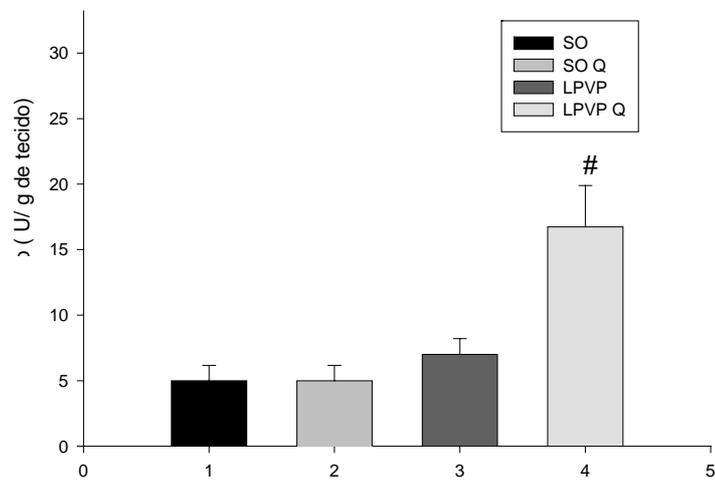


Figura 28: Valores médios da atividade da SOD no fígado. # apresenta diferença significativa LPVP Q vs demais grupos,  $p < 0,05$ .

#### 4.4. EFEITOS DO FLAVONÓIDE QUERCETINA EM ANIMAIS COM HIPERTENSÃO PORTAL SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM ESTÔMAGO E NO FÍGADO

##### 4.4.1. Determinação do NO por nitritos (NO<sub>2</sub>) e nitratos (NO<sub>3</sub>) em homogeneizado de estômago (NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub>)

Os valores encontrados para nitritos e nitratos no homogeneizado de estômago estão apresentados na tabela 17. Observa-se valores aumentados para a relação NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub> nos animais com hipertensão portal (p<0,05 comparados aos SO e LPVP Q) ( figura 29).

TABELA 17: Valores médios de NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub> no estômago nos diferentes grupos.

Grupos	n	NO <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub> ((μmol/L)	p
SO	9	82,36 ± 0,57	
LPVP	9	112,66 ± 0,55	*
LPVP Q	8	73,53 ± 0,39	

n = número de animais, dados representam média e erro padrão.

\*Apresentam significância estatística as médias de NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub> no estômago entre o grupo LPVP comparado aos grupos SO e LPVPQ, obtendo p>0,05.

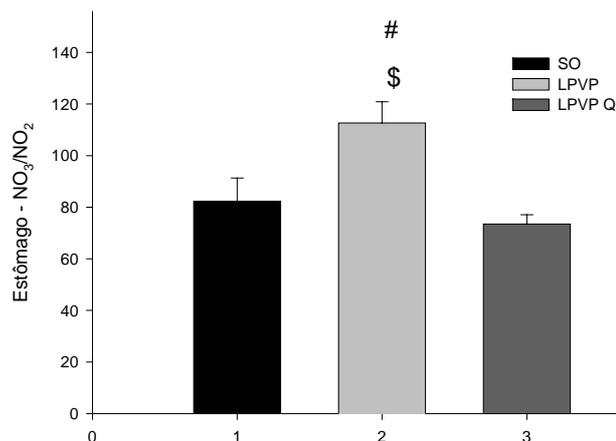


Figura 29: Valores médios da relação entre nitrato e nitrito no estômago.

# apresenta diferença significativa LPVP vs SO, p<0,05.

\$ apresenta diferença significativa LPVP vs LPVP Q, p<0,01.

#### 4.4.2. Determinação do NO por nitritos (NO<sub>2</sub>) e nitratos (NO<sub>3</sub>) em homogeneizado de fígado (relação NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub>)

Os valores encontrados para a relação NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub> estão apresentados na tabela 18. Observa-se valores reduzidos nos grupos com LPVP comparados ao grupo SO (p<0,05 SO vs LPVP e LPVP Q) (figura 30)

TABELA 18: Valores médios de NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub> dos grupos estudados.

Grupos	n	NO <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub> (μmol/L)	p
SO	11	129,5 ± 0,4	
LPVP	11	79,70 ± 0,5	*
LPVP Q	9	88,05 ± 0,5	*

n = número de animais, dados representam média e erro padrão.

\* Apresentam significância estatística as médias do NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub> no fígado entre o grupo SO comparado aos grupos LPVP e LPVP Q, obtendo p<0,05.

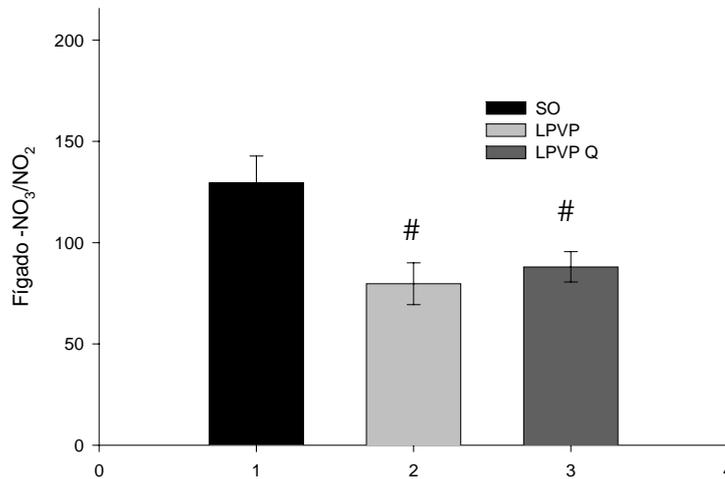


Figura 30: Valores médios da relação entre nitrato e nitrito no fígado. # apresenta diferença significativa SO vs LPVP e LPVP Q, p<0,05.

## 5. DISCUSSÃO

O fator primário fisiopatológico da hipertensão portal (HP) é o incremento da resistência ao fluxo sanguíneo portal, determinado, em parte, pela alteração da arquitetura estrutural do fígado, nos casos de cirrose hepática e pela redução parcial da luz da veia porta, nos casos de obstrução parcial do vaso (GRAUPERA et al., 2003; BOSCH et al., 2003).

Neste estudo, o mecanismo para aumentar a resistência ao fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, a pressão portal, foi a ligadura parcial da veia porta (LPVP). Este modelo se caracteriza por uma hipertensão portal pré-hepática, onde a estrutura morfológica do fígado está preservada, porém a veia porta encontra-se parcialmente obstruída, provocando um estado de circulação hiperdinâmica nos vasos que formam o sistema venoso portal (SILKULER et al., 1985; SHERLOCK et al., 2002).

Neste trabalho foram analisados o peso corporal, as alterações hemodinâmicas provocadas pela HP, a função hepática, a histologia, a lipoperoxidação (LPO), as enzimas antioxidantes e os nitritos e nitratos no estômago e no fígado. Foram também avaliados esses mesmos parâmetros sob a ação do flavonóide quercetina.

Em relação ao peso inicial e final dos animais estudados, pôde-se observar que os que receberam quercetina apresentaram redução de seu peso de forma significativa. Tal perda de peso deve ser investigado em estudos posteriores, pois não foi encontrada na literatura nenhuma citação sobre esse efeito. Todas as obras

consultadas não mencionavam que a quercetina teria ação sobre o comportamento alimentar, que poderia resultar em redução de peso. Sabe-se que o flavonóide apresenta em sua estrutura uma molécula de glicose acoplada em um de seus anéis, portanto devido à presença da glicose, talvez o animal tenha menor necessidade energética, reduzindo, assim, sua ingesta. Para propor qualquer suposição será necessário um estudo controlado e delineado para esta variável.

Referente às alterações hemodinâmicas foram analisadas a pressão portal, os metabólitos do NO, a relação hepatossomática e esplenossomática.

A pressão portal nos animais submetidos à ligadura parcial da veia porta (LPVP), após 15 dias, apresentou aumento comparada à dos animais do grupo controle. Os animais LPVP que receberam quercetina (LPVP Q) obtiveram valores médios para pressão portal próximos dos controles (SO), com diminuição de 33% em comparação ao grupo LPVP.

Salienta-se que, além da redução parcial do vaso, o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica é fator fundamental para a manutenção do estado de HP. WIEST et al., (1999a), demonstraram que até o 4º dia de pós-operatório os ratos LPVP não apresentavam circulação hiperdinâmica, porém apresentavam incremento na liberação de NO, o que sugere que o aumento na produção de NO precederia o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica.

Com base em estudos experimentais, a circulação hiperdinâmica inicia-se próximo ao 8º dia de ligadura e, é a partir deste momento que a HP se estabiliza (SILKULER et al., 1985). Por esta razão administramos o flavonóide a partir do 8º dia de pós-operatório, para coincidir com o uso da quercetina, com a estabilização da hipertensão portal e com o início da formação da circulação hiperdinâmica.

Acreditamos que a intervenção com a quercetina, coincidente com o início da formação da circulação hiperdinâmica, foi o ponto chave para o controle da hipertensão portal. Foi observado, em estudos anteriores que o fluxo sanguíneo venoso portal aumentado, resultante da vasodilatação arteriolar, contribui para a manutenção e agravamento da hipertensão portal. Nestes trabalhos foi proposto,

como forma terapêutica, a utilização de vasoconstritores esplâncnicos e vasodilatadores intrahepáticos (GARCIA-PAGAN et al., 1999; CAHILL et al., 2001; ABRALDES et al., 2003)

Em resposta à obstrução venosa ocorre alteração do fluxo sanguíneo, o que contribui para o desenvolvimento dos vasos colaterais portoportais, que normalmente contornam a área obstruída, e, como conseqüência, o fluxo arterial hepático aumenta. Esta adaptação poderia ser responsável pela manutenção da morfologia e da perfusão hepática, dentro dos parâmetros da normalidade ( SARIN et al., 2002).

FERNANDO et al., (1998) demonstraram que N-acetilcisteína (NAC), um antioxidante, prevenia a circulação hiperdinâmica em animais com LPVP e reduzia, assim, a hipertensão portal. Eles avaliaram os nitritos e nitratos plasmáticos, conhecidos como produtos finais do metabolismo do óxido nítrico, e observaram que animais que receberam NAC apresentaram valores similares aos do grupo controle, enquanto que no grupo com HP os valores de nitratos plasmático eram aumentados, propondo que a circulação hiperdinâmica fosse resultado do excesso da produção de NO plasmático.

Na circulação hiperdinâmica, o aumento do fluxo sanguíneo pode desencadear aumento na força de cisalhamento no interior do leito vascular, a qual gera um estímulo exagerado na síntese de NO. Essa condição pode ser normalizada pela redução do fluxo sanguíneo esplâncnico, pois com menor estresse de cisalhamento, a produção de NO retorna aos valores normais (FERNANDO et al., 1998).

Para estudar esse aspecto, mensurou-se em homogeneizado de estômago e de fígado os níveis de nitritos e nitratos, que, são produtos do metabolismo do NO e marcadores da sua síntese (FERNANDO et al., 1998).

Neste trabalho foi registrado que a quercetina tem efeito sobre o NO, uma vez que os animais que receberam o flavonóide obtiveram valores médios de  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  semelhantes aos do grupo controle, enquanto o grupo LPVP apresentou aumento

nos valores de  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  em homogeneizado de estômago. Esses resultados corroboram com a proposta de que vasodilatadores, entre eles NO, em quantidades aumentadas, contribuem para o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica e são responsáveis pela manutenção do estado de hipertensão portal e da alteração gástrica caracterizada clinicamente como gastropatia da hipertensão portal.

CALIXTRO (2001), em uma revisão sobre os efeitos pré-clínicos das plantas, refere que a quercetina teria capacidade de suprimir o excesso de NO. Nossos dados sugerem que a quercetina controlou a hipertensão portal pela normalização do NO na região esplênica, assim prevenindo o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica.

BANERJEE et al., (2002) investigaram os efeitos dos flavonóides sobre a atividade e a expressão da iNOS. Eles verificaram que células estimuladas por citocinas aumentavam a produção de NO, e, quando pré-tratadas com quercetina, reduziam os valores na produção de NO em relação aos controles. Sobre a expressão da proteína iNOS, a quercetina teve potente ação inibitória, porém não teve a mesma ação sobre a expressão da iNOS mRNA.

Estudos iniciais, avaliando o papel do NO, realizados por GÁRCIA-PAGÁN et al., (1994) com animais com HP por LPVP e tratados com L-NAME, demonstraram menor formação de uma circulação hiperdinâmica até o 4º dia pós-ligadura. Porém os parâmetros hemodinâmicos como fluxo sanguíneo, pressão portal e resistência periférica eram incrementados a partir do 8º dia pós-ligadura, mesmo mantendo a administração do inibidor da biossíntese do NO. Esses autores concluíram que o uso do L-NAME retarda, mas não previne a vasodilatação esplênica em animais com LPVP, sugerindo que outros fatores possam estar envolvidos.

Outros estudos realizados em nosso laboratório associaram quercetina a inibição do NO, entre eles, PAVANATO et al., (2003) evidenciaram que a quercetina em modelo de cirrose por  $\text{CCl}_4$  i.p. inibia a iNOS em fígado de rato.

CHEN et al., (2001) demonstraram que, *in vitro*, a quercetina teve ação inibitória sobre a produção de NO induzida por LPS, por bloquear a expressão do gene iNOS em macrófagos.

Em nosso estudo foram observados comportamentos distintos quanto aos metabólitos do NO em diferentes tecidos. Enquanto, no estômago, os animais LPVP apresentaram aumento da relação  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$ ; no tecido hepático, os valores para esta relação foram inferiores ao grupo SO. Esses dados sugerem déficit de NO no tecido hepático de animais com ligadura parcial de veia porta.

Existem muitas evidências experimentais que demonstram o incremento da síntese de NO em modelos de cirrose hepática. Das inúmeras verificações descritas na literatura, o incremento das concentrações plasmáticas de nitritos/nitratos é a mais observada em modelos de cirrose por  $\text{CCl}_4$  ou ligadura do ducto biliar e ligadura da veia porta. Entretanto, quando comparada a expressão da NOS entre dois modelos distintos, foi observado que a expressão da NOS era mais acentuada em ratos cirróticos por  $\text{CCl}_4$  do que nos animais com ligadura parcial de veia porta, indicando que o efeito do NO pode estar mais marcado em um ou outro modelo animal (FARZANEH-FAR e MOORE, 2001).

SZABO et al., (1994) apresentaram que o baixo nível de NO produzido por eNOS era citoprotetor e mantinha a microvasculatura do fígado, enquanto que os altos níveis de NO produzidos por iNOS eram mediados por citotoxinas. As forças pelas quais o NO pode ser danoso aos hepatócitos são, ou pela inibição da função mitocondrial ou pela combinação com ânion superóxido, produzindo  $\text{ONOO}^-$ , que é um potente agente oxidante (RADI et al., 1991; RICHTER et al., 1994).

Além de evidências do envolvimento da eNOS ou da iNOS, como responsáveis pelo aumento da produção de NO na circulação hiperdinâmica de ratos com LPVP, surge uma terceira possibilidade ligada a fatores neurais. SONG et al., (2002) estudaram tecido cerebral de ratos com LPVP e verificaram significativo aumento da proteína produtora do gene c-fos, e que este incremento na sua expressão precedia o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica. Eles então sugeriram que a ativação do núcleo central, através do gene c-fos, é fator

necessário para a formação da circulação hiperdinâmica. Esses resultados demonstram que existe uma ligação das doenças hepáticas com fatores neurais.

É necessário salientar que, em todos os estudos nos quais a quercetina atuou com efeito inibitório, existia uma situação de aumento na atividade ou na expressão da iNOS. SHEN et al., (2002) observaram que a quercetina não inibia a expressão basal de iNOS e nem da proteína COX. Porém, após incubação com LPS, ocorria um drástico aumento na expressão da proteína iNOS que, após tratamento com quercetina, era significativamente inibida.

Na relação hepatossomática, foi verificado que os animais LPVP, independente de receberem quercetina, apresentaram redução no tamanho do fígado, comparado aos animais não ligados. FERNANDO et al., (1998) verificaram que animais com LPVP e com uso de NAC tiveram redução no peso do fígado quando comparados aos controles.

Esta redução deve-se ao fato da veia porta ser responsável por 72% do sangue que vai para o fígado, os 28% restantes são supridos pela artéria hepática (SHERLOCK et al., 2002), e leva ao fígado todos os nutrientes absorvidos nos intestinos, à exceção dos componentes lipídicos, que são transportados por via linfática (AIRES et al., 1999). Através dela a glicose, os aminoácidos e a insulina chegam ao fígado (DEVLIN et al., 2000).

Em situação de obstrução venosa portal, muitos substratos, aminoácidos, fatores de crescimento e hormônios, chegam em quantidades reduzidas ao fígado, ou são desviados para a circulação sistêmica por vias colaterais. Isso acarreta prejuízos para o desenvolvimento hepático e, a longo prazo, para o organismo, pois muitos produtos não serão metabolizados, tornando-se tóxicos para outros órgãos, como a amônia para o sistema nervoso central, desenvolvendo encefalopatia porto sistêmica (DEVLIN et al., 2000).

Com a redução do fluxo venoso portal ocorre a redução dos fatores hepatotróficos (insulina e glucagon) oriundos do pâncreas (WILKINS et al., 1990; SHERLOCK et al., 2002), que diminuem a capacidade regenerativa e o

desenvolvimento dos hepatócitos, como demonstrado neste trabalho, pela redução no tamanho do fígado dos animais com LPVP.

Além da redução de fatores hepatotróficos, outros indícios que coincidem com a possível redução de substratos para o fígado são os menores valores de nitratos em homogeneizado de fígado observado nos animais com LPVP. Isso pode estar associado à redução do fornecimento de aminoácidos, que são substratos para vários produtos do metabolismo hepático. Como exemplo, pode ser citada a L-arginina, que chega ao fígado pelo sistema porta para ser convertida em NO. Caso haja redução do aporte de L-arginina, os níveis de NO intra-hepático ficam escassos (DEVLIN et al., 2000).

Sobre a relação esplenossomática foi observado que animais com ligadura parcial da veia porta, independente do uso da quercetina, apresentaram aumento no tamanho do baço. O aumento ocorreu devido à obstrução do sistema porta, que provoca represamento de sangue nos leitos vasculares tributários. A esplenomegalia ocorre em resposta ao aumento no volume de sangue na região esplâncnica, pois o baço atua como um importante reservatório sangüíneo (BLENDIS et al., 2001; SARIN et al., 2002). Pelo observado, a quercetina não teve ação sobre essa alteração hemodinâmica.

Os chamados “testes de função hepática” (TFH), como as aminotransferases ALT e AST, e as transaminases TGO e TGP ou a fosfatase alcalina (FA), são inadequadamente chamadas de testes da função, mas, na realidade, são marcadores de lesões ou de disfunções hepáticas e não avaliam nenhuma função. A manutenção da denominação “testes de função hepática” está inserida de tal maneira no jargão médico que, por tradição, é mantida no texto.

As enzimas aminotransferases, quando elevadas, sugerem disfunção hepática, relacionada às lesões de destruição de tecidos ou alteração da permeabilidade celular. A fosfatase alcalina sinaliza colestase presente nas doenças hepatobiliares (BRANDÃO e MARRONI, 2001). Os valores das TFH encontrados nos 4 grupos não diferiram estatisticamente. Isso demonstra que a

“função hepática” encontrava-se preservada; fato esperado, pois o modelo de HP utilizado foi o pré-hepático, condição que preserva a função do fígado.

Foi analisada a histologia do estômago e do fígado. A histologia do fígado foi normal nos quatro grupos, confirmando que a HP pré-hepática não promove alterações na morfologia hepática. Porém, no estômago, os animais LPVP desenvolveram vasodilatação, acrescida de edema da submucosa e muscular da mucosa distendida, além de arteríolas com hemácias e vênulas com sangue hemolisado. VILLEGAS et al., (2002) sugerem a importância das EAO em mediar distúrbios microvasculares, que precedem as lesões na mucosa gástrica.

Nos animais que receberam quercetina, foi observado que o aspecto histológico do estômago era semelhante ao dos controles (SO). Esses achados poderiam estar associados à capacidade antioxidante do flavonóide, que diminui o estresse oxidativo, protege as membranas e, conseqüentemente evita o dano tecidual. PERES et al., (2000) obtiveram resultados semelhantes, quando observaram a melhora da fibrose do fígado em ratos com cirrose biliar secundária por ligadura do ducto biliar, após o uso de quercetina na mesma dose e associaram a melhora do aspecto histológico à redução do estresse oxidativo no fígado.

Para o nosso estudo, o benefício do flavonóide foi demonstrado pela queda da lipoperoxidação (LPO) no estômago e no fígado de ratos com LPVP que receberam quercetina. Tal fato foi manifestado pela redução de 40% nos valores de TBARS e QL em homogeneizado de estômago. Dados semelhantes foram documentados por vários autores, quanto ao poder antioxidante da quercetina (HUSAIN et al., 1987; MIURA et al., 2003). FERNANDO et al., (1998) demonstraram, pela primeira vez, que a ligadura parcial da veia porta estava associada ao estresse oxidativo, e que o tratamento com antioxidante poderia reverter a circulação hiperdinâmica. BRAVO et al., (1997) utilizaram SAM e NAC em seus estudos e verificaram benefícios promovidos por antioxidantes em situações de circulação hiperdinâmica.

Assim como a NAC, outros antioxidantes, também demonstraram sua ação histoprotetora sobre as lesões gástricas. KAWANAKA et al., (2001) estudaram ratos com gastropatia da hipertensão portal, avaliaram a atividade da cinase 2 extracelular e induzida por estresse oxidativo e observaram que ela estava sendo mediada por um aumento na expressão da proteína cinase fosfatase, o que era normalizado após a suplementação com vitamina E.

GAWAD et al., (2001) registraram que a quercetina reduzia o malondealdeído (MDA) dos tecidos cerebrais de ratos infectados por lipopolissacarídeos (LPS) e apresentava forte atividade antioxidante em cultura de células.

A quercetina possui condições de estrutura e atividade favoráveis para ser um excelente varredor de EAO e de  $\text{ONOO}^-$ . Novamente, salienta-se que os resultados obtidos neste estudo mostraram que animais com LPVP, que receberam quercetina, reduziram a LPO no estômago e no fígado e apresentaram evidentes melhoras nas alterações histológicas gástricas, decorrentes da gastropatia da hipertensão portal, comparado ao grupo controle (SO).

HAGIWARA et al., (1988) explicaram os efeitos protetores da quercetina sobre a membrana, baseados no fato dos flavonóides terem atividade inibitória sobre a proteína tirosina quinase e serina/treonina.

Outra forma de explicar os efeitos da quercetina sobre a redução da LPO é que os flavonóides fenólicos possuem forte afinidade com os íons ferro. Este metal é conhecido por catalisar muitos processos de oxi-redução, que levam ao aparecimento de radicais livres (THANNICKAL et al., 2000). Os flavonóides, entre eles a quercetina, atuam, muitas vezes, como quelantes de metais de transição.

No estado de HP existe o aumento do fluxo sangüíneo, em virtude da circulação hiperdinâmica que, por sua vez, aumenta o aporte de hemoglobina e de íons ferro. Essa demanda de íons ferro favorece a oxidação por metais de transição, preconizado pela reação de Fenton e Haber-Weiss. Em contrapartida, a diminuição do hematócrito, semelhante à anemia, reduz o dano por

lipoperoxidação verificado por MARRONI et al., (1994). Essa situação poderia justificar a presença de maior LPO encontrada nos animais LPVP.

A redução univalente da molécula de oxigênio é a forma característica de formar EAO ( $O_2^-$  e  $H_2O_2$ ) e RL (radical hidroxila). O risco de formar EAO é que elas podem contribuir para a formação de outros radicais livres. Assim como existem as EAO, o metabolismo do NO gera espécies ativas nitrogenadas, nas formas  $NO_2$ ,  $N_2O_3$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$  e ONOOH. A reação do ânion superóxido com o NO, cujo produto é o peróxido nitrito (ONOO<sup>-</sup>), é a ligação entre as reações de radicais livres de oxigênio com os radicais livres de nitrogênio (BOVERIS et al., 1998).

Muitos trabalhos associam a geração de RL, EAO e espécies ativas de nitrogênio, com condições patológicas como a isquemia-reperfusão, arteriosclerose e processos inflamatórios (HALLIWELL et al., 1989; OH et al., 2001; PERALTA et al., 2001).

Em nosso estudo, observou-se que animais com HP apresentavam histologia compatível com vasodilatação e edema, sinais típicos de alterações hemodinâmicas, assim como LPO elevada, demonstrada pelo aumento nos valores de TBARS e QL em homogeneizado de estômago e de fígado. Estes dois achados sugerem que a presença da circulação hiperdinâmica tem associação na geração de RL ou EAO, e que essas moléculas são capazes de alterar os lipídios das membranas, acarretando prejuízo no funcionamento normal da célula (BRAVO et al., 1997).

Por outro lado, animais LPVP que receberam quercetina apresentaram diminuição na pressão portal em 33% comparada à pressão dos LPVP, reduziram em cerca de 40% a LPO no estômago e no fígado comparado aos LPVP, e ainda demonstraram características histológicas de estômago compatíveis às dos controles. Esses indícios reforçam as ações antioxidante e histoprotetora da quercetina.

Além de determinar o dano oxidativo, avaliado pelos métodos de TBARS e QL, foi investigada a atividade de duas enzimas antioxidantes, a catalase e a superóxido dismutase (SOD) em homogeneizados de estômago e de fígado.

Referente à catalase no estômago, observou-se aumento na atividade dessa enzima nos animais LPVP, comparados aos demais grupos, pela presença incrementada de peróxidos, como uma das formas de defesa contra  $H_2O_2$ , o qual visa equilibrar o balanço entre substâncias pró e antioxidantes (GAWAD et al., 2001). Os animais com LPVP Q apresentaram valores baixos de catalase no estômago, pela ação inibitória do flavonóide sobre o peróxido de hidrogênio.

A atividade da SOD no estômago demonstrou valores médios semelhantes nos 4 grupos, não apresentando diferença estatisticamente significativa, apesar do grupo LPVP ter apresentado incremento na LPO.

Vários trabalhos descrevem que as respostas da SOD nos diferentes tipos de estresse oxidativo são variadas, pois são tecido-dependente ou tempo-dependentes. Os resultados encontrados em nosso estudo sugerem que os níveis da atividade da SOD no estômago não são afetados, nem pela hipertensão portal, nem pela ação da quercetina, assim como sua atividade não reflete níveis de LPO (GAWAD et al., 2001).

Os fígados de animais LPVP apresentaram incremento na LPO, sinalizando a presença de radicais livres ou EAO. Apesar da LPO aumentada, não foram observadas alterações histológicas nem funcionais, sugerindo que as características inerentes ao fígado podem torná-lo mais protegido do estresse oxidativo.

No fígado, as respostas de defesas antioxidantes enzimáticas apresentaram aumento da atividade da catalase e da SOD, no homogeneizado, no grupo LPVP Q e valores menores no grupo LPVP.

No nosso estudo, os animais LPVP apresentaram menores valores nas atividades de catalase e SOD, pois a relação entre produção de RL e sua

degradação, pelas enzimas antioxidantes, depende da sua detoxificação por antioxidantes endógenos. Segundo, CORNISH et al., (2002) em uma situação de superprodução de RL ou de EAO pode ocorrer uma depleção dos estoques celulares de antioxidantes endógenos.

Por outro lado, no grupo LPVP Q, houve aumento da atividade da SOD, que sinaliza maior presença de radical superóxido, que é dismutado pela enzima SOD, formando  $H_2O_2$ . Esse novo produto é catalisado pela catalase, que neste estudo apresentou tendência em elevar seus valores, quando comparados ao controle, apesar de não ser significativo. Essa resposta demonstra uma ação do sistema antioxidante.

Em nosso estudo foi observado que os animais controle que receberam flavonóide (SO Q) não apresentaram diferenças nas medidas de LPO e nas atividades das enzimas antioxidantes nos tecidos estudados, quando comparadas ao grupo controle. Isso sugere que em atividades basais a quercetina não tem uma ação específica. Fato já descrito por PERES et al., (2000), em animais controle com o uso de quercetina.

Presume-se que o aumento na pressão portal se faz, primeiramente, pelo aumento na resistência vascular ao fluxo portal. Em um segundo momento, pelo aumento do fluxo sangüíneo venoso, decorrente da vasodilatação esplâncnica. Tal estado propicia a geração de espécies ativas de oxigênio e de aumento na lipoperoxidação nos tecidos envolvidos. A ação de um antioxidante, como a quercetina, preveniu a circulação hiperdinâmica, normalizou os níveis de NO e reduziu a pressão portal, bem como reduziu o estresse oxidativo nestes tecidos.

Os mecanismos que formam a circulação hiperdinâmica na hipertensão portal ainda não estão totalmente elucidados. Novas pesquisas poderão definir a relação entre vasoconstritores e vasodilatadores e o papel dos vasomoduladores, não só do NO, mas de outros, como a urotensina II (HELLER et al., 2002), anandamida (WIEST et al., 2002) e estudos que proponham relações com fatores neurais e as prováveis vias de sinalização das doenças hepáticas.

A comprovação das modificações na gastropatia da hipertensão portal pela ação da quercetina poderá se constituir em nova perspectiva de ação terapêutica eficaz nesta situação decorrente da hipertensão portal.

## CONCLUSÃO

Este trabalho conclui que

- o modelo experimental utilizado (LPVP) determinou aumento na pressão portal dos animais submetidos à ligadura. Entretanto, os animais LPVP, que receberam quercetina, diminuíram a pressão portal.
- animais que receberam quercetina apresentaram redução de seus pesos. Tal constatação deverá ser melhor estudada para posteriores conclusões.
- os animais SO que receberam quercetina não apresentaram alterações nos parâmetros analisados em relação ao controle. Tal fato sugere que a quercetina não tem ação em animais normais.
- os animais do grupo LPVP apresentaram aumento do baço e redução do fígado. A quercetina não apresentou efeito sobre a esplenomegalia e sobre a redução do fígado.
- o modelo experimental manteve a função hepática dentro de valores fisiológicos para TFH. O uso da quercetina não altera a função hepática.
- o aspecto histológico do estômago mostra a presença de sinais de hemorragia, vasodilatação e edema nos animais LPVP. Essas alterações foram revertidas nos animais LPVP que receberam quercetina.

- animais LPVP apresentaram maior LPO, expressos pelas avaliações de TBARS e QL.
- a administração do antioxidante, quercetina, demonstrou ser efetiva, reduzindo a LPO, juntamente com a redução da pressão e dos danos teciduais.
- os animais LPVP apresentaram aumento da atividade da enzima catalase no estômago, e a quercetina reduziu a atividade da catalase. A atividade da enzima SOD no fígado foi incrementada nos animais LPVP Q.
- animais com LPVP, ao desenvolverem a HP, apresentam maiores valores para metabólitos do óxido nítrico no estômago, sinalizando a presença de um vasodilatador que contribui para o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica, resultando na manutenção da HP. Quando administrada a quercetina, os valores médios dos metabólitos do NO voltam a índices semelhantes ao grupo SO.
- os animais LPVP (com ou sem quercetina) apresentam menores valores de metabólitos do NO no fígado: a LPVP parece reduzir a demanda de substratos oriundos da região esplânica para o sistema porta, justificando a redução do peso do fígado nestes animais, fatos que necessitam de estudos posteriores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRALDES, J.G.; TARANTINO, I.; TUNES, J.; GARCÍA-PAGÁN, J.; BOSCH, J.; RODÉS, J. Hemodynamic response to pharmacological treatment of portal hypertension and long-term prognosis of cirrhosis. **Hepatology**, 37, april, 902-908, 2003.

ACKER, S.A.B.E.; BERG, D.J.; TROME, M.N.J.L.; GRIFFION, D.H.; BENNEKOM, W.; VIJGH, W.J.F.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Bio Med**, vol 20:3, p.331-342, 1996.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Method Enzymol.** 105: 121-126; 1984

AFANAS, E.; OSTRACHVITCH, E.; ABRAMOVA, N.; KORKINA, L. Different antioxidant activities of bioflavonoid rutin in normal and iron-over loading rats. **Biochem Pharmacol**, vol 50:5, p.627-635, 1995.

AIRES, M.M. **Fisiologia**, Guanabara Koogan, 2ª ed., RJ, 1999.

ARIAS, I.M.; SHAFRITZ, D.A.; BOYER, J.L.; FAUSTO, N.; SCHACHTER, D. **The liver – Biology and pathobiology**, 3ª ed. NY, 1994.

BANERJEE, T.; VLIET, A.V.; ZABOH, V.A. Downregulation of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line. **Prostag, Leukotr and Ess** 66 (5), 485-492, 2002.

BLENDIS,L.; WONG,F. The hyperdynamic circulation in cirrhosis: an overview. **Pharmacol Therapeu**, 89, 221-231, 2001.

BOSCH, J. Pharmacological treatment of portal hypertensive gastropathy. **International Club for Portal Hypertension Studies Gastric Lesions in Patients with Cirrhosis**, Toulouse, France, out, 1991.

BOSCH, J.; PIZCUETA, P.; FEU, F.; FERNÁNDEZ, M.; GARCIA-PAGÁN, J. Clínica de Gastroenterologia da América do Norte. in **Fisiopatologia da Hipertensão Portal**. Vol 1, 1992

BOSCH, J.; ABRALDES, J.; GROSZMANN, R. Current management of portal hypertension. **J Hepatol**, 38: 54-68, 2003

BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues . **Medicina (Buenos Aires)**, 58, 350-356, 1998.

BRANDÃO,A.B.M. e MARRONI, C.A. Testes de Função Hepática in Mattos A e Dantas, W. **Compêndio de Hepatologia**, São Paulo, Ed Fundo Editorial BYK 2<sup>a</sup> edição, 2001

BRAVO,A.;PASTOR,A.;ALMAR,M.;COLLADO,P.S.;GONZALEZ-GALLEGO,J., Effects of s-adenosylmethionine and N-acetylcysteine on the histological changes induced by biliary obstruction in the rat. **Biomed Res**, 18; 279-286, 1997.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza, Ed. ACRIBIA, 1991.

BUEGE,J.A ; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Method Enzymol**. v52, 302-309, 1978.

- CAO, G.; SOFIC, E.; PRYOR, R. Antioxidant and Prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Bio Med**, vol. 22:5, p.749-760, 1997.
- CAHILL,P.A.; REDMOND,E.; SITZMANN, J. Endothelial dysfunction in cirrhosis and portal hypertension. **Pharmacol Therapeu**, 89, 273-293, 2001.
- CASADEVALL, M.; PANÉS, J.; PIQUÉ, J.M.; MARRONI, N.; BOSCH, J.; WHITTLE, B.J.R. Involvement of nitric oxide and prostaglandins in gastric mucosal hyperemia of portal hypertensive anesthetized rats. **Hepatology**, vol. 18:3, p. 628-634, 1993.
- CASADEVALL, M.; PANÉS, J.; PIQUÉ, J.M.; BOSCH, J.; CIERRA, I.; GOLDIN, E.; ELIZALDE, I.; MARTÍNEZ-CUESTA, M.A; RODÉS, J. Increased blood hemaglobin attenuates splanchnic vasodilation in portal hypertensive rats by nitric oxide inactivation. **Gastroenterology**, 110, p. 1156-1165, 1996.
- CASTRO E SILVA,O.; ZUCOLOTO,S.; JR BEER, A. **Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia**, Robel Editora, 1998.
- CHEN, C.K.; ASCIAK, C.P. Vasorelaxing activity of reveratrol anal quercetin in isolated rat aorta. **Gen. Pharmacol Vasc**, 27(2), 363-366, 1996.
- CHEN. Y. C.; SHEN, S.C.; LEE, W.R.; HOU, W.C.; YANG, L.L.; LEE,I.S.F. Inhibition of NOS inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NO synthase and cyclooxygenase 2 gene expressions by rutin, quercetin and quercetin pentaacetate in RAW 264,7 macrophages. **J Cell Biochem**. 82: 537-548; 2001.
- CORNISH, K.M.; WILLIAMSON, G.; SANDERSON, J. Quercetin metabolism in the lens: role in inhibition of hydroge peroxide induced cataract. **Free Radical Bio Med**, 33, (1), 63-70, 2002
- COSTANZO, L.S. **Fisiologia**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins – Patologia: estrutural e funcional**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000.

DAY, A.; MELLON, F.; BARRON, D.; SARRAZIN, G.; MORGAN, M.; WILLIAMSOM, G. Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasm metabolites of quercetin. **Free Radical Res**, vol 35, p 941-952, 2001.

DEVLIN, T.M., **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**, Ed. Edgar Blücher, 4<sup>a</sup> ed, 2000.

EVORA, P.R.B.; PEARSON, P.J.; DISCIGIL, B.; SECCOMBE, J.F.; SCHAFF, H.V. Endotélio e óxido nítrico: história, fisiologia e as primeiras observações relacionadas com a hipertensão arterial. **Hiperativo**, vol 2: 2, p.9-21, 1995.

FAR-FARZANEH,R.; MOORE, K. Nitric oxide and the liver. **Liver**, 21, 161-174, 2001.

FAVIER, A.E.; CADET, J.; KALYANARAMAN, B.; FONTECAVE, M.; PIERRE, J.L. **Analysis of free radicals in biological systems**. Basel, Boston, Berlin, Birkhäuser, 1995.

FERNANDO, B.; MARLEY, R.; HOLF, S.; ANAND, R.; HARRY, D.; SANDERSON, P.; SMITH, R.; HAMILTON, G.; MOORE, K. N-acetylcysteine prevents development of hyperdynamic circulation in portal hypertensive rat. **Hepatology**, 28, 689-694, 1998.

FIGUEROA, M.O. L.; CAAMAÑO, C.; MORANO, M.I.; RONN, L.C.; AKIL, H.; WATSON, S.J. Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria. **Biochem Bioph Res Co**, 272:129-133, 2000.

FORMICA, J.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food Chem Toxicol**, vol 33:12, p1061-1080, 1995.

- GARCIA-PAGÁN, J.C.; FERNÁNDEZ, M.; BERNADICH, C.; PIZCUETA, P.; PIQUÉ, J.M.; BOSCH, J.; RODÉS, J. Effects of continued no inhibition on portal hypertensive syndrome after portal vein stenosis in rat. **Am J Physiol Gastr L** 267:(30), p.984-990, 1994.
- GARCIA-PAGÁN, J.C.; ESCORSELL, A.; MOITINHO, E.; BOSCH, J. Influence of pharmacological agents on portal hemodynamics: basis for its use in the treatment of portal hypertension. **Semin Liver Dis**, 19(4), 427-438, 1999
- GARCIA-TSAO, G.; Portal hypertension. **Curr Opin Gastroen**, 19: 250-258, 2003.
- GAWAD, H.M.A.; KHALIFA, A.E. Quercetin, coenzyme Q10 and L-canavanine as protective agents against lipid peroxidation and nitric oxide generation in endotoxin-induced shock in rat brain. **Pharmacol Res**, vol 43, nº3, 257-263, 2001.
- GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hidroperoxide initiated chemiluminescence: na assy oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. **Free Radical Bio Med**. nº 10, p.93-100, 1991.
- GOVERS, R.; RABELINK, T. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Renal**, 280: 193-206, 2001.
- GRAUPERA, M.; GARCIA-PAGAN, J.C.; ABRALDES, J. G.; PERALTA, C.; BRAGULAT, M.; CAROMINILA, H.; BOSCH, J.; RODÉS, J. Cyclooxygenase derived products modulate the increased intrahepatic resistance of irrhotic rat livers. **Hepatology** jan, 172-181, 2003
- GROSS, S.S.; WOLIN, M. S. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. **Annu Rev Physiol**, 57:737-69, 1995.

- HAGIWARA M, INOUE S, TANAKA T, NUNOKI K, ITO M, HIDAKA H, Differential effects of flavonoids as inhibitors of tyrosine kinases and serine/threonine protein kinases. **Biochem Pharmacol**, 37, 2987-2992, 1988.
- HALLIWELL, B.; BORISH, E.; PRYOR, W.A.; AMES, B.N.; SAUL, R.L.; McCORD, J.M.; HARMAN, D. Oxygen radicals and human disease. **Ann Intern Med**, vol 107: 4, 526-545, USA, 1987.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical Bio Med**, second edition, Oxford, Clarendon Press, 1989.
- HEIJNEN, C.G.M.; HAENEN, G.R.M.M.; VEKEMANS, J.A.; BAST, A. Peroxynitrite scavenging of flavonoids: structure activity relationship. **Environ Toxicol Phar**, 10, 199-206, 2001.
- HELLER, J.; SCHEPKE, M.; NEEF, M.; WAITES, R.; RABE, C.; SAUERBRUCH, T. Increased urotensin II plasma levels in patients with cirrhosis and portal hypertension. **J Hepatol**, 37, 767-772, 2002.
- HERRMANN, S.M. Aspectos nutricionais dos flavonóides in MARRONI, N., **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**, Canoas, Editora ULBRA, p.105-118, 2002.
- HUSAIN, S.R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, vol 26, (9), 2489-2491, 1987.
- KAWANAKA, H.; YOMIKAWA, W.; JONES, M.K. Defective mitogen-activated protein kinase (ERK2) signaling in gastric mucosa of portal hypertensive rats. Potential therapeutic implications. **Hepatology**, 34: 990-999, 2001
- KOUL, A.; BHATIA, V.; BANSAL, M.P. Effect of alpha-tocopherol on pulmonary antioxidant defence system and lipid peroxidation in cigarette smoke inhaling mice. **BMC Biochemistry**, 2:14, 2001.

- LIN, J.K.; TSAI,S.Y.; LIN,S. Antiinflammatory and antitumor effects of flavonoids and flavanoids. **Drugs Future** 26, 145-152, 2001.
- LIN, C. M.; CHEN, C.S.; CHEN, C.T.;LIANG,Y.C.; LIN, J.K. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 294, 167-172, 2002
- LLESUY, S. F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A.; MILEI, S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadimicin in mice. **Tumor**, 71: 241-249, 1985.
- LLESUY, S. F. Introducción y especies activas de oxígeno in MARRONI,N., **Estresse oxidativo e antioxidantes**, Canoas, Ed. ULBRA, p. 21-31, 2002.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, M. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the foline reagent. **J. Biol. Chem.** 193: p.265-275, 1951.
- MARRONI, N. A. P., CASADEVALL,M.; PANÉS, C.; PIQUÉ, J.M. Effects of chronic normovolemic anemia on gastric microcirculation and ethanol-induced gastric damage in rats. **Dig. Dis. Science**, 39, 751-757, 1994.
- MARRONI, N. A. P. e MARRONI, C.A. Estresse oxidativo e a mucosa gástrica in MARRONI, N., **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**, Canoas, Editora ULBRA, 2002.
- MISRA H.P, FRIDOVICH I., The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal Biol. Chem**, 247, 3170-3175, 1972.
- MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: which, where, how and why? **J. Clin. Invest.** Vol 100:9, 2146-2152, 1997.
- MIURA,T.; MURAOKA,S.; FUJIMOTA, Y. Inactivation of creatine kinase induced by quercetin with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide: pro-oxidative

and anti-oxidantive actions of quercetin. **Food and Chemical Toxicology**, 41, article in press, 2003.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** 43: p.109-142, 1991.

OH,T.; LEE,J.; AHN,B. Oxidative damages are critical in pathogenesis of reflux esophagitis: implication of antioxidants in its treatment. **Free Radical Biol Medicine**, 30: 905-915, 2001

PALMER, R.M.A.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. **Nature**, 327: p. 524-526, 1987.

PAVANATO,M.A.; TUÑÓN, M.J.; SÁNCHEZ-CAMPOS,S.; MARRONI,C.; LLESUY, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO,J.; MARRONI,N.; Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. **Dig. Dis. Science**, vol 48 (4); 824-829, 2003.

PAZA,T.B.C.; PEDROSA, R.C. Alvos moleculares na pesquisa de fitofármacos e fitoterápicos, in. YUNES,R.A. e CALIXTRO, J.B.; **Plantas Mediciniais: sob a ótica da química medicinal moderna**. p. 195-227, Chapecó, UNOESC, 2001.

PERALTA,C.; RULL,R.; RIMOLA,A. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion in the rat. **Transplantation**, 71:529-536, 2001.

PERES, W. **Radicais livres em níveis biológicos**. Pelotas, Educat, 1994.

PERES, W.; TUÑÓN, M. S.; COLLADO, P. S.; HERRMANN, S.; MARRONI, N.; GONZÁLEZ GALLEGGO, J. The flavonid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. **Journal of Hepatology**, 33; p.742-750, 2000.

PIQUÉ, J.M. Óxido Nítico. **Formación médica continuada**, vol 43: 1000, 1992.

- PIZCUETA, P.; PIQUÉ, J.M.; FERNÁNDEZ, M.; BOSCH, J.; RODÉS, J.; WHITTLE, B.J.R.; MONCADA, S. Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric oxide inhibition. **Gastroenterology**, 103: p.1909-1915, 1992a.
- RADI, R.; BECKMAN, J.; BUSH, K.M.; FREEMAN, B.A. Peroxynitrite induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Ach. Biochem. Biophysical**, 288, 481-487, 1991.
- RICHTER, C.; GODVADZE, V.; SCHLAPBACH, R.; SCHWEIZER, M.; SCHLEGEL, J. Nitric oxide kills hepatocytes by mobilizing mitochondrial calcium. **Biochem. Biophysical Res. Commun**, 205, 1143-1150, 1994.
- ROCKEY, D.C. Vascular mediators in the injured liver. **Hepatology**, jan, 37 (1), 4-12, 2003.
- SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biology e Medicine**, vol 19,:4, p481-86, 1995.
- SARIN, S.K.; AGARWAL, M.D. Extrahepatic portal vein obstruction, **Seminars in liver disease**, v.22 (1), 43-58, 2002.
- SHEN, S.C.; LEE, W.R.; LIN, H.Y.; HUANG, H.C.; KO, C.H.; YANG, L.L.; CHEN, Y.C. In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin na lipopolysaccharide induced nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> production. **European Journal of Pharmacology**, 446, 187-194, 2002.
- SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. **Diseases of the liver and biliary system**, 11<sup>o</sup> edition, Blackwell Scientific Publications, UK, 2002.
- SIKULER, E.; KRAVETZ, D.; GROSZMANN, R. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. **Am. J. Physiol.** 248, p.618-625, 1985.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GROSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Porto Alegre/ Florianópolis; Editora UFRGS e UFSC, 2002.

SONG, D.; LIN, H.; SHARKEY, K.A. Hyperdynamic circulation in portal hypertensive rats is dependent on central c-fos gene expression. **Hepatology**, 35, 159-166, 2002.

STUMM, M.M.; D'ORAZIO, D.; SUMANOVSKI, L.T.; MARTIN, P.; REICHEN, J.; SIEBER, C.C. Endothelial, but not the inducible, nitric oxide synthase is detectable in normal and portal hypertensive rats. **Liver**, 22:441-450, 2002.

SZABO, C.; SOUTHAN, G.J.; THIEMERMANN, C. Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with s-methylisothiourea sulfate a pontet and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. **Proc. Nat. Acad. Science**, 91, 12472-12476, 1994.

SZABO, C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. **New Horiz.** 3: p.2-32, 1995.

SZABO, C.; LIAUDET, L.; SORIANO, F.G. Biology of nitric oxide signaling. **Critical Care Medicine**. Vol 28:4, 37-52, 2000.

THANNICKAL, V.L.; FANBURG, B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. **Am. Journal Physiol. Lung Cell Mol Physiol**, 279, L:1005-L:1028, 2000.

THULUVATH, P.J.; YOO, H.Y. Portal hypertensive gastropathy. **The Americ. Journal of Gastroenterology**, 97, (12), 2973-2978, 2002.

TRAVACIO, M.; LLESUY, S. Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. Cien e Cultura – **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, vol 48:1/2, p. 9-13, 1996.

VILLEGAS, I. MARTIN, M.S.; CASA, C.; MOTILVA, V.; ALARCÓN DE LA LASTRA,C. Effects of oxican inhibitors of cyclooxygenase on oxidative stress generation in rat gastric mucosa. A comparative study .**Free Radical Research** v 36 (7), 769-777, 2002.

WIEST, R.; SHAH, V.; SESSA, W.; GROSZMANN, R. NO overproduction by eNOS precedes hyperdynamic splanchnic circulation in portal hypertensive rats. **Am J. Physiol.** 276:1043-1051, 1999a.

WIEST, R.; GROSZMANN, R. Nitric oxide and portal hypertension: its role in the regulation of intrahepatic and splanchnic vascular resistance. **Seminars in Liver Disease.** Vol19(4), 411-426, 1999b.

WIEST, R.; GROSZMANN, R. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. **Hepatology.** Vol35, 2, 478-491,2002.

WILKINS, R.A.; NUNNERLEY, H.B. **Imaging of the liver, pancreas and spleen.** 1ªed. Blackwell scientific publications, 1990.

YUNES,R.A. e CALIXTRO, J.B. **Plantas Mediciniais: sob a ótica da química medicinal moderna,** Chapecó, UNOESC, 2001.

YUNGSON, R. **Como combater os radicais livres,** Rio de Janeiro, Ed. Campus, p.2-14, 1995.