

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Camila de Andrade Camargo

**“EFEITO DA QUERCETINA NAS ATIVIDADES FOSFATÁSICAS E
SEU EFEITO PROTETOR NA HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA
PELO ACETAMINOFENO EM CAMUNDONGOS”**

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do
Título de Mestre em Fisiologia,
na área de Biologia Funcional
e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcio André Miranda

Campinas, 2007

UNIDADE BC
Nº CHAMADA: C14e
T/UNICAMP
V. _____ EX. _____
TOMBO BCCL 75000
PROC 16.145-02
C _____ D _____
PREÇO 11.00
DATA 14.11.07
BIB-ID 416598

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C14e
C140e

Camargo, Camila de Andrade
Efeito da quercetina nas atividades fosfatásicas e seu
efeito protetor na hepatotoxicidade induzida pelo
acetaminofeno em camundongos / Camila de Andrade
Camargo. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Hiroshi Aoyama.
Co-orientador: Marcio André Miranda.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Quercetina. 2. Fosfatases. 3. Acetaminofen. 4.
Transaminases. 5. Flavonóides. I. Aoyama, Hiroshi. II.
Miranda, Marcio André. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. VI. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Effects of quercetin on phosphatases activities and its protective effects on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice.

Palavras-chave em inglês: Quercetin; Phosphatases; Acetaminophen; Transaminases; Flavonoids.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Hiroshi Aoyama, Maria Eleonora Feracin da Silva Picoli, Giselle Zenker Justo.

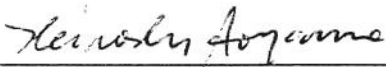
Data da defesa: 16/02/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 16 de Fevereiro de 2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. José Camilo Novello


Assinatura

Profª. Dra. Giselle Zenker Justo


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Assinatura

Profª. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Assinatura

200753136

Agradecimentos

À CNPq pelo apoio financeiro aos trabalhos desenvolvidos nesta tese.

Aos meus pais Carlos e Hilda Helena pelos esforços que fizeram para que eu pudesse chegar até aqui, por estarem sempre ao meu lado, me incentivando a realizar meus sonhos, por me dizerem que eu poderia crescer e conquistar tudo o que eu quisesse, desde que acreditasse em mim mesma, como eles sempre acreditaram. Com certeza, se estou aqui hoje, devo isso a eles. Eles são a base sobre a qual meu caráter foi construído. E por isso eu só posso dizer a eles: OBRIGADA, AMO VOCÊS!

À minha irmã Raquel pelos momentos alegres e divertidos que passamos juntas e também por estar sempre por perto nos momentos difíceis, me ajudando a ver as coisas de uma maneira diferente. Sempre aprendi muito com ela. Agradeço por me mostrar que para sermos felizes não precisamos de muita coisa.

Ao meu irmão João Pedro, por todo o carinho, por me ensinar que sonhos não são bobagens e porque quando estamos juntos esqueço todo o resto.

Ao meu padrasto Helídio pelo exemplo de integridade a ser seguido e por tudo que sempre fez por mim sem pedir nada em troca. Obrigada por fazer parte da minha família.

Aos meus avós Wilson, Ilda, José Holmer e Nica, por toda a sua dedicação, paciência, carinho, incentivo, orações e por terem me transmitido valores tão importantes como: bondade, caridade, honestidade e paciência.

Ao meu namorado Carlos Eduardo Santoro por todos os momentos de descontração e de alegria, pelo companheirismo, cumplicidade e pela paciência em me escutar. Obrigada por fazer parte da minha vida, por estar sempre ao meu lado me incentivando, e por tudo que você já fez por mim.

Ao Prof. Dr. Hiroshi Aoyama que, mais que um orientador, considero um amigo e uma grande referência pessoal e profissional, por sempre ter tido muita paciência comigo (mesmo quando eu ainda era um pouco “desligada”...) e me ouvir atencioso todas as vezes que entro em sua sala com uma nova idéia. Suas críticas e sugestões sempre contribuíram muito para meu aprendizado e formação profissional. Agradeço por nunca ter desistido de mim, pela confiança depositada durante esses oito anos de convivência e por ter dado o crédito que eu precisava para crescer e desenvolver meu potencial.

À Profa. Dra. Maria Eleonora Feracin da Silva Picoli (“Nonô”), por vir correndo sempre que eu pedia por socorro, dizendo tranqüila: “Calma, Cacá, calma que no final dá tudo certo!”. Sempre que as coisas ficavam difíceis eu nunca desanimava, sabia que poderia contar com ela. Agradeço por confiar em mim e me mostrar que nada é tão complicado, que com calma tudo pode ser resolvido (“uma coisa de cada vez!”) ou que nada é impossível, basta trabalhar para se conseguir o que quer. Obrigada por tudo que você fez por mim e principalmente por nunca ter me deixado na mão.

Ao Prof. Dr. Marcio André Miranda, por ter me ensinado a dar os primeiros passos no laboratório e ter me aceito como sua aluna na Iniciação Científica e por ter me co-orientado no Mestrado. Agradeço por toda a ajuda que já me deu.

Aos amigos Roberta Sousa (pela paciência de me ouvir mais de dez vezes no treino para a qualificação e por ser uma grande companheira também fora do laboratório), Erika Ferraresso, Daniella Palombino, Luciana Leite, William Grizolli, pelos momentos de descontração no laboratório, por fazerem dele um lugar muito mais gostoso de estar, pelas conversas, risadas, brincadeiras, desabafos, conselhos,

pelas críticas também, por toda a ajuda com os camundongos e nos experimentos intermináveis. Com certeza aprendi muito com eles, sobre experimentos e sobre a vida.

À Dani Morango, Neto, Daniel, Willian, Bispo, por me ajudarem com os camundongos na parte mais difícil... o momento do sacrifício. Em especial à Dani, por todas as dúvidas que me esclareceu e pela oportunidade de aprender muito com ela sobre experimentos *in vivo* e ao Bispo, por me ajudar também na parte experimental com a β -CD.

À Profa. Dra. Fernanda Gadelha por permitir o uso de seu laboratório e ao Quico por toda a ajuda e paciência.

À Profa. Dra. Giselle Zenker Justo, pelas sugestões, discussões sobre protocolos e modos de administração dos compostos, pelos conselhos e críticas, que contribuíram muito para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira, por me receber de portas abertas sempre que precisei utilizar o Laboratório de Transdução de Sinal.

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni e Prof. Dr. José Camilo Novello por possibilitarem o uso do Laboratório de Química de Proteínas e ao técnico Paulinho, por me atender dia após dia na busca constante por nitrogênio líquido.

À Profa. Dra. Eneida de Paula por permitir o uso do Laboratório de Biomembranas e do Biotério e também ao técnico Márcio e à D. Cida por atenderem meus pedidos sempre com muita boa vontade.

À Marilena, André “japonês”, Raquel, Ana Carolina, Willian, Antônio, Rodrigo, Paula, Daisy, pelos bate papos, brincadeiras, risadas e convivência no laboratório, que com certeza tornaram o trabalho menos penoso e mais engraçado.

À Marina, secretária do Departamento de Bioquímica, e à Andréia, secretária da pós-graduação pela disposição e por toda a ajuda que me deram até hoje.

Aos amigos Yeda Quindere, Bread Leandro, Juliana Kaneto e Dilermando Pesci, por todos os encontros, viagens divertidíssimas, pelos bate papos descontraídos nos nossos jantares, pelas risadas, pelas alegrias, por sempre estarem dispostos a ajudar, por eu saber que posso contar com eles em qualquer momento e situação e por me mostrarem que até os piores dias podem ser superados com um belo jantar entre amigos, regado a sorvete, claro (qualquer um, menos de flocos)! Obrigado por estarem presentes na minha vida.

Às amigas Dani Pantuci, Gabi Cavasini, Gabi Oliveira, Jordana Ribeiro, Vanessa Gassetta e Vanessa Seleguim que, apesar da distância, sempre estiveram presentes na minha vida (mesmo que por telefone ou internet), agradeço por contribuírem, e muito, para hoje eu ser a pessoa que sou.

Aos amigos Bruno Menezes, Bispo, Daniel Martins, Ana Paula Jiora e a todos os outros que, apesar de não citados, não são menos importantes, agradeço pela amizade que continua até hoje desde o início da graduação e por ainda ter o prazer de encontrá-los nos corredores da Bioquímica ou fora da UNICAMP também.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse projeto desse certo.

A Deus por ter tanta coisa a agradecer.

Obrigada!

Camila

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

Paulo Freire

**Dedico aos meus pais,
a quem devo tudo que
conquistei até hoje.**

ÍNDICE GERAL

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	FLAVONÓIDES.....	19
1.1.1	<i>Absorção e Biodisponibilidade dos Flavonóides</i>	<i>20</i>
1.1.2	<i>Papel Biológico dos Flavonóides.....</i>	<i>21</i>
1.1.3	<i>Os Flavonóides e o Fígado</i>	<i>24</i>
1.2	ACETAMINOFENO	25
1.3	FOSFATASES.....	28
1.3.1	<i>Fosfatases Ácidas</i>	<i>29</i>
2	OBJETIVOS.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	MATERIAL	34
3.2	MÉTODOS	34
3.2.1	<i>Manutenção dos animais.....</i>	<i>34</i>
3.2.2	<i>Tratamento dos animais.....</i>	<i>34</i>
3.2.2.1	Tratamento agudo com quercetina e acetaminofeno, utilizando óleo vegetal (de milho) como veículo para a administração da quercetina.....	34
3.2.2.2	Tratamento agudo com quercetina e acetaminofeno, utilizando óleo mineral (Nujol) como veículo para a administração da quercetina	36
3.2.3	<i>Determinação da quantidade de proteína</i>	<i>37</i>
3.2.4	<i>Determinação das atividades fosfatásicas</i>	<i>37</i>
3.2.5	<i>Análises estatísticas</i>	<i>38</i>
4	RESULTADOS.....	39
4.1	TRATAMENTO AGUDO COM QUERCETINA E ACETAMINOFENO, UTILIZANDO ÓLEO VEGETAL (DE MILHO) COMO VEÍCULO PARA A ADMINISTRAÇÃO DA QUERCETINA.	39
4.1.1	<i>Transaminases.....</i>	<i>39</i>
4.1.2	<i>Fosfatases.....</i>	<i>42</i>

4.2	TRATAMENTO AGUDO COM QUERCETINA E ACETAMINOFENO, UTILIZANDO ÓLEO MINERAL (NUJOL) COMO VEÍCULO PARA A ADMINISTRAÇÃO DA QUERCETINA	46
4.2.1	<i>Transaminases</i>	46
4.2.2	<i>Fosfatases</i>	49
5	DISCUSSÃO	55
5.1	TRATAMENTO AGUDO COM QUERCETINA E ACETAMINOFENO, UTILIZANDO ÓLEO VEGETAL (DE MILHO) COMO VEÍCULO PARA A ADMINISTRAÇÃO DA QUERCETINA.	56
5.1.1	<i>Transaminases</i>	57
5.1.2	<i>Fosfatases</i>	58
5.2	TRATAMENTO AGUDO COM QUERCETINA E ACETAMINOFENO, UTILIZANDO ÓLEO MINERAL (NUJOL) COMO VEÍCULO PARA A ADMINISTRAÇÃO DA QUERCETINA	59
5.2.1	<i>Transaminases</i>	59
5.2.2	<i>Fosfatases</i>	60
5.3	TRATAMENTO AGUDO COM QUERCETINA E ACETAMINOFENO – ADMINISTRAÇÃO PREVENTIVA E TERAPÊUTICA DA QUERCETINA	61
5.3.1	<i>Transaminases</i>	62
5.3.2	<i>Fosfatases</i>	63
5.4	O VEÍCULO UTILIZADO PODE INFLUENCIAR NOS RESULTADOS – ÓLEO VEGETAL X ÓLEO MINERAL	65
6	CONCLUSÕES	66
7	PERSPECTIVAS	68
8	BIBLIOGRAFIA	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura geral dos flavonóides. Os anéis A e C são aromáticos e o anel B é um heterocíclo contendo oxigênio vizinho a um carbono ligado ao anel C.....	19
Figura 2: Rotas de metabolização do acetaminofeno	27
Figura 3: Atividade da transaminase glutâmica oxalacética (TGO) hepática de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo de milho) e acetaminofeno. “Q Antes” corresponde ao grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg), quatro horas após administração do flavonóide. Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da TGO foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de U/L. Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey.	40
Figura 4: Atividade da transaminase glutâmica pirúvica (TGP) hepática de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo de milho) e acetaminofeno. “Q Antes” corresponde ao grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg), quatro horas após administração do flavonóide. Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da TGP foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de U/L. Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey.	41
Figura 5: Atividade de fosfatases ácidas totais (FAT) hepáticas de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo de milho) e acetaminofeno. “Q Antes” corresponde ao grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg), quatro horas após administração do flavonóide. Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle	

recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da FAT foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de atividade específica ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey. .43

Figura 6: Atividade de fosfatases ácidas de baixa massa molecular (FAB) hepáticas de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo de milho) e acetaminofeno. “Q Antes” corresponde ao grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg), quatro horas após administração do flavonóide. Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da FAB foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de atividade específica ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey.....44

Figura 7: Atividade de fosfatase ácida tartarato-resistente (FATR) hepática de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo de milho) e acetaminofeno. “Q Antes” corresponde ao grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno. O gráfico representa a atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente, FATR. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg), quatro horas após administração do flavonóide. Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da FATR foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de atividade específica ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey. .45

Figura 8: Atividade da transaminase glutâmica oxalacética (TGO) hepática de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo mineral) e acetaminofeno. Q: grupo tratado com quercetina; A: grupo tratado com acetaminofeno; “Q Antes”: grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno; “A Antes”: grupo

tratado com acetaminofeno 4h antes da administração da quercetina e “Q+A”: grupo tratado com quercetina e acetaminofeno administrados em conjunto. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg). Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da TGO foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de U/L. Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey.47

Figura 9: Atividade da transaminase glutâmica pirúvica (TGP) hepática de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo mineral) e acetaminofeno. Q: grupo tratado com quercetina; A: grupo tratado com acetaminofeno; “Q Antes”: grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno; “A Antes”: grupo tratado com acetaminofeno 4h antes da administração da quercetina e “Q+A”: grupo tratado com quercetina e acetaminofeno administrados ao mesmo tempo. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg). Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da TGP foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de U/L. Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey. .48

Figura 10: Atividade de fosfatases ácidas totais (FAT) hepáticas de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo mineral) e acetaminofeno. Q: grupo tratado com quercetina; A: grupo tratado com acetaminofeno; “Q Antes”: grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno; “A Antes”: grupo tratado com acetaminofeno 4h antes da administração da quercetina e “Q+A”: grupo tratado com quercetina e acetaminofeno administrados ao mesmo tempo. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg). Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da FAT foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de atividade específica ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de

significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey.50

Figura 11: Atividade de fosfatases ácidas de baixa massa molecular (FAB) hepáticas de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo mineral) e acetaminofeno. Q: grupo tratado com quercetina; A: grupo tratado com acetaminofeno; “Q Antes”: grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno; “A Antes”: grupo tratado com acetaminofeno 4h antes da administração da quercetina e “Q+A”: grupo tratado com quercetina e acetaminofeno administrados ao mesmo tempo. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg). Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da FAB foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de atividade específica (nmol. min⁻¹. mg⁻¹). Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey.51

Figura 12: Atividade de fosfatases ácidas tartarato-resistente hepáticas de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo mineral) e acetaminofeno. Q: grupo tratado com quercetina; A: grupo tratado com acetaminofeno; “Q Antes”: grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno; “A Antes”: grupo tratado com acetaminofeno 4h antes da administração da quercetina e “Q+A”: grupo tratado com quercetina e acetaminofeno administrados ao mesmo tempo. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg). Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da FAB foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de atividade específica (nmol. min⁻¹. mg⁻¹). Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey.52

Figura 13: A: fígado de camundongo tratado somente com quercetina (não há diferenças na aparência deste fígado para o de um camundongo normal, sem tratamento nenhum); B: fígado de camundongo tratado com quercetina e acetaminofeno, C: fígado de camundongo tratado somente com acetaminofeno.....54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição das Fosfatases ácidas em mamíferos	29
Tabela 2: Efeito da quercetina (dissolvida em óleo de milho) e do acetaminofeno nas atividades das fosfatases presentes em fígado de camundongos (tratamento agudo).	42
Tabela 3: Efeito da quercetina (dissolvida em óleo mineral) e do acetaminofeno nas atividades das fosfatases presentes em fígado de camundongos (tratamento agudo).	53

RESUMO

Os flavonóides são fitocompostos polifenólicos, caracterizados quimicamente como heterosídeos flavônicos. Apresentam diversas atividades biológicas devido às suas propriedades antioxidantes e habilidades em modular a atividade de diversas enzimas ou receptores celulares, tornando-os responsáveis pelo efeito protetor contra doenças relacionadas ao sistema cardiovascular; certas formas de câncer e doenças de fotossensibilidade e envelhecimento.

As fosfatases ácidas, enzimas que hidrolisam ésteres fosfatos em meio ácido, encontram-se amplamente distribuídas no organismo. Estas enzimas são importantes no catabolismo de diversas substâncias, acreditando-se que a alteração da atividade destas enzimas esteja relacionada com modificações induzidas por drogas e por várias doenças.

As transaminases são enzimas hepáticas cujo nível aumenta quando há lesão das células hepáticas (hepatócitos) provocada por qualquer tipo de agressão, como vírus, consumo excessivo de álcool ou drogas.

O acetaminofeno é uma droga frequentemente usada como analgésico e antipirético. O dano hepático causado pelo uso frequente ou exagerado do acetaminofeno é comum hoje em dia.

A manutenção correta dos sistemas metabólicos hepáticos é de grande importância para a manutenção da saúde. Desta forma, o estudo do flavonóide quercetina como possível protetor dos efeitos hepatotóxicos provocados pelo acetaminofeno pode ser muito promissor.

O objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos preventivos e terapêuticos, *in vivo*, do flavonóide quercetina sobre as atividades de fosfatases ácidas (total, tartarato-resistente e de baixa massa molecular relativa) e de transaminases glutâmica oxalacética (TGO) e glutâmica pirúvica (TGP) no fígado de camundongos, tratados ou não com acetaminofeno.

Para o desenvolvimento deste trabalho foi realizado um tratamento agudo (24 horas), de camundongos machos da linhagem Swiss, com quercetina e acetaminofeno, utilizando-se óleo de milho ou nujol como veículo para o flavonóide.

A dosagem da TGO e da TGP confirmou que o acetaminofeno pode realmente ser considerado hepatotóxico, quando administrado ou ingerido em grandes concentrações no organismo. A quercetina, dissolvida em óleo mineral, reverteu a hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno, nos tratamento terapêutico e, em conjunto com acetaminofeno. A quercetina dissolvida em óleo de milho, no tratamento preventivo, pode não ser a única responsável pela reversão da hepatotoxicidade causada pela administração do acetaminofeno, uma vez que quando se substituiu o veículo utilizado, óleo de milho pelo óleo mineral, este efeito não foi mais observado.

Comparando-se os resultados obtidos entre fosfatases e transaminases pode-se observar que a atividade da FATR, no tratamento com nujol, demonstra uma semelhança muito grande com os resultados observados nos gráficos das atividades das transaminases e provavelmente pode se considerada uma marcadora de dano hepático. O alfa-tocoferol, presente no óleo de milho, pode ter exercido um efeito antioxidante, e mascarado o efeito protetor da quercetina e a hepatotoxicidade do acetaminofeno.

Este estudo foi importante para mostrar que a atividade dos flavonóides no organismo vivo pode ser influenciada por diversos fatores, como: a natureza do veículo utilizado na sua administração, ordem de administração e o tempo de permanência no organismo.

SUMMARY

Flavonoids are polyphenolic phytochemicals chemically characterized as flavonic heterosides. These compounds present several biological activities due to their antioxidant properties and ability to modulate the activities of enzymes or cellular receptors, making them responsible for the protector effect against diseases related to the cardiovascular system, certain forms of cancer, photosensitivity diseases and aging.

Acid phosphatases, enzymes that hydrolyze phosphate esters at acid medium, are largely distributed in the organisms. These enzymes are important in the catabolism of several compounds and could be related to the modifications induced by drugs and diseases.

Transaminases are hepatic enzymes which levels increase in consequence of hepatic cells (hepatocytes) lesions provoked by aggressions such as virus and excessive alcohol and drug consumption.

Acetaminophen is a drug frequently used as analgesic and antipyretic. It is common the hepatic damage caused by the frequent or exaggerated use of acetaminophen.

The correct maintenance of the hepatic metabolic systems is of great importance for the health. In this way, the study of the flavonoid quercetin as a possible protector of the hepatotoxic effects provoked by acetaminophen seems to be promising.

The object of the present work was to study the *in vivo* effects of the flavonoid quercetin on the activities of acid phosphatases (total, tartrate-resistant and relative low molecular weight) and of transaminases glutamic oxalacetic (GOT) and glutamic pyruvic (GPT) in mice livers treated with acetaminophen.

To develop this work, it was performed an acute treatment (24 hours) of Swiss male mice, with quercetin and acetaminophen, using corn oil or nujol as a vehicle for the flavonoid.

The determination of GOT and GPT activities confirmed that acetaminophen can be considered hepatotoxic, when administered or ingested in great amount.

In the therapeutic treatments, when applied with acetaminophen, quercetin, solubilized in mineral oil, reverted the acetaminophen-induced hepatotoxicity. In the preventive treatment, quercetin, solubilized in corn oil, might not be the only responsible for the reversibility, since this effect was no more observed when the vegetal oil was replaced by the mineral oil.

The results with FATR, in the treatment with nujol, showed great similarity with the results obtained with transaminases, suggesting that this class of phosphatases could be considered as markers of hepatic damage. The alpha-tocopherol, present in the corn oil, could be exerting an antioxidant effect, masking the protector effect of quercetin and the acetaminophen hepatotoxicity.

The importance of the present study was to stress that the *in vivo* flavonoids activities can be influenced by several factors, such as, the nature of the vehicle used in the administration, the order of administration and the retention time in the organism.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Flavonóides

Existem atualmente mais de 4000 tipos de flavonóides com estruturas conhecidas (Silberberg *et al.*, 2005). Eles merecem uma atenção especial porque estão presentes em praticamente todas as plantas, incluindo-se os vegetais e as frutas, que compõem uma dieta normal (Mennen *et al.*, 2005). É estimado que o consumo diário de flavonóides seja de centenas de miligramas por dia (Hollman & Katan, 1999). Os flavonóides foram primeiramente identificados como vitamina P, e juntamente com a vitamina C e K são importantes na manutenção da integridade e resistência dos capilares sanguíneos.

Subseqüentemente, outras propriedades biológicas foram descritas para os flavonóides, incluindo: atividade anti-hipertensiva, antiarrítmica, antiinflamatória, antialérgica, anti-colesterolêmica, anti-hemorragica, anti-tumoral, anti-trombótica, estabilizante de plaquetas e mastócitos e alguns flavonóides também apresentam atividade hepatoprotetora (Formica & Regelson, 1995; Hertog, 1996; Rice-Evans *et al.*, 1996; Antônio & Brito, 1998; Middleton *et al.*, 2000; Havsteen, 2002; Bhatia & Jain, 2004).

Na literatura existem diversas revisões sobre a relação estrutura-atividade biológica (SAR) dos diferentes tipos de flavonóides (Formica & Regelson, 1995; Di Carlo *et al.*, 1999; Middleton *et al.*, 2000; Havsteen, 2002; Bhatia & Jain, 2004). Em plantas, os flavonóides são encontrados ligados a açúcares como glicosídeos e são bastante estáveis. São encontrados em maiores quantidades em sementes e frutos, e dentro das células eles estão localizados nos vacúolos (Hertog *et al.*, 1993). Eles têm sido descritos e categorizados como antocianidinas, flavonóis, flavononas, flavonas, catequinas. As flavononas ocorrem predominantemente em frutas cítricas, conferindo-lhes o sabor característico. As flavonas distribuem-se em ervas e grãos, contribuindo para o sabor e coloração dos tecidos vegetais. As isoflavonas estão presentes em grãos, como a soja, onde possuem atividade estrogênica. As antocianinas são encontradas em frutos, produzindo coloração azul e vermelha (Palombino, 2006); as catequinas também estão presentes em frutos (Peterson & Dwyer, 1998).

A estrutura geral dos flavonóides está apresentada na Figura 1. Trata-se de um difenilpropano (C6-C3-C6) que consiste de dois anéis aromáticos ligados através de três carbonos que, geralmente, formam um heterociclo oxigenado. Com exceção das chalconas, todos os flavonóides encontrados nos alimentos possuem um anel pirânico (um anel contendo um heteroátomo de oxigênio), que é formado pela adição do oxigênio à posição 2 das chalconas e subsequente ciclização com a cadeia de 3 átomos de carbono e o anel “A” (Figura 1). Uma hipótese para a existência de uma grande diversidade estrutural dos flavonóides é a quantidade de modificações que tais compostos podem sofrer, tais como: hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras (Koes *et al.*, 1994).

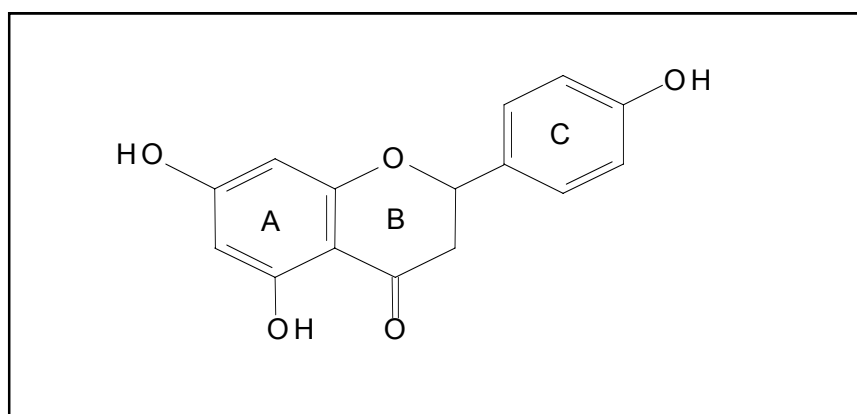


Figura 1: Estrutura geral dos flavonóides. Os anéis A e C são aromáticos e o anel B é um heterocíclo contendo oxigênio vizinho a um carbono ligado ao anel C.

A presença dos flavonóides na dieta humana faz com que seja importante o entendimento das suas propriedades bioativas, absorção, distribuição, metabolismo e excreção em humanos, permitindo uma melhor compreensão de suas propriedades biológicas benéficas e maléficas (Hollman & Katan, 1998).

1.1.1 Absorção e Biodisponibilidade dos Flavonóides

Uma vez que os flavonóides são encontrados em plantas, apresentando-se em maiores concentrações nas sementes e frutos, esses compostos podem ser ingeridos em altas quantidades como constituintes normais da dieta humana (Hodek *et al.*, 2002; Mennen *et al.*, 2005). Até pouco tempo, a hidrólise dos flavonóides glicosilados só era conhecida em microorganismos. O metabolismo destes compostos é bastante conhecido e estudado em animais, no entanto, há poucos dados concretos para o metabolismo em humanos. Recentemente, a ingestão de flavonóides de baixa toxicidade, está adquirindo destaque farmacológico por acumular-se nos principais órgãos como o fígado, ou por modular o sistema imunológico (Bhatia & Jain, 2004). As razões mais importantes para a baixa toxicidade dos flavonóides são: a pequena solubilidade em água da aglicona (flavonóide sem açúcar) e o rápido catabolismo do núcleo pirrólico no fígado.

O açúcar presente nas estruturas moleculares dos flavonóides é um importante determinante para o sítio de absorção destes compostos (Tapiero, *et al.*, 2002). Dados obtidos em humanos (Hollman & Katan, 1998) sugerem que a absorção de flavonóides glicosilados em pequenas quantidades no intestino é devido à ação de bactérias alojadas no intestino grosso, que clivam os glicosídeos em flavonóides livres (agliconas) (Day *et al.*, 2000; Middleton *et al.*, 2000; Havsteen, 2002; Bhatia & Jain, 2004). No fígado, os flavonóides são gradativamente hidroxilados e/ou O-desmetilados pelos citocromos P450 (fase I da bioconjugação) e então sofrem reações de conjugação (glucoronidação, sulfatação, O-metilação), catalisadas pelas enzimas da fase II da bioconjugação (Hodek *et al.*, 2002). Os conjugados de glucoronídeos e sulfatos são rapidamente transportados no sangue e excretados na bile ou urina mais facilmente que seus parentes agliconas. Os produtos da conjugação podem ser espécie- e origem-dependentes e seus metabólitos não são, necessariamente, inertes biologicamente.

Alguns autores (Hollman *et al.*, 1996 e 1997; Paganga & Rice-Evans, 1997) mostraram que quercetina glicosilada era encontrada na circulação sangüínea após a ingestão. Esta podia ser rapidamente absorvida em pequenas quantidades, mas sua eliminação era muito lenta, sendo a cinética da absorção e biodisponibilidade dependente do tipo do glicosídeo ligado ao flavonóide.

Um dos primeiros estudos da distribuição de flavonóides não glicosilados em humanos ocorreu em 1975 (Gugler *et al.*, 1975), quando foram ministradas doses orais e intravenosas de quercetina. A partir da dose intravenosa pode-se determinar o período de meia-vida plasmático e a sua distribuição corpórea. Usando técnicas analíticas de HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) Erlund e colaboradores (2001) determinaram quantitativamente os níveis plasmáticos de flavonóides não glicosilados e de seus metabólitos como glucoronídeos e/ou sulfatos conjugados. Quanto às doses orais, observou-se que a biodisponibilidade plasmática era praticamente zero e quercetina era encontrada praticamente intacta nas fezes (Walle *et al.*, 2001; Erlund, 2004).

Muitos estudos têm sido realizados para se determinar a interação entre as enzimas do complexo citocromo P450 e os flavonóides e estes têm se mostrado excelentes inibidores de diferentes isoformas do complexo P450, em particular, CYP1A1 e CYP1A2 (Tsyrllov *et al.*, 1994; Zhai *et al.*, 1998; Moon *et al.*, 2000). Em todos os casos, a ação dos flavonóides sobre a atividade das isoformas de P450 levam à oxidação dos flavonóides (Doostdar *et al.*, 2000; Otake & Walle, 2001; Hu *et al.*, 2003).

1.1.2 Papel Biológico dos Flavonóides

Vários autores descreveram os efeitos biológicos, *in vitro* e *in vivo*, dos flavonóides em inúmeros sistemas celulares. A seguir, estão destacados alguns dos principais efeitos observados na literatura especializada:

a) *Inibição e alteração da expressão enzimática* - os flavonóides podem inibir muitas enzimas importantes nos sistemas celulares como: ATPase, fosfolipase, prostaglandina ciclooxygenase, lipoxigenase, aldose redutase, hexoquinase, NADH oxidase, succinoxidase, xantina oxidase, proteína quinase, hidrolases, peroxidases, metalopeptidases, tirosinases (Srivastava, 1985; Ferriola *et al.*, 1989; Cushman *et al.*, 1991; Formica & Regelson, 1995; Day *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2000; Bormann & Melzing, 2000; Shimizu *et al.*, 2000; Middleton *et al.*, 2000; Havsteen, 2002; Bhatia & Jain, 2004). Além disso, diversos trabalhos têm mostrado o efeito inibitório de

flavonóides sobre DNA e RNA polimerases dependentes de DNA e RNA e sobre a transcriptase reversa (Shinozuka *et al.*, 1988; Ono & Nakane, 1990; Chu *et al.*, 1992; Formica & Regelson, 1995; Uddin & Choundhry, 1995; Solimani, 1997; Wang *et al.*, 1998; Min *et al.*, 2000). Estes compostos podem ainda induzir várias enzimas, como a aril hidroxilase e a epóxido hidroxilase (Das, 1994) e regular a atividade da proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular (Miranda *et al.*, 2006).

b) Antioxidantes e pró-oxidantes - muita atenção tem sido dada para as propriedades antioxidantes dos flavonóides e seu papel inibitório na proliferação de células tumorais em cultura e em vários estágios do desenvolvimento tumoral em animais (Le Marchand *et al.*, 2000; Shimizu, 2000; Middleton *et al.*, 2000; Havsteen, 2002; Bhatia & Jain, 2004). As atividades antioxidante e quelante dos flavonóides são, provavelmente, os fatores mais importantes na sua ação de proteção contra degradação por radicais livres em tecidos e células (Afanas'ev *et al.*, 1989; Korkina & Afanas'ev, 1997).

Alguns flavonóides podem modular o aumento no número de processos celulares envolvendo reações de óxido-redução, incluindo a regulação da atividade da tirosina fosfatase (Gamet-Payraastre *et al.*, 1999). Além disso, atuam, também, na diminuição da peroxidação lipídica (Das & Ray, 1988; Bhatia & Jain, 2004). Os flavonóides neutralizam os radicais livres nas células em diferentes níveis, podendo atuar como seqüestradores de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), em reações com peroxil ou radicais peroxil lipídicos, na formação de radical hidroxil ($OH^{\bullet}$), provavelmente como quelante de ferro, na produção de peroxinitrito (Torel *et al.*, 1986; Haenen *et al.*, 1997; Robak & Gryglewski, 1998; Metodiewa *et al.*, 1999; Aliá, 2003; Hu *et al.*, 2004) e outros radicais livres, que estão envolvidos na degradação do DNA e consequentemente, no surgimento de tumores (Marchand, 2002). Metodiewa *et al.* (1999) mostraram que a quercetina possuía ação antioxidante protegendo os componentes celulares da degradação oxidativa e toxicidade de radicais livres, reduzindo a morte celular promovida pela redução dos antioxidantes celulares.

Apesar dos flavonóides atuarem como antioxidantes, alguns desses compostos podem agir como pró-oxidantes na presença do ácido nítrico ou em altas doses (Ferguson, 2001). Verificou-se também que, dependendo da concentração, a quercetina possuía ação pró-oxidante e promovia o surgimento de radicais livres. Este efeito é consequência da transformação da quercetina em compostos pró-

oxidantes, como o-semiquinona e o-quinona. Sahu & Gray (1997) demonstraram que morina e naringenina causavam danos ao DNA e membranas de hepatócitos de ratos por produzirem radical hidroxil. Vários estudos têm demonstrado inibição por flavonóides de enzimas mitocondriais, da xantina oxidase, da glutathione redutase, da glutathione S-transferase e de enzimas envolvidas na transdução de sinal (proteína quinase C, fosfatidilinositol 3-quinase e fosfatidilinositol 4-quinase) (Kang & Liang, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Gamet-Payrastre *et al.*, 1999; van Zanden *et al.*, 2003).

c) *Síntese e reparo do DNA* - os flavonóides podem afetar a síntese do DNA indiretamente (ligando-se a metais) ou diretamente (alterando a estrutura do DNA). A quercetina provocou inibição (dose-dependente) da síntese de DNA em células HL60 (Kang & Liang, 1997) e a miricetina induziu reparo do DNA em hepatócitos de ratos tratados com ferro (Abalea *et al.*, 1999). Análise da expressão da DNA polimerase revelou que houve um aumento da expressão desta enzima nos hepatócitos tratados com a miricetina, o que pode ser a causa da indução do reparo por este flavonóide.

d) *Indução de apoptose* - vários flavonóides são capazes de induzir apoptose em diferentes tipos celulares, sendo este efeito dependente da estrutura do flavonóide e do tipo celular. Células tumorais podem morrer por apoptose quando tratadas com concentrações de flavonóides de 1-100 mM (Ferguson, 2001). Este efeito parece estar relacionado com a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol (Wang *et al.*, 1999). Além disto, baixas concentrações de flavonóides podem ativar proteínas quinases ativadas por mitógenos, levando à expressão de genes responsáveis pela sobrevivência de várias linhagens de células de mamíferos (*c-fos* e *c-jun*), enquanto que concentrações altas e suprafarmacológica destes compostos levam à apoptose e necrose respectivamente.

e) *Antitumorais* - os flavonóides são considerados quimopreventivos do câncer por atuarem como antioxidantes, como moduladores da atividade de enzimas e por induzirem o reparo do DNA, como já mencionado. Estes compostos podem afetar a proliferação, diferenciação e apoptose de diversas linhagens de células tumorais (Di Carlo *et al.*, 1999). A chalcona apresentou forte efeito citotóxico sobre células tumorais de pulmão, cólon humano e leucemia murina. O campferol e a quercetina

apresentaram atividades moduladoras da proliferação das células HL60 (Kang & Liang, 1997). O mecanismo de ação da atividade anti-tumoral dos flavonóides ainda não está bem elucidado. Alguns autores têm correlacionado este efeito com a inibição de proteínas tirosina quinases; a quercetina inibe a proteína quinase C, enzima chave na regulação da proliferação celular (Kang & Liang, 1997). A flavona induziu diferenciação e apoptose de células de câncer de cólon humano, cujo mecanismo proposto foi a alteração da expressão de genes relacionados com o ciclo celular e apoptose, incluindo o fator nuclear kappa B ($NF\kappa B$) e *bcl-X*.

Assim, os flavonóides parecem possuir muitas atividades promissoras que os tornam excelentes agentes naturais modificadores da resposta biológica. Devido a esse fato, vários estudos epidemiológicos estão sendo realizados utilizando-se flavonóides. *In vitro*, tem se observado que os flavonóides são capazes de inibir enzimas envolvidas nos processos de desenvolvimento, diferenciação e proliferação de células cancerosas e de diminuir a atividade de vários tipos de câncer como colo de útero, ovário e mama (Kuo, 1996; Lepley *et al.*, 1996; Lepley & Pelling, 1997; Takakura, 1999), bem como leucemia (Hirano *et al.*, 1994; Carrero *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999). Quando quercetina e rutina foram administradas em ratos, ocorreu uma diminuição significativa na incidência de tumores provocada por agentes neoplásicos (Deschner *et al.*, 1991). A administração tópica de alguns flavonóides em ratos resultou em uma completa proteção contra o aparecimento de tumores e carcinomas (Birt *et al.*, 1997; Korkina & Afanas'ev, 1997; Zi *et al.*, 1997).

Apesar dos estudos de flavonóides em diversos sistemas enzimáticos, em muitos outros, não existem referências específicas, como, por exemplo, no caso de proteínas fosfatases.

1.1.3 Os Flavonóides e o Fígado

O fígado é o órgão principal envolvido no metabolismo de polifenóis absorvidos (junto com a mucosa intestinal e os rins), os quais chegam através da corrente sangüínea após a absorção ao longo do trato gastrointestinal ou por outro método de administração. Consequentemente, os potenciais efeitos benéficos dos polifenólicos ocorreriam primeiramente no fígado e também no sangue e rins (Aliá *et al.*, 2003).

Os flavonóides podem alterar o estado redox nos órgãos e nas células sanguíneas, melhorando a capacidade antioxidante basal pela atividade de enzimas antioxidantes do fígado, suportando o conceito dos efeitos benéficos à saúde de produtos naturais. Embora os níveis de flavonóides sejam baixos na circulação sanguínea, com uma absorção líquida reduzida e um tempo de meia-vida relativamente rápido nas vias de excreção, as concentrações aumentadas destes compostos no plasma sanguíneo e nos rins aumentam a capacidade antioxidante total. Isto é comprovado nos testes realizados *in vivo* dosando-se as principais enzimas envolvidas no mecanismo de defesa antioxidante: superóxido dismutase, catalase e glutathione redutase, bem como os elevados níveis de glutathione reduzida remanescente.

1.2 Acetaminofeno

Acetaminofeno (N-acetil-p-aminofenol, paracetamol) é um fármaco usado, geralmente, pelas suas propriedades analgésicas e antipiréticas. Em doses terapêuticas, é considerado um fármaco seguro. Entretanto, pode causar necrose hepática, nefrotoxicidade, lesões extra-hepáticas e até mesmo morte em seres humanos e em animais experimentais quando utilizado em overdoses (Ray *et al.*, 1996; Prescott, 2000; GyamLani & Parikh, 2002). A lesão hepática induzida pelo acetaminofeno é a segunda principal causa de transplante de fígado e contribui com níveis consideráveis de morbidade e mortalidade (Lee, 2004).

O acetaminofeno torna-se hepatotóxico numa dose única de 10 a 15 g (150 a 250 mg/kg). Doses entre 20 e 25 g são potencialmente fatais (Hardman *et al.*, 1996). É uma das principais causas de falência hepática no mundo ocidental e a principal causa de falência hepática droga-induzida nos Estados Unidos (Bartlett, 2004).

Há relatos de falência hepática levando ao transplante com a ingestão de 7,8 g de acetaminofeno associado à má nutrição do paciente, dieta pobre em proteínas com redução da glutathione e formação de metabólitos tóxicos acelerada pela carbamazepina (Young & Mazure, 1998). O uso de acetaminofeno, mesmo em doses terapêuticas, por pacientes com desordens hepáticas ou em associação à ingestão de grandes quantidades de álcool, pode causar danos renais e hepáticos (Bromer & Black 2003). Pacientes que usam acetaminofeno regularmente dobram o

risco de desenvolver câncer de rim (Kaye *et al.*, 2001; Gago-Dominguez *et al.*, 1999; Derby & Jick, 1996).

O acetaminofeno é o metabólito ativo originário da biotransformação da fenacetina mediada pelas enzimas do complexo do citocromo P450 (Figura 2). A hepatotoxicidade é resultado de uma grande ingestão de acetaminofeno e/ou indução do complexo P450, que eleva a formação do metabólito intermediário N-acetil-benzo quinoneimina (NAPQI), um metabólito extremamente tóxico. Sob condições normais, o NAPQI reage com grupos sulfidrílicos da glutathione (GSH) hepática, e é detoxificado por ela, sendo eliminado eventualmente na urina ou bile (Coles *et al.*, 1988). Em overdoses de acetaminofeno, a glucoronidação e as rotas de sulfatação tornam-se saturadas induzindo uma depleção dose-dependente da glutathione intracelular e perturbações na homeostase do cálcio, induzindo a metabolização do acetaminofeno pelo citocromo P450 (Lee *et al.*, 1996; Cohen & Khairallah, 1997; Holownia & Braszko, 2004). Na ausência da glutathione, a reação ocorrerá com grupos sulfidrílicos das proteínas hepáticas e menos frequentemente em outros órgãos, gerando necrose celular (Figura 2).

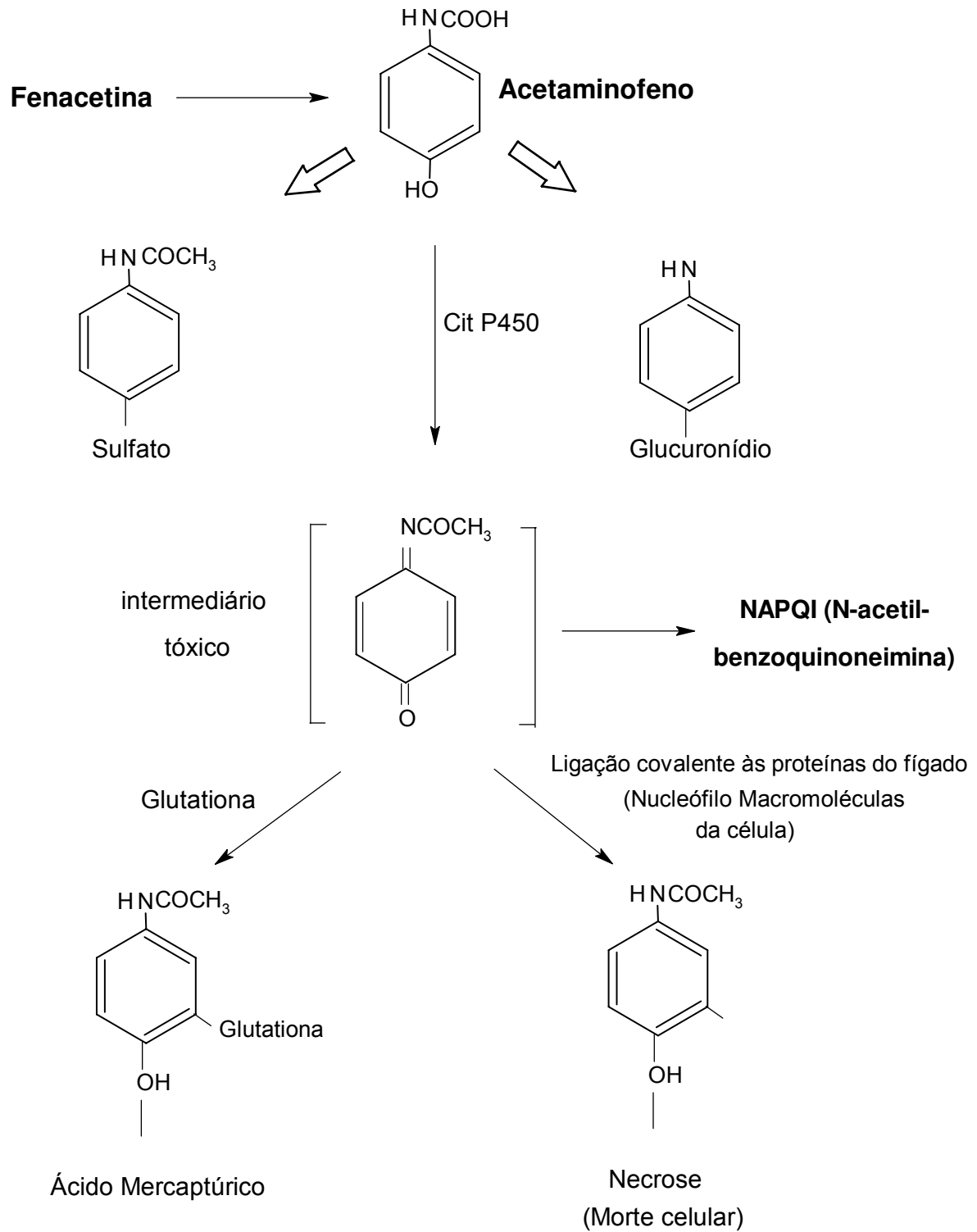


Figura 2: Rotas de metabolização do acetaminofeno

1.3 Fosfatases

As fosfatases são hidrolases que catalisam a desfosforilação de monoésteres de fosfatos. Estas enzimas podem ser divididas em três grupos: proteínas fosfatases, fosfatases ácidas e fosfatases alcalinas (Bernier & Wang, 1995; Jia, 1997; Aoyama *et al.*, 2003). Estas hidrolases estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em animais (Granjeiro *et al.*, 1997) e vegetais (Ferreira *et al.*, 1998, Granjeiro *et al.*, 1999).

Estudos citoquímicos revelaram a presença destas enzimas em diferentes locais da célula: núcleo, mitocôndrias, membranas, lisossomo, complexo de golgi e retículo endoplasmático. Enquanto as fosfatases ácidas apresentam um pH ótimo para catálise em torno de 5,0, as alcalinas apresentam o pH ótimo ao redor de 9,0. Ambas atuam em substratos de baixa massa molecular como, por exemplo, açúcares fosforilados; entretanto, elas possuem diferentes mecanismos de reação e somente as fosfatases alcalinas necessitam de íons bivalentes, tais como magnésio, cobalto ou manganês para a catálise.

Muitas proteínas no organismo importantes nas catálises enzimáticas, regulações gênicas e dos componentes celulares podem ser degradadas por oxidação e podem ser consideradas importantes marcadores biológicos para a ação do estresse oxidativo (Minato *et al.*, 2003). As fosfatases possivelmente podem ser uma destas enzimas marcadoras do estresse oxidativo, principalmente as serina/treonina fosfatases e proteína tirosina fosfatase. Estas enzimas, por possuírem um grupo sulfidríla no sítio catalítico susceptível à ação de espécies reativas de oxigênio, podem ser inativadas por oxidação irreversível destes grupos (Aoyama *et al.*, 2003).

Como as fosfatases fazem parte de diversos mecanismos de controle celular, e atuam antagonicamente com as proteínas quinases, estudar o efeito destes compostos naturais com diferentes efeitos sobre estes sistemas pode ser uma maneira de compreendê-los e aplicá-los no tratamento de diferentes doenças envolvidas com o desbalanço entre quinases e fosfatases (Cannons & Schwartzberg, 2004).

1.3.1 Fosfatases Ácidas

Fosfatases ácidas (ortofosfato monoéster fosfotransferases – E.C.3.1.3.2) de mamíferos podem ser classificadas de acordo com a massa molecular relativa (Mr) e inibição, como fosfatase ácida de alta Mr (acima de 100 kDa), Mr intermediária (20 a 100 kDa) e baixa Mr (menor que 20 kDa) e são inibidas pelo tartarato, fluoreto e p-hidroximercuribenzoato respectivamente (Silva, 2002) (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição das Fosfatases ácidas em mamíferos

Fosfatases Ácidas	Massa Molecular Relativa	Inibidor	Localização
AMr	>100 kDa	NaF, Tartarato	Membrana Celular Lisossomos
IMr	20 – 100 kDa	Tartarato – resistente Fluoreto – sensível	Citoplasma
BMr	<20 kDa	p-hidroximercuribenzoato	Citoplasma

As fosfatases ácidas de alta e intermediária massa molecular podem apresentar nas suas estruturas ferro, zinco ou magnésio e algumas vezes carboidratos. Elas estão presentes em diversos tecidos animais e possuem distribuição extremamente variada, podendo ser encontradas em secreções, como saliva e sêmen, e em diversos tecidos e órgãos como próstata, placenta, cérebro, fígado, coração, baço, rim, glândulas salivares, ossos, gengiva, nervos e gânglios nervosos. Estudos citoquímicos revelaram a presença destas enzimas em diferentes locais da célula: núcleo, mitocôndrias, membranas, lisossomo, complexo de golgi e retículo endoplasmático. No sangue, as fosfatases podem ser detectadas tanto nos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, como no plasma, onde algumas vezes são utilizadas como meio de diagnóstico para algumas doenças. A atividade alterada da fosfatase ácida plasmática é útil nos prognósticos dos cânceres de próstata e ovário (Silva, 2002).

A fosfatase ácida lisossomal (FAL) é um clássico marcador da inflamação (De Duve *et al.*, 1962) e seus níveis estão aumentados em diversos estados patológicos.

A fosfatase ácida resistente ao tartarato (FATR) difere das outras por ser insensível ao tartarato e p-hidroximercuribenzoato (pHMB). É encontrada em leucócitos, macrófagos alveolares e derivados de monócitos, sendo detectada também, em pequenas quantidades, em eritrócitos. A FATR está localizada na membrana celular e em organelas intracelulares (Kraenzlin *et al.*, 1990; Fukushima *et al.*, 1991; Drexler & Gignac, 1994; Janckila *et al.*, 1996). Níveis anormalmente altos da FATR no soro são encontrados na Doença de Gaucher (Robinson & Glew, 1980), leucemia tipo célula pilosa (Lau *et al.*, 1991), Doença de Paget, tumores ósseos e osteoporose. Contudo, a identidade e função biológica de seu substrato natural ainda não foram determinadas.

As fosfatases ácidas de baixa massa molecular relativa (FAB) são classificadas como proteínas tirosina fosfatases. Elas regulam uma variedade de funções através do controle do estado da fosforilação das tirosinas de diferentes proteínas (Aoyama *et al.*, 2003). Elas correspondem a uma classe de enzimas essencial ao organismo, visto que o balanço entre a fosforilação e a desfosforilação de proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos disparados por efetores (ou reguladores) extracelulares, como hormônios, mitógenos, carcinógenos, citocinas, neurotransmissores, substâncias ou metabólitos tóxicos (Miranda, 2005). Em consequência à ação destes efetores ocorre regulação da divisão, diferenciação e desenvolvimento celular, regulação do metabolismo e expressão gênica, contração, transporte, locomoção celular, aprendizado e memória (Trowbridge, 1991; Johnson & Barford, 1993; Denu *et al.*, 1996). Cabe ressaltar que antagonicamente à ação das enzimas fosfatases atuam as enzimas quinases, responsáveis por adicionar grupamentos fosfato em seus substratos, de forma que a fosforilação reversível de proteínas é catalisada pela ação oposta e dinâmica de proteínas quinases e fosfatases (Aoyama *et al.*, 2003). Mudanças anormais na atividade dessas enzimas acarretam na fosforilação imprópria de resíduos de tirosina, o que contribui para o desenvolvimento de várias patologias, como neoplasias, diabetes e doenças auto-imunes. Em uma transformação oncogênica ou estimulação por fatores de crescimento, o nível de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina aumenta de 1-2% na célula, podendo levar a graves doenças, incluindo o câncer (Aoyama *et al.*, 2003).

Existem poucos estudos que relacionam alterações na atividade das fosfatases com a presença de flavonóides e os poucos existentes apresentam

somente estudos sobre as fosfatases alcalinas. Devido a isso, resolvemos estudar, neste trabalho, o efeito do flavonóide quercetina sobre a atividade das fosfatases ácidas totais (FAT), tartarato-resistente (FATR), de baixa massa molecular (FAB) e transaminases glutâmica oxalacética (TGO) e glutâmica pirúvica (TGP) em fígado de camundongos tratados ou não com acetaminofeno.

2 OBJETIVOS

Aoyama e colaboradores têm estudado sistematicamente as fosfatases ácidas sobre o âmbito de purificação, caracterização e regulação (Granjeiro *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 1998; Granjeiro *et al.*, 1999; Gonçalves, 2000; Cavagis *et al.*, 2006; Cavagis *et al.*, 2004; Jonnson, 2005). Com relação aos flavonóides, foram estudados efeitos *in vitro* desses compostos na atividade da proteína tirosina fosfatase purificada de rim bovino (Miranda *et al.*, 2006), e efeitos desses compostos em proteína tirosina fosfatase de linfócitos humanos (Miranda, 2005).

Dando continuidade a uma das linhas de pesquisa do laboratório, o objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos *in vivo* do flavonóide quercetina sobre as atividades de fosfatases ácidas (total, tartarato-resistente e de baixa massa molecular relativa) e de transaminases (glutâmica oxalacética e glutâmica pirúvica) no fígado de camundongos, tratados ou não com acetaminofeno.

Para o desenvolvimento deste trabalho foi realizado o tratamento agudo (24 horas) de camundongos machos da linhagem Swiss com quercetina e acetaminofeno, utilizando-se óleo vegetal (de milho) como veículo para a administração da quercetina. Paralelamente foi realizado um tratamento agudo com quercetina e acetaminofeno, utilizando-se óleo mineral (Nujol) como veículo para a quercetina.

Especificamente, os objetivos consistiram em:

1. Realizar tratamento agudo de camundongos com quercetina e acetaminofeno, utilizando óleo de milho como veículo para administração da quercetina, para verificar o possível efeito preventivo deste flavonóide sobre o dano hepático provocado pelo acetaminofeno.

2. Realizar tratamento preventivo e terapêutico de camundongos com quercetina e acetaminofeno, utilizando-se óleo mineral como veículo para a administração da quercetina.
3. Comparar as atividades de enzimas fosfatases e transaminases entre os grupos de ambos os tratamentos.
4. Verificar possíveis diferenças nos efeitos observados em virtude da influência do veículo utilizado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Albumina de soro bovino, β -mercaptoetanol, quercetina, p-nitrofenilfosfato (pNPP) e p-hidroximercuribenzoato (pHMB) foram obtidos da Sigma Chemical Company.

Os demais reagentes são de pureza analítica.

Foram utilizados camundongos albinos machos da linhagem Swiss com peso variando entre 20 e 25 gramas, provenientes do CEMIB (Centro de Bioterismo da UNICAMP).

3.2 Métodos

3.2.1 Manutenção dos animais

Os animais foram submetidos a ciclos claro/escuro de 12 h, com água e alimentação *ad libitum*, temperatura ambiente monitorada de $22 \pm 3^\circ\text{C}$, alojados coletivamente (4 animais/gaiola) e aclimatados ao local de experimentação por pelo menos 7 dias. Todos os experimentos encontram-se de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Unicamp (Protocolo n° 1060-1).

3.2.2 Tratamento dos animais

3.2.2.1 Tratamento agudo com quercetina e acetaminofeno, utilizando óleo vegetal (de milho) como veículo para a administração da quercetina.

O objetivo deste experimento foi verificar o efeito preventivo da quercetina sobre o dano hepático induzido por uma dose subletal de acetaminofeno (Valentovic *et al.*, 2004; Janbaz *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2005), utilizando-se óleo de milho como veículo para a quercetina.

Foram utilizados 28 camundongos, grupos com n=7. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração intraperitoneal (i.p.) de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg), quatro horas após administração do flavonóide. O acetaminofeno foi diluído em tampão carbonato 0,1mol/L (pH 9,6) a 70°C (Alía *et al.*, 2003). Os animais controle receberam veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal.

O tratamento recebido por cada grupo está descrito a seguir:

Grupo 1 - Controle- Animais tratados com óleo de milho subcutaneamente e com tampão carbonato intraperitonealmente, 4 horas após a administração do óleo.

Grupo 2 - Quercetina - Animais tratados subcutaneamente com quercetina e com tampão carbonato intraperitonealmente, 4 horas após a administração do flavonóide.

Grupo 3 - Acetaminofeno - Animais tratados subcutaneamente com óleo de milho e com acetaminofeno intraperitonealmente, 4 horas depois da administração do óleo.

Grupo 4 - Quercetina 4 h antes do acetaminofeno (“Q Antes”) - Animais tratados subcutaneamente com quercetina e com acetaminofeno intraperitonealmente, 4 horas após a administração do flavonóide.

Vinte e quatro horas após a administração do flavonóide, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram o fígado retirado.

Os órgãos foram congelados em nitrogênio líquido separadamente e reservados, no biofreezer, para posterior utilização. Ao serem descongelados, cada fígado foi pesado e dividido em duas partes e cada parte foi triturada separadamente, por 2 minutos, com um tampão específico (tampão acetato de sódio 0,1 mol/L (pH 5,0), contendo 0,05% (v/v) de β -mercaptoetanol e NaCl 50 mmol/L na proporção 1:4 v/v, para dosagem das fosfatases e em tampão fosfato de sódio 100mmol/L (pH 7,0), para dosagens das transaminases). O extrato foi centrifugado por 30 minutos para a precipitação do tecido não lisado, o qual foi descartado. A seguir, dosagens das atividades enzimáticas e quantidade de proteína foram realizadas, em triplicata, para cada fígado.

3.2.2.2 Tratamento agudo com quercetina e acetaminofeno, utilizando óleo mineral (Nujol) como veículo para a administração da quercetina.

Neste tratamento foi utilizado óleo mineral (Nujol) como veículo para a administração da quercetina, para verificar possíveis diferenças nos efeitos estudados dependendo do veículo utilizado para a administração do flavonóide.

Este experimento visou também verificar se o efeito da quercetina, sobre o dano hepático induzido pelo acetaminofeno, é preventivo, terapêutico ou se tem uma ação conjunta com o acetaminofeno (quando administrados concomitantemente).

Foram utilizados 42 camundongos, grupos com n=7. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg), administrada subcutaneamente, e 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg) intraperitonealmente, quatro horas após administração do flavonóide. O acetaminofeno foi diluído em tampão carbonato 0,1 mol/L (pH 9,6) a 70°C. Os animais controle receberam veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal.

O tratamento recebido por cada grupo está descrito a seguir:

Grupo 1 – Controle - Animais tratados subcutaneamente com nujol e intraperitonealmente com tampão carbonato.

Grupo 2 - Acetaminofeno - Animais tratados subcutaneamente com nujol e intraperitonealmente com acetaminofeno.

Grupo 3 – Quercetina - Animais tratados subcutaneamente com quercetina e intraperitonealmente com tampão carbonato.

Grupo 4 - Quercetina 4 h antes do acetaminofeno (“Q Antes”) - Animais tratados subcutaneamente com quercetina 4 h antes da administração i.p. de acetaminofeno.

Grupo 5 - Acetaminofeno 4 h antes da quercetina (“A Antes”) - Animais tratados intraperitonealmente com acetaminofeno 4 h antes da administração subcutânea da quercetina.

Grupo 6 - Quercetina e acetaminofeno (“Q+A”) - Animais tratados subcutaneamente com quercetina e intraperitonealmente com acetaminofeno, administrados ao mesmo tempo.

Vinte e quatro horas após a primeira dose (quercetina ou acetaminofeno), os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram o fígado retirado.

Os órgãos foram congelados em nitrogênio líquido separadamente e reservados, no biofreezer, para posterior utilização. Ao serem descongelados, cada fígado foi pesado e dividido em duas partes e cada parte foi triturada separadamente, por 2 minutos, com um tampão específico (tampão acetato de sódio 0,1 mol/L (pH 5,0), contendo 0,05% (v/v) de β -mercaptoetanol e NaCl 50 mmol/L na proporção 1:4 v/v, para dosagem das fosfatases e tampão fosfato de sódio 100mmol/L (pH 7,0), para dosagens das transaminases). O extrato foi centrifugado por 30 minutos para a precipitação do tecido não lisado, o qual foi descartado. A seguir, dosagens das atividades enzimáticas e quantidade de proteína foram realizadas, em triplicata, para cada fígado.

3.2.3 Determinação da quantidade de proteína

A quantidade de proteína de cada amostra foi quantificada para verificar se a quercetina influenciou no conteúdo destes componentes no organismo. Este dado é importante, pois variações no conteúdo protéico podem estar relacionadas à síntese de DNA e divisão celular. Além disso, para o cálculo da atividade específica enzimática leva-se em consideração a quantidade de proteína presente no meio. As proteínas foram quantificadas através do método de Lowry e colaboradores (1951) utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

3.2.4 Determinação das atividades fosfatásicas

Para determinação das atividades fosfatásicas foi utilizado o sobrenadante do extrato de fígado macerado, submetido à ultracentrifugação (17.000 rpm, 30 min). A atividade das fosfatases foi determinada medindo-se o p-nitrofenol (PNP) liberado, quando se utiliza p-nitrofenil fosfato (pNPP) como substrato. A formação de PNP foi determinada espectrofotometricamente pela leitura da absorção a 405 nm, utilizando-se o valor de $18.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como coeficiente de extinção molar do p-nitrofenóxido.

a) Fosfatase ácida total (FAT):

Para um volume final de 1,0 mL, a reação foi iniciada pela adição da amostra a um meio contendo 100 mmol/L de tampão acetato de sódio (pH 5,0) e 100 mmol/L de p-nitrofenil fosfato (pNPP). A paralisação foi feita pela adição de 1,0 mL de NaOH 1 mol/L, após incubação por 10 min a 37°C.

b) Fosfatase ácida de baixa massa molecular (FAB):

O ensaio foi realizado como descrito no item (a), exceto pela adição de tartarato (100 mmol/L) e fluoreto (10 mmol/L), inibidores das fosfatases ácidas de alta e intermediária massa molecular, respectivamente.

c) Fosfatase ácida tartarato-resistente (FATR):

O ensaio foi realizado como descrito no item (a), exceto pela adição de tartarato (100 mmol/L) e de p-hidroximercuribenzoato (pHMB). O pHMB inibe toda a atividade das fosfatases ácidas de baixa massa molecular relativa e a atividade residual, mesmo na presença do tartarato, é correspondente à FATR.

3.2.5 Análises estatísticas

Para verificar se as médias que foram calculadas para os camundongos dos grupos controle e teste foram diferentes entre si a um nível de confiança, foi realizada a análise dos níveis de significância entre as amostras através da Análise de Variância (ANOVA), software GraphPad, utilizando-se como base $p < 0,05$ (GraphPad Software, Inc., San Diego Califórnia USA). Correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey. Todos os dados apresentados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão da média.

4 RESULTADOS

4.1 Tratamento agudo com quercetina e acetaminofeno, utilizando óleo vegetal (de milho) como veículo para a administração da quercetina.

O objetivo deste experimento foi verificar o efeito preventivo da quercetina sobre o dano hepático induzido por uma dose subletal de acetaminofeno, utilizando óleo de milho como veículo para a administração da quercetina.

4.1.1 Transaminases

O pré-tratamento com a quercetina, do grupo tratado com acetaminofeno, demonstrou um notável decréscimo na atividade das transaminases glutâmica oxalacética (TGO) e glutâmica pirúvica (TGP) 1,6 e 1,3 vezes, respectivamente, em relação aos valores obtidos com o grupo tratado somente com acetaminofeno (Figuras 3 e 4).

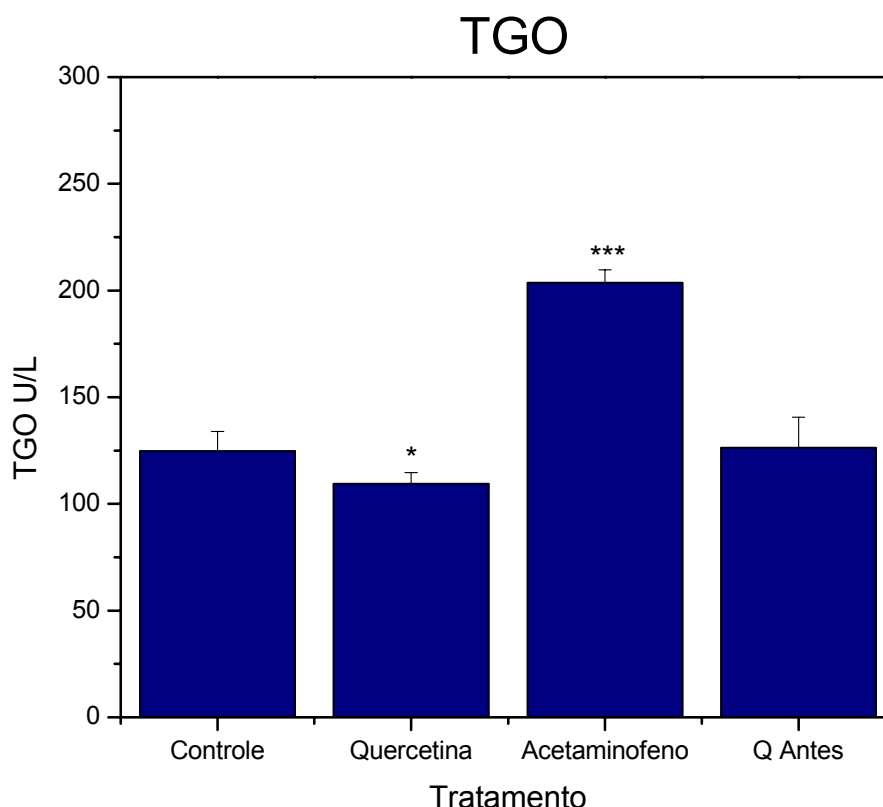


Figura 3: Atividade da transaminase glutâmica oxalacética (TGO) hepática de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo de milho) e acetaminofeno. “Q Antes” corresponde ao grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg), quatro horas após administração do flavonóide. Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da TGO foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de U/L. Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey.

* $p < 0,05$ grupo quercetina em relação ao grupo controle.

*** $p < 0,001$ grupo acetaminofeno em relação aos grupos controle, quercetina e “Q Antes”.

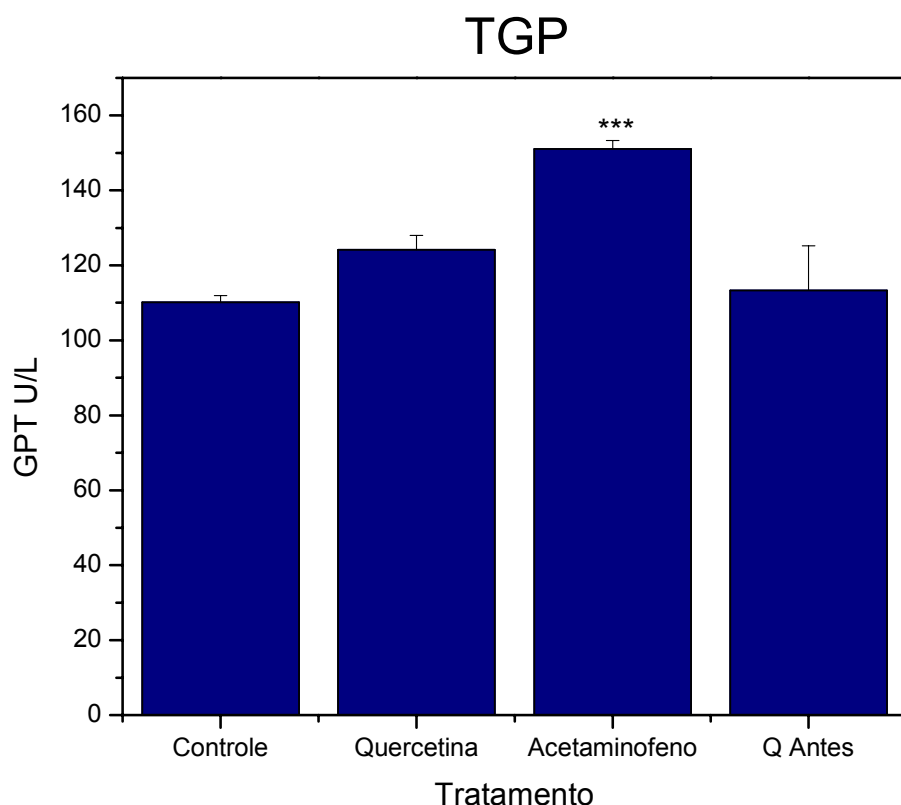


Figura 4: Atividade da transaminase glutâmica pirúvica (TGP) hepática de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo de milho) e acetaminofeno. “Q Antes” corresponde ao grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg), quatro horas após administração do flavonóide. Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da TGP foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de U/L. Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey.

* $p < 0,05$ grupo quercetina em relação ao grupo controle.

*** $p < 0,001$ grupo acetaminofeno em relação aos grupos controle, quercetina e “Q Antes”.

4.1.2 Fosfatases

Tabela 2: Efeito da quercetina (dissolvida em óleo de milho) e do acetaminofeno nas atividades das fosfatases presentes em fígado de camundongos (tratamento agudo).

Condições	Atividade específica (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)					
	FAT		FAB		FATR	
	M	SD	M	SD	M	SD
Controle	49,969	± 8,715	42,925	± 4,614	2,847	± 0,4917
Quercetina	76,105	± 26,885 ^d	67,462	± 6,127 ^{a,c,e}	7,756	± 0,936 ^{c, b}
Acetaminofeno	49,766	± 19,054	47,729	± 6,570	5,175	± 1,754 ^f
“Q Antes”	45,518	± 8,158	43,172	± 6,622	6,888	± 0,9783 ^g

FAT: fosfatase ácida total; FAB: fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa e FATR: fosfatase ácida tartarato-resistente. “Q Antes” corresponde ao grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg), administrada subcutaneamente e 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg) intraperitonealmente, quatro horas após administração do flavonóide. Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Os dados apresentados estão expressos em média (M) ± desvio padrão da média (SD) (n=7/grupo).

^a p<0,001, grupo quercetina em relação ao grupo controle. ^b p<0,05, ^c p<0,01, grupo quercetina em relação ao grupo acetaminofeno. ^d p<0,05, ^e p<0,001, grupo quercetina em relação ao grupo “Q Antes”. ^f p<0,05, grupo acetaminofeno em relação ao grupo controle. ^g p<0,001, grupo “Q Antes” em relação ao grupo controle. A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey.

Foi observado, neste experimento, um aumento significativo nas atividades da fosfatase ácida total (FAT), de baixa massa molecular relativa (FAB) e tartarato-resistente (FATR), no tratamento com quercetina (Figura 5, 6 e 7 e Tabela 2). Observou-se também um efeito ativador na FATR do grupo tratado com acetaminofeno (Figura 7), diferentemente das outras fosfatases FAT e FAB.

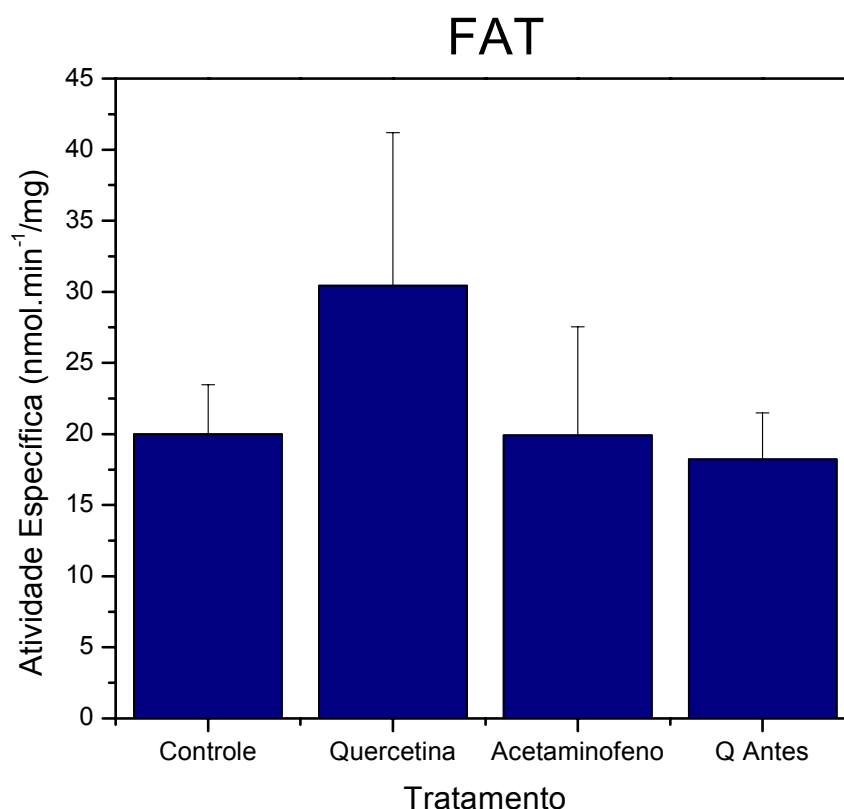


Figura 5: Atividade de fosfatases ácidas totais (FAT) hepáticas de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo de milho) e acetaminofeno. “Q Antes” corresponde ao grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg), quatro horas após administração do flavonóide. Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da FAT foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de atividade específica (nmol. min⁻¹. mg⁻¹). Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey.

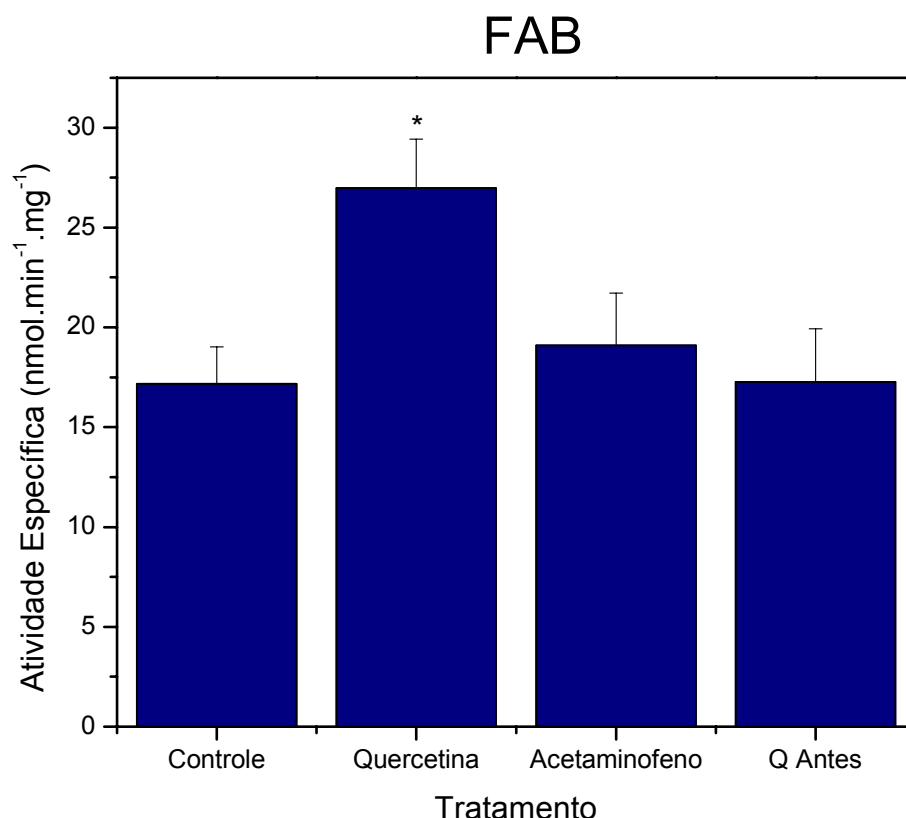


Figura 6: Atividade de fosfatases ácidas de baixa massa molecular (FAB) hepáticas de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo de milho) e acetaminofeno. “Q Antes” corresponde ao grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg), quatro horas após administração do flavonóide. Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da FAB foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de atividade específica (nmol min⁻¹ mg⁻¹). Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey.

*p<0,001, grupo quercetina em relação aos grupos controle, acetaminofeno e “Q Antes”

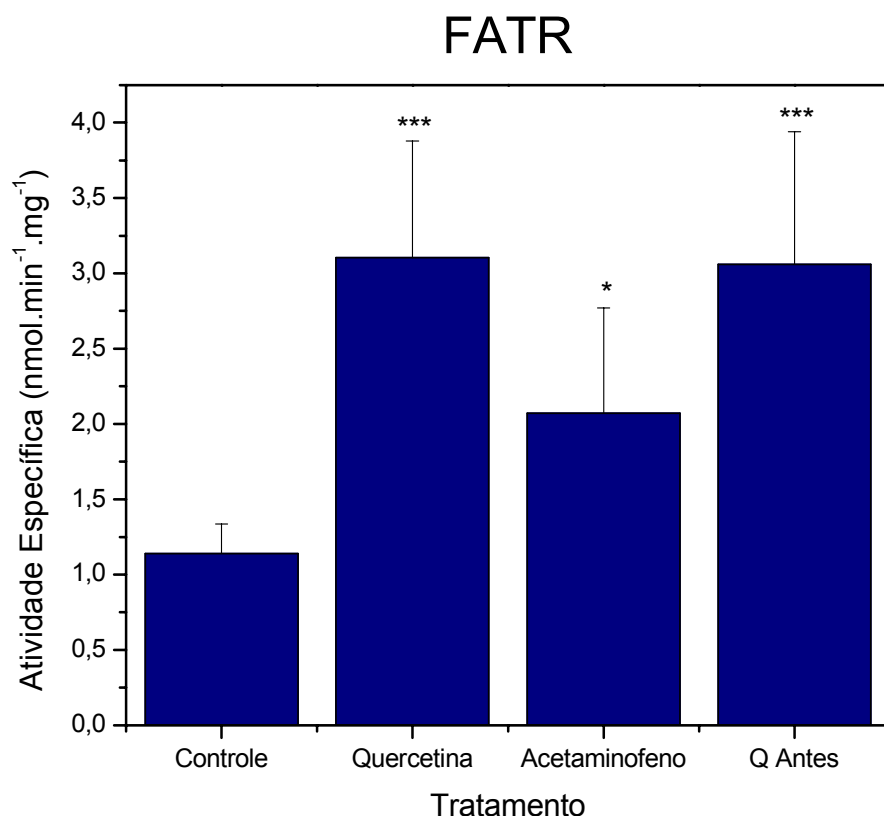


Figura 7: Atividade de fosfatase ácida tartarato-resistente (FATR) hepática de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo de milho) e acetaminofeno. “Q Antes” corresponde ao grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno. O gráfico representa a atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente, FATR. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg), quatro horas após administração do flavonóide. Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da FATR foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de atividade específica (nmol min⁻¹ mg⁻¹). Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey.

***p<0,001, grupo quercetina em relação ao grupo controle.

*p <0,05, grupo acetaminofeno em relação ao grupo controle.

^ap <0,001, “Q Antes” em relação ao grupo controle.

4.2 Tratamento agudo com quercetina e acetaminofeno, utilizando óleo mineral (Nujol) como veículo para a administração da quercetina

Neste tratamento foi utilizado óleo mineral (Nujol) como veículo para a quercetina, para verificar se existem diferenças nas atividades das enzimas estudadas, dependendo do veículo utilizado para a administração do flavonóide. Este experimento visou também verificar se o efeito da quercetina, sobre o dano hepático induzido pelo acetaminofeno, é preventivo, terapêutico ou se tem uma ação conjunta com o acetaminofeno (quando administrados concomitantemente).

4.2.1 Transaminases

O pré-tratamento com a quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno (“Q Antes”) e o grupo tratado com acetaminofeno demonstraram um aumento nas atividades das transaminases TGO e TGP de 1,3 e 1,1 vezes, respectivamente (para o grupo “Q Antes”) e 1,3 e 1,2 vezes, respectivamente (para o grupo tratado com acetaminofeno), em relação aos valores obtidos com grupo controle (Figuras 8 e 9)

Os demais grupos: quercetina, acetaminofeno 4h antes da administração da quercetina (“A Antes”) e quercetina e acetaminofeno administrados em conjunto (Q+A), apresentaram um decréscimo nas atividades da TGO e TGP.

O grupo tratado com quercetina apresentou uma diminuição nas atividades da TGO e da TGP de 1,23 e 1,05 vezes, respectivamente, quando comparado com o controle (Figuras 8 e 9).

O grupo “A Antes” teve uma diminuição na atividade das transaminases TGO e TGP de 1,33 e 1,25 vezes, respectivamente, em relação ao valor obtido com grupo tratado somente com acetaminofeno (Figuras 8 e 9).

O grupo “Q+A” apresentou um decréscimo bem mais acentuado nas atividades da TGO e da TGP (Figuras 8 e 9), em comparação tanto com o grupo tratado com acetaminofeno (1,92 e 1,31, respectivamente), quanto com o grupo controle (1,43 e 1,13, respectivamente).

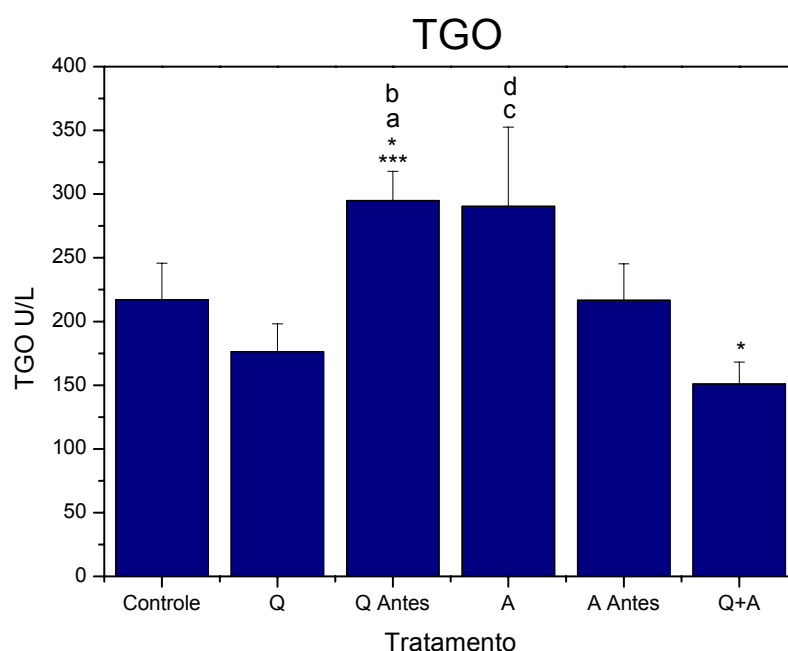


Figura 8: Atividade da transaminase glutâmica oxalacética (TGO) hepática de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo mineral) e acetaminofeno. Q: grupo tratado com quercetina; A: grupo tratado com acetaminofeno; “Q Antes”: grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno; “A Antes”: grupo tratado com acetaminofeno 4h antes da administração da quercetina e “Q+A”: grupo tratado com quercetina e acetaminofeno administrados em conjunto. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg). Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da TGO foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de U/L. Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey.

* $p < 0,05$ grupo “Q Antes” e “Q+A” em relação ao grupo controle.

*** $p < 0,001$ grupo “Q Antes” em relação ao grupo Q.

^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,001$ grupo “Q Antes” em relação aos grupos “A Antes” e “Q+A” respectivamente.

^c $p < 0,05$; ^d $p < 0,001$ grupo A em relação aos grupos “A antes” e “Q+A” respectivamente.

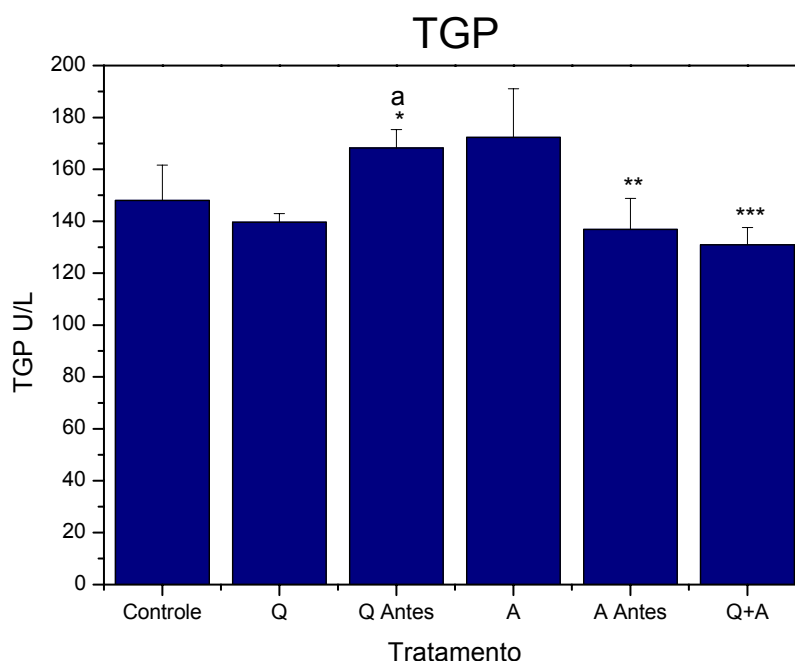


Figura 9: Atividade da transaminase glutâmica pirúvica (TGP) hepática de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo mineral) e acetaminofeno. Q: grupo tratado com quercetina; A: grupo tratado com acetaminofeno; “Q Antes”: grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno; “A Antes”: grupo tratado com acetaminofeno 4h antes da administração da quercetina e “Q+A”: grupo tratado com quercetina e acetaminofeno administrados ao mesmo tempo. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg). Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da TGP foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de U/L. Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey.

***p <0,001 grupo “Q+A” em relação ao grupo A.

**p <0,01 grupo “A Antes” em relação ao grupo A.

*p<0,05; ^ap <0,01 grupo “Q Antes” em relação aos grupos “A Antes” e “Q+A” respectivamente.

4.2.2 Fosfatases

As atividades das fosfatases ácidas totais (FAT) e de baixa massa molecular (FAB) hepáticas só foram alteradas significativamente no tratamento com acetaminofeno 4 h antes da administração da quercetina, “A Antes” (Figuras 10 e 11). Neste grupo, a FAT e FAB tiveram uma diminuição nas suas atividades de 1,6 e 1,5 vezes, respectivamente, quando comparadas com o controle.

A atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente (FATR), no grupo tratado com quercetina 4 h antes da administração do acetaminofeno, “Q Antes”, mostra-se aumentada em comparação com os demais grupos (Figura 12).

Podem-se observar na Tabela 3, os valores de atividade específica dos diferentes grupos.

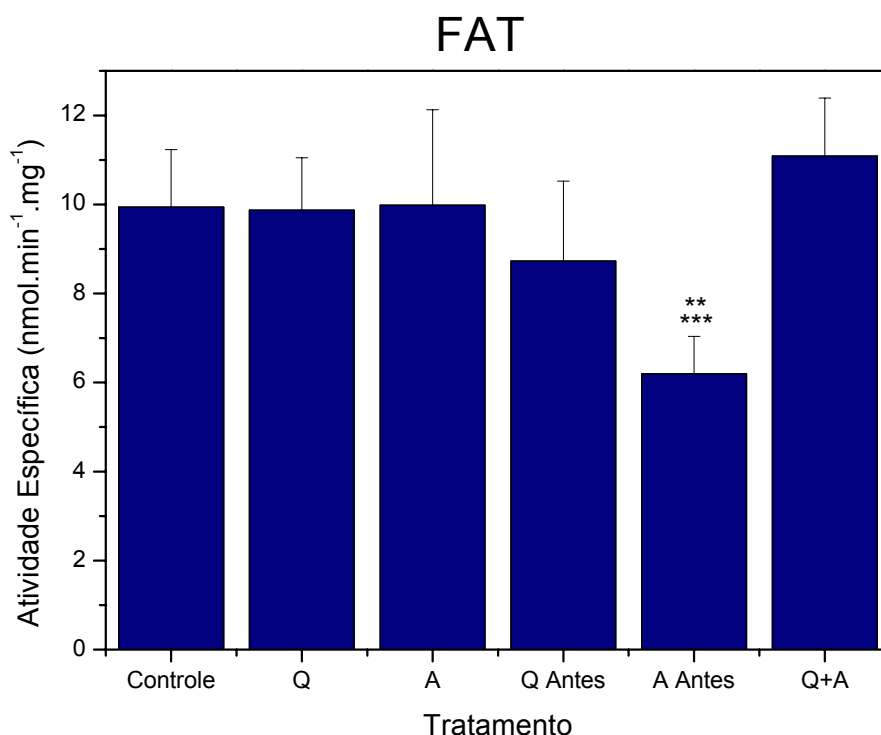


Figura 10: Atividade de fosfatases ácidas totais (FAT) hepáticas de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo mineral) e acetaminofeno. Q: grupo tratado com quercetina; A: grupo tratado com acetaminofeno; “Q Antes”: grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno; “A Antes”: grupo tratado com acetaminofeno 4h antes da administração da quercetina e “Q+A”: grupo tratado com quercetina e acetaminofeno administrados ao mesmo tempo. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg). Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da FAT foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de atividade específica (nmol. min⁻¹. mg⁻¹). Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey.

***p <0,001 grupo A Antes em relação ao grupo Q+A e **p <0,01 em relação aos grupos controle, Q e A;

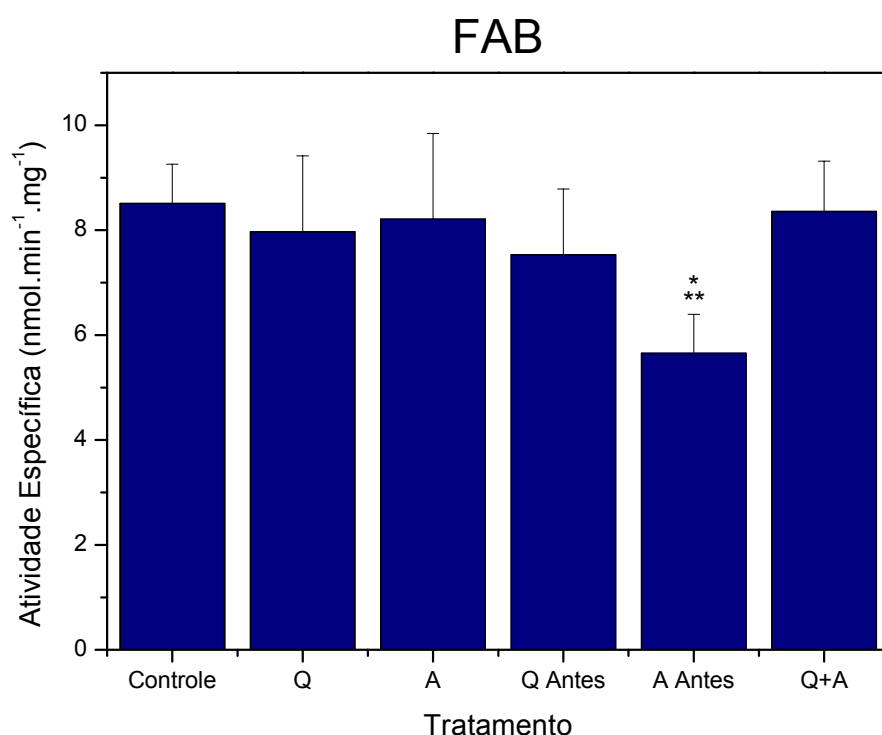


Figura 11: Atividade de fosfatases ácidas de baixa massa molecular (FAB) hepáticas de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo mineral) e acetaminofeno. Q: grupo tratado com quercetina; A: grupo tratado com acetaminofeno; “Q Antes”: grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno; “A Antes”: grupo tratado com acetaminofeno 4h antes da administração da quercetina e “Q+A”: grupo tratado com quercetina e acetaminofeno administrados ao mesmo tempo. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg). Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da FAB foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de atividade específica (nmol. min⁻¹. mg⁻¹). Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey.

**p <0,01 grupo A Antes em relação aos grupos controle e Q+A e *p<0,05 em relação ao grupo Q e A.

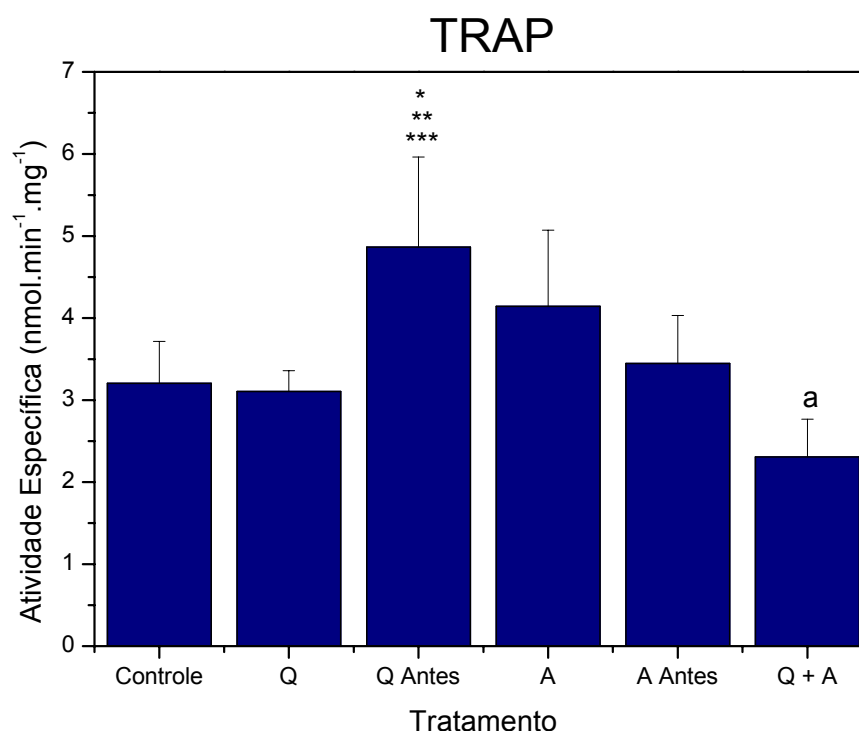


Figura 12: Atividade de fosfatases ácidas tartarato-resistente hepáticas de camundongos submetidos ao tratamento agudo com quercetina (dissolvida em óleo mineral) e acetaminofeno. Q: grupo tratado com quercetina; A: grupo tratado com acetaminofeno; “Q Antes”: grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno; “A Antes”: grupo tratado com acetaminofeno 4h antes da administração da quercetina e “Q+A”: grupo tratado com quercetina e acetaminofeno administrados ao mesmo tempo. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg). Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Para determinação da atividade da FAB foi utilizado o sobrenadante obtido das amostras de fígados individuais. Os resultados deste gráfico estão representados em unidades de atividade específica (nmol. min⁻¹. mg⁻¹). Os experimentos foram feitos em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD). A análise dos níveis de significância entre as amostras foi obtida através da Análise de Variância (ANOVA) e correlações entre as diferenças mínimas entre os grupos analisados foram obtidas através do teste de Tukey.

*p <0,05, grupo Q Antes em relação ao grupo A Antes; **p<0,01, em relação ao grupo controle e Q; e ***p<0,001, em relação ao grupo Q+A.

^ap<0,001, grupo Q+A em relação ao grupo A.

Tabela 3: Efeito da quercetina (dissolvida em óleo mineral) e do acetaminofeno nas atividades das fosfatases presentes em fígado de camundongos (tratamento agudo).

Condições	Atividade específica (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)					
	FAT		FAB		FATR	
	M	SD	M	SD	M	SD
Controle	9,939	± 1,295	8,510	± 0,7489	3,204	± 0,5114
Quercetina	9,868	± 1,179	7,968	± 1,448	3,104	± 0,2531
Acetaminofeno	9,983	± 2,142	8,210	± 1,633	4,141	± 0,9298 ^h
Q+A	11,088	± 1,306	8,354	± 0,9616	2,307	± 0,4608
Q Antes	8,726	± 1,798	7,530	± 1,255	4,864	± 1,100 ^{e,f,g}
A Antes	6,193	± 0,8448 ^{a, b}	5,653	± 0,7437 ^{c, d}	3,445	± 0,5860

FAT: fosfatase ácida total; FAB: fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa e FATR: fosfatase ácida tartarato-resistente. “Q+A”, corresponde ao grupo tratado com quercetina e acetaminofeno administrados ao mesmo tempo; “Q Antes”, ao grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno e “A Antes”, ao grupo tratado com acetaminofeno 4h antes da administração da quercetina. Todos os animais receberam dose única de 0,1 mL de quercetina (10 mg/kg) subcutaneamente e administração i.p. de 0,2 mL de solução de acetaminofeno (500 mg/kg). Os animais foram sacrificados 24 horas após administração da primeira dose. O grupo controle recebeu veículo na mesma razão dose-volume/peso corporal. Os dados apresentados estão expressos em média ± desvio padrão da média (n=7/grupo). ^a p <0,01 grupo “A Antes” em relação aos grupos Controle, Q e A; ^b p <0,001 “A Antes” em relação ao grupo “Q+A”; ^c p <0,01 grupo “A Antes” em relação aos grupos Controle e “Q+A”; ^d p<0,05 grupo “A Antes” em relação ao grupo Q e A; ^e p <0,05, grupo “Q Antes” em relação ao grupo “A Antes”; ^f p<0,01, grupo “Q Antes” em relação ao grupo Controle e Q; e ^gp<0,001, grupo “Q Antes” em relação ao grupo “Q+A”. ^hp<0,001, grupo A em relação ao grupo “Q+A”. ANOVA; teste de Tukey

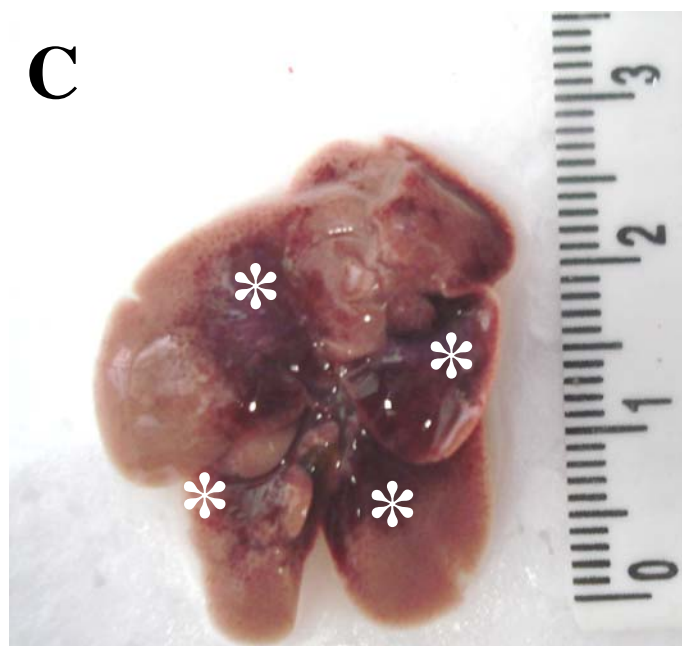
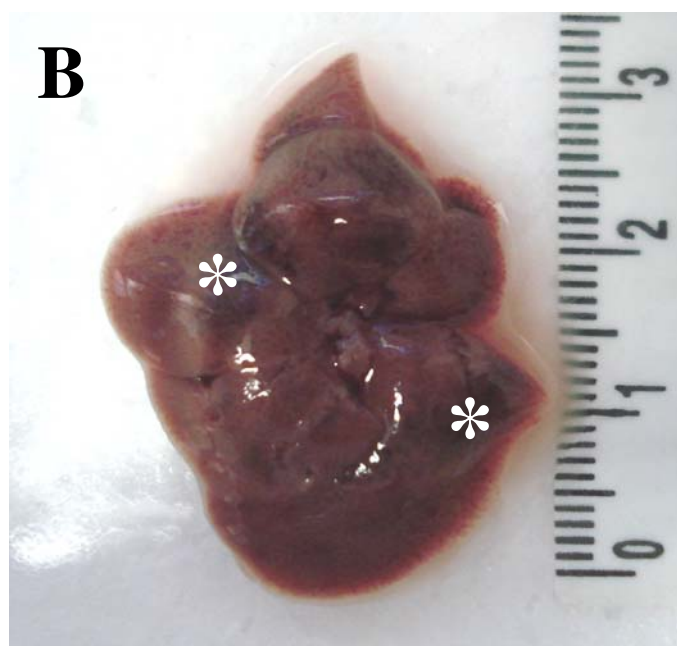
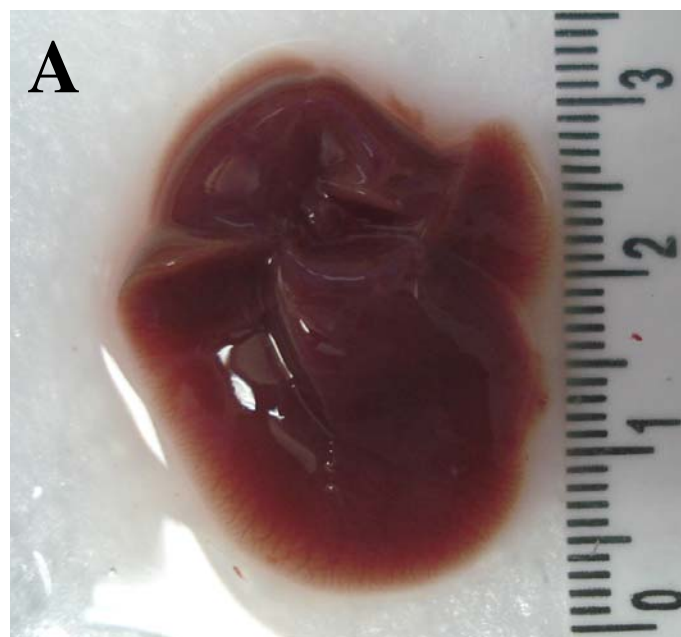


Figura 13: A: fígado de camundongo tratado somente com quercetina (não há diferenças na aparência deste fígado para o de um camundongo normal, sem tratamento nenhum); B: fígado de camundongo tratado com quercetina e acetaminofeno, C: fígado de camundongo tratado somente com acetaminofeno; * : zonas hemorrágicas

5 DISCUSSÃO

O fígado é o principal órgão responsável pela metabolização de xenobióticos e, com isto, possui uma elevada taxa metabólica, estando sujeito a muitos problemas causados pelo estresse oxidativo. Consequentemente, uma manutenção correta dos sistemas metabólicos hepáticos é de grande importância para a manutenção da saúde. O fígado é, também, o órgão principal envolvido no metabolismo de polifenóis junto com a mucosa intestinal e os rins, aos quais chegam, através da corrente sanguínea após a absorção ao longo do trato gastrointestinal ou por outra via de administração (Aliá *et al.*, 2003).

Assim, foi avaliado o efeito do flavonóide quercetina nas atividades das transaminases glutâmica oxalacética (TGO) e glutâmica pirúvica (TGP) e das fosfatases ácidas totais, FAT; tartarato-resistente, FATR e de baixa massa molecular relativa, FAB em fígado de camundongos, tratados ou não com acetaminofeno. Com tais estudos, pretendeu-se uma melhor compreensão dos efeitos do flavonóide quercetina no organismo e sua possível ação hepática.

Foram realizados dois experimentos para o estudo do efeito protetor da quercetina sobre o dano hepático induzido por uma dose subletal de acetaminofeno. Para verificar se ocorriam diferenças nas atividades das enzimas estudadas, de acordo com o veículo utilizado para a administração da quercetina, no primeiro experimento o veículo utilizado foi óleo vegetal (de milho) e no segundo, óleo mineral (nujol). Verificou-se também se a quercetina possui efeito preventivo, terapêutico ou se poderia ocorrer uma ação conjunta com o acetaminofeno (quando administrados concomitantemente).

É importante mencionar que apesar dos flavonóides apresentarem diversas atividades biológicas, existe pouco material disponível nas bases de dados eletrônicos, abordando seus efeitos *in vivo* nas atividades de fosfatases que, conforme mencionado, são enzimas que participam de diversos eventos celulares essenciais ao organismo.

Experimentos com tratamento agudo de animais são facilmente encontrados na literatura científica. Por este motivo e, também, por se tratar de um tempo bastante adequado para estudar efeitos de compostos, esta condição foi selecionada para verificar o efeito da quercetina em animais submetidos à toxicidade aguda por acetaminofeno.

5.1 Tratamento agudo com quercetina e acetaminofeno, utilizando óleo vegetal (de milho) como veículo para a administração da quercetina.

Este experimento foi realizado para analisar o efeito protetor da quercetina sobre o dano hepático induzido pelo acetaminofeno. Foi utilizado óleo de milho como veículo para a administração da quercetina.

O acetaminofeno é frequentemente usado como analgésico e antipirético. Em situação de overdose ele é responsável pela produção de necrose hepática e falha renal em humanos e animais experimentais. Este composto é o metabólito ativo originário da biotransformação da fenacetina (Figura 2) mediada pelas enzimas do complexo do citocromo P450 (fase I da bioconjugação). As doses terapêuticas deste fármaco são biotransformadas com segurança e eliminadas como conjugados não tóxicos de sulfato e do ácido glucurônico (Nelson, 1990). Somente uma pequena fração sofre N-hidroxilação pelo sistema citocromo P450, formando o N-acetilbenzoquinoneimina (NAPQI), um metabólito intermediário extremamente tóxico. Sob condições normais, o NAPQI reage com grupos sulfidrílicos da glutathione (GSH) hepática (Figura 2) e é destoxificado por ela, sendo eliminado eventualmente na urina ou bile (Coles *et al.*, 1988).

A hepatotoxicidade é resultado de uma grande ingestão de acetaminofeno e/ou indução do complexo P450, que eleva a formação do metabólito intermediário, NAPQI. Desta forma, a glucoronidação e as rotas de sulfatação tornam-se saturadas induzindo uma depleção dose-dependente da glutathione intracelular e perturbações da homeostase do cálcio (Lee *et al.*, 1996; Cohen & Khairallah, 1997; Holownia & Braszko, 2004). A superdosagem de acetaminofeno provoca um aumento do NAPQI, e uma diminuição da GSH por aumento do poder oxidativo. Na ausência da glutathione, a reação do NAPQI ocorrerá principalmente com grupos sulfidrílicos das

proteínas hepáticas e menos freqüentemente em outros órgãos, gerando necrose celular.

Atualmente, o dano hepático causado pelo uso frequente ou exagerado do acetaminofeno vem se tornando mais comum. Desta forma, o estudo do papel da quercetina na reversão dos efeitos hepatotóxicos provocados pelo acetaminofeno é promissor e de grande importância para a clínica.

5.1.1 Transaminases

A fim de verificar a ocorrência de dano hepático nos camundongos tratados com acetaminofeno, foram realizadas dosagens das transaminases glutâmica oxalacética (TGO) e glutâmica pirúvica (TGP), representadas nas Figuras 3 e 4.

A TGO é geralmente encontrada no fígado, músculo cardíaco, músculo esquelético, rins, cérebro, pâncreas, pulmões, leucócitos, e eritrócitos, assim como a TGP está presente em altas concentrações no fígado (Rej, 1978). Desta forma, pôde-se realizar a dosagem de ambas com facilidade.

Um aumento dos níveis de TGO e de TGP, tanto no plasma quanto nas amostras de fígado, é atribuído a danos na integridade estrutural hepática (Chenoweth & Hake, 1962). Este aumento pôde ser observado claramente nas atividades das transaminases do grupo tratado com acetaminofeno, que se mostraram bastante elevadas.

Estes apontamentos foram confirmados através de observações pessoais que incluíram o comportamento dos animais e aspecto geral do fígado (tamanho, coloração e presença de zonas hemorrágica) durante o tratamento de 24 horas (figura 13). Os camundongos tratados com acetaminofeno apresentaram um comportamento bem menos agitado que os camundongos dos outros grupos. Eles se moviam lentamente e, na maior parte do tempo, ficavam agrupados em um canto da gaiola, com dificuldade de abrir os olhos. Dois camundongos deste grupo faleceram antes do término do experimento. Pode-se observar também a presença de zonas hemorrágicas e coloração esbranquiçada nos fígados de todos os animais do grupo onde apenas o acetaminofeno foi administrado (Figura 13-C). Estas observações demonstram que o acetaminofeno altera o metabolismo do animal como um todo, comprovando a toxicidade do fármaco.

Os animais do grupo tratado com quercetina 4 horas antes da administração do acetaminofeno (grupo “Q Antes”) apresentaram um comportamento normal, semelhante ao grupo controle e ao grupo tratado com quercetina, embora alguns animais tenham apresentado pequenas zonas hemorrágicas no fígado (Figura 13-B). A aparência dos fígados dos animais tratados somente com a quercetina (figura 13-A) foi muito semelhante à dos fígados de camundongos que não receberam nenhum tratamento, não sendo possível verificar a olho nú nenhuma diferença entre eles.

O pré-tratamento do grupo “Q Antes” com a quercetina (dissolvida em óleo de milho) provocou um decréscimo na atividade das transaminases TGO e TGP (1,6 e 1,3 vezes, respectivamente) em relação aos valores obtidos com grupo tratado somente com acetaminofeno (Figuras 3 e 4), confirmando assim o poder do flavonóide associado ao óleo de milho em proteger o fígado do animal da toxicidade induzida pelo acetaminofeno.

5.1.2 Fosfatases

As fosfatases ácidas, enzimas que hidrolisam ésteres fosfatos em meio ácido, encontram-se amplamente distribuídas no organismo. Estas enzimas são importantes no catabolismo de diversas substâncias, acreditando-se que a alteração da atividade destas enzimas esteja relacionada com modificações induzidas por drogas e por várias doenças.

Como as fosfatases fazem parte de diversos mecanismos de controle celular, e atuam antagonicamente com as proteínas quinases, estudar o efeito destes compostos naturais com diferentes efeitos sobre estes sistemas pode ser uma maneira de compreendê-los e aplicá-los no tratamento de diferentes doenças envolvidas com o desbalanço entre quinases e fosfatases (Cannons & Schwartzberg, 2004). Desta forma, para verificar se o acetaminofeno ou a quercetina poderiam modificar as atividades das fosfatases, foram feitas as dosagens das fosfatases ácidas totais (FAT), de baixa massa molecular (FAB) e da tartarato resistente (FATR), para verificar se a administração do acetaminofeno influenciaria a atividade destas fosfatases e se a presença do flavonóide seria capaz de prevenir os danos provocados pela droga.

Neste experimento foi possível observar um aumento significativo nas atividades da FAT e da FAB no tratamento com quercetina (Figuras 5 e 6).

O efeito ativador do acetaminofeno na FATR (Figura 7), diferentemente das FAT e da FAB, poderia ser explicado pela ausência, nesta enzima, de grupamentos-SH no sítio ativo.

Comparando-se os resultados obtidos com as três fosfatases (Tabela 2), a FATR é a mais suscetível às mudanças provocadas pela hepatotoxicidade do fígado. Os valores das atividades da FAT e FAB nos tratamentos com acetaminofeno e “Q Antes”, não apresentaram modificações consideradas estatisticamente significantes. Uma possível explicação para os valores das atividades das fosfatases FAT, FAB e FATR poderia ser a presença de alfa-tocoferol no óleo de milho (usado como veículo para a administração do flavonóide), que poderia estar alterando tanto o efeito da quercetina como do acetaminofeno.

5.2 Tratamento agudo com quercetina e acetaminofeno, utilizando óleo mineral (Nujol) como veículo para a administração da quercetina

Este experimento foi realizado para avaliar se ocorrem diferenças nas atividades das enzimas estudadas de acordo com o veículo utilizado para a administração do flavonóide. Este experimento visou também verificar se o efeito da quercetina, sobre o dano hepático induzido pelo acetaminofeno, é preventivo, terapêutico ou se tem uma ação conjunta com o acetaminofeno (quando administrados concomitantemente). Foi utilizado óleo mineral como veículo para a administração da quercetina.

5.2.1 Transaminases

Como já foi explicado anteriormente, um aumento dos níveis de TGO e de TGP, tanto no plasma quanto nas amostras de fígado, é atribuído a danos na integridade estrutural do fígado. Desta maneira, foram determinadas as atividades de TGO e TGP (Figuras 8 e 9) para verificar a ocorrência de dano hepático nos camundongos tratados com acetaminofeno.

Diferentemente do resultado observado no experimento com óleo de milho, o pré-tratamento com a quercetina e posterior administração do acetaminofeno (grupo “Q Antes”), não provocou nenhuma mudança na atividade das transaminases TGO e TGP, em relação aos valores obtidos com grupo tratado somente com acetaminofeno (Figuras 8 e 9).

Desta forma, no tratamento que utilizou óleo de milho como veículo, a reversão da ativação das transaminases do grupo acetaminofeno pela quercetina (no grupo “Q Antes”) mais uma vez poderia ser explicada pela presença do alfa-tocoferol no óleo de milho, que estaria exercendo um efeito protetor mais evidente que o do flavonóide, alterando, assim, tanto o efeito protetor da quercetina como a hepatotoxicidade do acetaminofeno. Já no tratamento que utilizou nujol como veículo, os efeitos observados no grupo “Q Antes”, podem ser atribuídos exclusivamente a quercetina.

Entretanto, tanto no tratamento com óleo de milho quanto com óleo mineral, o grupo tratado com o acetaminofeno apresentou um aumento na atividade das transaminases, em comparação com o grupo controle, comprovando que o veículo não influencia na toxicidade do acetaminofeno, apenas na ação do flavonóide.

O grupo tratado com a quercetina apresentou uma inibição significativa das transaminases, com ambos os veículos, quando comparado com o grupo tratado com acetaminofeno.

5.2.2 Fosfatases

Neste experimento, as atividades das fosfatases ácidas totais (FAT) e de baixa massa molecular relativa (FAB) não apresentaram modificações significativas no tratamento com quercetina (Figuras 10 e 11), comparadas com o grupo controle, diferentemente do perfil observado no tratamento com óleo de milho como veículo.

O efeito ativador da quercetina (dissolvida em óleo de milho) nas atividades da FAT e da FAB, nos experimentos anteriores, pode ser atribuído à influência do alfa-tocoferol presente no óleo de milho, que estaria alterando o efeito da quercetina, devido a sua grande atividade antioxidante. Neste experimento, que utiliza óleo mineral como veículo, este fator antioxidante está ausente e os resultados obtidos são atribuídos exclusivamente a quercetina.

Nas amostras do grupo tratado com quercetina (dissolvida em óleo mineral), não se observou nenhuma modificação na atividade da fosfatase ácida tartarato - resistente (FATR), em comparação com o grupo controle (Figura 12). Já no tratamento com óleo de milho como veículo, observou-se um aumento na atividade da FATR, do grupo tratado com quercetina, quando comparada com o grupo controle (Figura 7), o que poderia ter sido atribuído, como já foi dito, à presença do alfa-tocoferol no óleo vegetal.

A atividade da FATR (Figura 12) foi aumentada nos grupos tratados com acetaminofeno e com quercetina 4 horas antes da administração do acetaminofeno ("Q Antes"), independentemente do veículo utilizado para a administração do flavonóide.

Comparando-se os resultados obtidos entre fosfatases e transaminases pode-se observar que a atividade da FATR, no tratamento com nujol, demonstra uma semelhança muito grande com os resultados observados nos gráficos das transaminases e provavelmente pode ser considerada uma marcadora de dano hepático, necessitando-se de mais estudos para que se possa confirmar esta hipótese.

5.3 Tratamento agudo com quercetina e acetaminofeno – administração preventiva e terapêutica da quercetina

Este experimento foi realizado para avaliar se o efeito protetor da quercetina, sobre o dano hepático induzido pelo acetaminofeno, é preventivo, terapêutico ou se existe alguma ação conjunta com o acetaminofeno (quando administrados concomitantemente). O protocolo experimental é o mesmo descrito no item 5.2.

Os grupos aqui comparados foram: grupo tratado com quercetina 4h antes da administração do acetaminofeno ("Q Antes"), grupo tratado com acetaminofeno 4h antes da administração da quercetina ("A Antes") e grupo tratado com quercetina e acetaminofeno administrados ao mesmo tempo ("Q+A").

5.3.1 Transaminases

No tratamento com óleo de milho como veículo para a quercetina, observou-se um efeito preventivo da quercetina no grupo “Q Antes”, em comparação com o grupo tratado com acetaminofeno (Figuras 3 e 4).

Diferentemente do resultado observado no experimento com óleo de milho, o pré-tratamento com a quercetina e posterior administração do acetaminofeno (grupo “Q Antes”), não provocou nenhuma mudança nas atividades das transaminases TGO e TGP, em relação aos valores obtidos com grupo tratado somente com acetaminofeno (Figuras 8 e 9).

Desta forma, no tratamento que utilizou óleo de milho como veículo, a reversão da ativação das transaminases do grupo acetaminofeno pela quercetina (no grupo “Q Antes”), como já mencionado, poderia ser explicada pela presença do alfa-tocoferol no óleo de milho, o qual exerceria um efeito antioxidante, alterando tanto o efeito protetor da quercetina como a hepatotoxicidade do acetaminofeno.

Já no tratamento que utilizou nujol como veículo, os efeitos observados no grupo “Q Antes”, são atribuídos exclusivamente a quercetina. Pode-se verificar que houve um aumento na atividade da TGO e da TGP sinalizando que o flavonóide não reverteu o dano provocado pelo acetaminofeno (Figuras 8 e 9). Esta mudança na atividade da TGO e TGP pode ser resultado de alterações que ocorreram na estrutura da quercetina durante o intervalo entre a administração do flavonóide e o acetaminofeno. Esta alteração pode ser resultado da biotransformação da quercetina pelo sistema microsomal hepático impedindo que este flavonóide seja capaz de reverter os danos causados pela presença do acetaminofeno e dos seus metabólitos no parênquima hepático.

No entanto, pode-se observar seu efeito terapêutico (grupo “A Antes”) e conjunto com o acetaminofeno (“Q+A”), que provoca uma diminuição nos níveis das transaminases, quando comparadas com os demais grupos.

A reversão desta hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno demonstra claramente que a quercetina preserva a integridade estrutural da membrana hepatocelular. Este fato pode ser explicado devido à prevenção da saída das enzimas intracelulares pela membrana, estabilizando sua atividade. Isto está de acordo com a visão, geralmente aceita, de que os níveis plasmáticos das transaminases voltam ao normal com a regeneração do parênquima hepático e dos

hepatócitos (Thabrew *et al.*, 1987). Por ser um polifenol, a quercetina é capaz de prevenir a peroxidação lipídica da membrana dos hepatócitos, processo este que é iniciado pelas espécies reativas do oxigênio produzidas pela presença do acetaminofeno (Das & Ray, 1988; Bhatia & Jain, 2004). A peroxidação lipídica da membrana é o principal evento responsável pela destruição da membrana celular e, conseqüentemente, pela saída de importantes enzimas intracelulares responsáveis pela manutenção do parênquima hepático.

Essa diferença observada nos efeitos da quercetina, dependendo do veículo utilizado (óleo de milho ou nujol), mais uma vez poderia ser explicada pela influência do alfa-tocoferol presente no óleo de milho, fato que foi comprovado pelos resultados com Nujol.

5.3.2 Fosfatases

Ao analisar o efeito do acetaminofeno administrado antes da quercetina (dissolvida em óleo mineral), grupo “A Antes”, observou-se uma diminuição nas atividades das fosfatases ácidas totais (FAT) e de baixa massa molecular relativa (FAB). No grupo tratado com acetaminofeno, não houve nenhuma alteração na atividade destas fosfatases. Desta forma, este dado não pode ser analisado como uma “deficiência” da quercetina em reverter os danos provocados pelo acetaminofeno no tecido hepático em curto prazo (24 horas de tratamento), visto que o grupo que recebeu apenas o acetaminofeno não apresentou nenhuma alteração na atividade da FAT e da FAB, comparado com o controle. Também não se pode atribuir a diminuição da atividade destas fosfatases aos efeitos diretos da quercetina, pois, no grupo tratado com este flavonóide, também não se observou nenhuma modificação nas atividades da FAT e da FAB, comparado com o controle. Desta forma, pode-se dizer que a FAT e FAB não podem ser consideradas marcadoras diretas de dano hepático.

Comparando-se os resultados obtidos das fosfatases e das transaminases, pode-se observar que a FATR, no tratamento com nujol, provavelmente pode se considerada uma marcadora de dano hepático, como dito anteriormente, por ter apresentado uma semelhança muito grande com o perfil apresentados nos gráficos das atividades das transaminases.

A maioria dos efeitos da quercetina parece ocorrer em enzimas que participam da manutenção do funcionamento hepático e que podem ter o seu funcionamento alterado pelo acetaminofeno. Quando a quercetina está presente no meio intracelular, estas enzimas parecem voltar ao seu funcionamento normal e isto é refletido através de alterações na atividade das fosfatases.

A FATR sofre um aumento significativo na sua atividade, quando a quercetina é administrada 4 horas antes do acetaminofeno (grupo “Q Antes”), em relação aos outros tratamentos. Neste caso, as alterações observadas poderiam ser atribuídas aos efeitos secundários da quercetina. Ou seja, durante este período de quatro horas em que a quercetina ficou presente no organismo, o flavonóide sofreu uma série de transformações químicas na sua estrutura que podem ter influenciado o ambiente celular. Desta forma, não se pode afirmar que o aumento da atividade da FATR é atribuído exclusivamente a quercetina ou às mudanças que a quercetina promoveu no ambiente celular, durante este período.

O tratamento conjunto da quercetina com o acetaminofeno (“Q+A”), em relação à FATR, levou a uma diminuição significativa na atividade da enzima quando comparado ao tratamento com acetaminofeno, enquanto que nenhuma diferença, estatisticamente significativa, foi observada neste tratamento em relação ao controle.

Este dado mostra que, na administração conjunta com o acetaminofeno, a quercetina inibe a ação deste no ambiente celular como um todo, impedindo assim os danos causados por este composto no funcionamento do fígado. Entretanto, os resultados obtidos não permitem dizer como esta diminuição da atividade da fosfatase pode afetar o funcionamento hepático, mas acredita-se que esta diminuição possa significar que o funcionamento hepático esteja sendo restabelecido, pois a análise das transaminases mostra que a quercetina pode reverter os danos causados no fígado pela administração do acetaminofeno.

5.4 O veículo utilizado pode influenciar nos resultados – Óleo vegetal X Óleo mineral

Nos experimentos descritos nesta tese, para a administração da quercetina, foram utilizados dois veículos, o óleo vegetal de milho e o óleo mineral nujol. O óleo vegetal, como por exemplo, o óleo de milho, é bastante utilizado em experimentos *in vivo*; já o óleo mineral (nujol) tem sido mais utilizado recentemente. Apesar de existir também a opção de se utilizar o DMSO (dimetil sulfoxido), este não foi selecionado para os experimentos devido à toxicidade, dependendo da concentração. Concluiu-se, com os resultados obtidos, que uma mudança no veículo utilizado pode resultar numa variação dos resultados.

6 CONCLUSÕES

Embora a literatura a respeito de flavonóides seja muito vasta, assim como a de fosfatases, existem muito poucos trabalhos que relacionem o efeito protetor preventivo e terapêutico que estes polifenóis exercem no fígado, com a atividade de enzimas fosfatases. No sentido de contribuir com resultados que auxiliem na elucidação do mecanismo da ação biológica destes compostos, este trabalho verificou a ação do flavonóide quercetina sobre as atividades de fosfatases e transaminases *in vivo*.

Assim, dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- A dosagem da TGO (transaminase glutâmica oxalacética) e da TGP (transaminase glutâmica pirúvica) confirmou que o acetaminofeno pode realmente ser considerado hepatotóxico quando administrado ou ingerido em grandes concentrações no organismo.
- A quercetina, dissolvida em óleo mineral, reverteu a hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno nos tratamentos terapêuticos e em conjunto com acetaminofeno. A quercetina facilita a regeneração da integridade estrutural da membrana hepatocelular.
- A quercetina, dissolvida em óleo de milho, no tratamento preventivo, pode não ser a única responsável pela reversão da hepatotoxicidade causada pela administração do acetaminofeno, uma vez que quando se substituiu o veículo utilizado, óleo de milho pelo óleo mineral, este efeito não foi mais observado.

- Comparando-se os resultados obtidos entre fosfatases e transaminases pode-se observar que a atividade da FATR, no tratamento com nujol, demonstra uma semelhança muito grande com os resultados observados nos gráficos das atividades das transaminases e provavelmente pode ser considerada uma marcadora de dano hepático.
- O alfa-tocoferol, presente no óleo de milho, pode ter exercido um efeito antioxidante, e mascarado o efeito protetor da quercetina e a hepatotoxicidade do acetaminofeno.
- Este estudo foi importante para mostrar que a atividade dos flavonóides no organismo vivo pode ser influenciada por diversos fatores, como: a natureza do veículo utilizado na sua administração, ordem de administração e o tempo de permanência no organismo.

7 PERSPECTIVAS

Recentemente, muitos estudos têm sido apresentados à comunidade científica sobre a atuação de fitoquímicos como potenciais auxiliares no tratamento de diversas doenças, como o câncer. Alguns resultados prévios, obtidos em nosso laboratório de enzimologia, indicaram que antocianinas (uma classe de flavonóides) extraídas das cascas dos frutos de “Jambolão” e jabuticaba poderiam ter os efeitos benéficos descritos na literatura. Um outro aspecto importante que deve ser levado em consideração refere-se à capacidade de sequestro de radicais livres apresentada por flavonóides em sistemas biológicos.

São apresentadas, a seguir, algumas perspectivas do presente trabalho.

- Utilização de outros tipos de flavonóides, como por exemplo, as antocianinas, que possuem uma grande vantagem por serem solúveis em água.
- Realização de ensaios com enzimas antioxidantes, como catalase, superóxido dismutase e outras, para estudar a participação de espécies reativas de oxigênio no estresse oxidativo induzido pelo acetaminofeno.
- Variação nas vias de administração do flavonóide e do acetaminofeno para verificar se há mudanças nos resultados devido à rota de administração e, conseqüentemente, a forma de absorção.
- Realização de tratamentos subcrônico (30 e 90 dias), e comparação dos resultados obtidos, com o tratamento agudo (24 horas).

8 BIBLIOGRAFIA

- Abalea, V., Cillard, J., Dubos, M.P., Sargent, O., Cillard, P & Morel, I. (1999). Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures. **Free Rad. Biol. Med.**, 26: 1457-1466.
- Afanas'ev, I.B., Dorozhko, A.I., Brodskii, A.V., Kostyuk, V.A. & Potapovitch, A.I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, 38: 1763-1769.
- Alía, M., Horcajo, C., Bravo, L. & Goya, L. (2003). Effect of grape antioxidant dietaru fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. **Nut. Res.**, 23: 1251-1267.
- Antônio, M.A. & Brito, A.R.M.S. (1998). Oral anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **J. Ethnopharmacol.**, 61: 215-228.
- Aoyama, H., Silva, T.M.A., Miranda, M.A. & Ferreira, C.V. (2003). Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Quim. Nova**, 26 : 896 – 900.
- Bartlett, D. (2004). Acetaminophen toxicity. **J Emerg Nurs.**, 30: 281–283.
- Bernier, L. & Wang, E. (1996). A prospective view on phosphatase and replicative senescence. **Experimen. Gerontol.**, 31: 13-19.
- Bhatia, A.L. & Jain, M. (2004). Cspinacia oleracea L. Protects against gamma radiations: a study on glutathione and lipid peroxidation in mouse liver. **Phytomedicine.**, 11: 607-615.
- Birt, D.F., Mitchell, D., Gold, B., Pour, P & Pinch, H.C. (1997). Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. **Anticancer Res.** 17: 85-92.
- Bormann, H. & Melzing, M.F. (2000). Inhibition of metallopeptidases by flavonoids and related compounds. **Pharmazie.**, 55: 129-132.
- Bromer, M.Q.& Black, M. (2003). Acetaminofeno hepatotoxicity. **Clin Liver Dis.**, 7: 351–67.
- Cannons, J.L. & Schwartzberg, P.L. (2004). Fine-tuning lymphocyte regulation: what's new with tyrosine kinases and phosphatases? **Curr. Op. Immunol.** 16: 1-8.

- Carrero, P., Ortega, H., Botas, J.M., Coronado, D.G. & Lasunción, M.A. (1998). Flavonoid induced ability of minimally modified low density lipoproteins to support lymphocyte proliferation. **Biochem. Pharmacol.**, 55: 1125-1129.
- Cavagis, A.D.M., Ferreira, C.V., Versteeg, H.H., Assis, C.F., Bos, C.L., Bleuming, S.A., Diks, S.H., Aoyama, H. & Peppelenbosch M.P. (2006). Tetrahydroxyquinone induces apoptosis of leukaemia cells through diminished survival signalling. **Experim. Hematol.**, 34: 188-196.
- Cavagis, A.D.M., Granjeiro, P.A., Ferreira, C.V. & Aoyama, H., (2004). Effect of chaotropic agents on reversible unfolding of a soybean (Glycine max) seed acid phosphatase. **Phytochem.**, 65: 831-836.
- Chenoweth, M., Hake, C., (1962). The smaller halogenated aliphatic hydrocarbons. **Annual Rev. Pharm.**, 2: 363–398.
- Chu, S.C., Hieh, Y.S. & Lin, J.Y. (1992). Inhibitory effects of flavonoids on moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. **J. Nat. Prod.**, 55: 179-183.
- Cohen, S.D. & Khairallah, E.A. (1997). Selective protein covalent binding and acetaminofeno-induced hepatotoxicity. **Drug Metabol. Rev.**, 29: 59–77.
- Coles, B., Wilson, I., Wardmon, P., Hinson, J.A., Nelson, S.D. & Ketterer, B. (1988). The spontaneous and enzymatic reaction of *N*-acetyl-*p* benzoquinonimine with glutathione: a stopped-flow kinetic study. **Arch. Biochem. Biophys.**, 264: 253–260.
- Cushman, M., Nagarathmam, D., Burg, D.L. & Geahlen, R.L. (1991). Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activities of flavonoids analogues. **J. Med. Chem.**, 34: 798-806.
- Das, D.K. (1994). Naturally occurring flavonoids: structure, chemistry, and high-performance liquid chromatography methods for separation and characterization. **Meth. Enzymol.**, 234: 410-420.
- Das, M. & RAY, P. K. (1988). Lipid antioxidant properties of quercetin *in vitro*. **Biochem.**, 17: 203-209.
- Day, A.J., Cañada, F.J., Díaz, J.C., Kroon, P.A., Mclauchlan, R, Faulds, C.B., Plumb, G.W., Morgan, M.R.A. & Williamson, G. (2000). Dietary flavonoids and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hidrolase. **FEBS Lett.**, 468: 166-170.
- De Duve, C., Wattiaux, R. & Baudhuin, P. (1962). Distribution of enzymes between subcellular fractions in animal tissues. **Adv Enzyme Regul.**, 24:291-358.

- Denu, J.M., Stuckey, J.A., Saper, M.A. & Dixon, J.E. (1996). Form and function in protein dephosphorylation. **Cell.**, 47: 361-364;.
- Derby, L.E. & Jick, H. (1996). Acetaminofeno and renal and bladder cancer. **Epidemiology.**, 7: 358-62.
- Deschner, E.E., Ruperto, J., Wong, G. & Newmark, H.L. (1991). Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. **Carcinog.**, 12: 1193-1196.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A. & Capasso, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sc.**, 65: 337-353.
- Doostdar, H., Burke, M.D. & Mayer, R.T. (2000). Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. **Toxicol.**, 144: 31-38.
- Drexler, H.G. & Gignac, S.M. (1994). Characterization and expression of tartrate-resistant acid phosphatase (FATR) isoenzyme in hematopoietic cells. **Leukemia.**, 8: 359-368.
- Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutr. Res.**, 24: 851-874
- Erlund, I., Meririnne, E., Alfthan, G. & Aro, A. (2001). Plasma kinetics and urinary excretion of the flavonones naringenin and hesperitin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit. **J. Nutr.**, 131: 235- 241.
- Ferguson, L.R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutat. Res./Fund. Mol. Mechan. Mutagen.**, 475: 89-111.
- Ferreira, A.C.F., Rosenthal, D. & Carvalho, D.P. (2000). Thyroid peroxidase inhibition by *Kalanchoe brasiliensis* aqueous extract. **Fd Chem. Toxic.**, 38: 417-421.
- Ferreira, C.V., Granjeiro, J.M., Taga, E.M. & Aoyama, H. (1998). Purification and characterization of multiple forms of soybean seed acid phosphatases. **Plant Physiol. Biochem.** 36: 487-494.
- Ferriola, C.P., Cody, V. & Middleton, E. (1989). Protein Kinase C inhibition by plant flavonoids – Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. **Biochem. Pharmacol.**, 38: 1617–1624.
- Formica, J.V. & Regelson W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Fd Chem. Toxic.**, 33: 1061–1080.

- Fukushima, O., Bekker, P.J. & Gay, C.V. (1991). Ultrastructural localization of tartrate-resistant acid phosphatase (purple acid phosphatase) activity in chicken cartilage and bone. **Am. J. Anat.**, 191: 228-236
- Gago-Dominguez, M, Yuan, J.M, Castelao, J.E., Ross, R.K. & Yu, M.C. (1999). Regular use of analgesics is a risk factor for renal cell carcinoma. **Br J Cancer.**, 81: 542–548.
- Gamet-Payrastre, L., Manenti, S., Gratacap, M.P., Tulliez, J., Chap, H., & Payrastre, B. (1999). Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. **Gen. Pharmacol.**, 32: 279-286.
- Gonçalves, M.A., (2000). Purificação parcial e caracterização de fosfatases acidas de fígado de cação (*Rizoprionodon lalandei*). **Tese de Mestrado**, Instituto de Biologia, UNICAMP.
- Granjeiro, J.M., Ferreira, C.V., Jucá, M.B., Taga, E.M. & Aoyama, H. (1997) Bovine kidney low molecular weight acid phosphatase: FMN – dependent kinetics. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, 41: 1201-1208.
- Granjeiro, P.A., Ferreira, C.V., Granjeiro, J.M., Taga, E.M. & Aoyama, H. (1999). Purification and kinetic properties of a castor bean seed acid phosphatase containing sulfhydryl groups. **Physiol. Plant.** 107: 151-158.
- Gugler, R., Leschik, M. & Dengler, H.J. (1975). Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, 9: 229 – 234.
- GyamLani, G.G. & Parikh, C.R., (2002). Acetaminofeno toxicity: suicidal vs. accidental. **Critical Care**, 6: 155–159.
- Haenen, G.R.M.M., Paquay, J.B.G., Korthouwer, R.E.M. & Bast, A. (1997). Peroxynitrite scavenging by flavonoids. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 236: 591-593.
- Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Gilman, A.G. - Goodman & Gilman - **As Bases Farmacológicas da Terapêutica McGraw Hill**, 9ª ed., 1996.
- Havsteen, B.H. (2002). The Biochemistry and Medicinal Significance of the Flavonoids. **Pharmacol. & Therap.**, 96: 67-202.
- Hertog, M.G.L. (1996). Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. **Proc. Nutr. Soc.**, 55: 385-397.

- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M, Hollman, P.C.H., Katan, M.B. & Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. ***Lancet***, 342: 1007–1011.
- Hirano, T., Gotoh, M. & Oka, K. (1994). Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL 60 cells. ***Life Science***, 55: 1061-1069.
- Hodek, P., Trefil, P. & Stiborová, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. ***Chem-Biol Inter.***, 139: 1-21
- Hollman, P.C.H. & Katan, M.B. (1999). Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. ***Food Chem Toxicol.***, 37: 937–942.
- Hollman, P.C.H. & Katan, M.B. (1998). Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. ***Arch. Toxicol.***, 20: 237-248.
- Hollman, P.C.H., Gaag, M.V.D., Mengelers, M.J.B., Van Trijp, J.M.P., de Vries, J.H.M. & Katan, M.B., (1996). Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. ***Free Radical Biol. Med.***, 21: 703-707.
- Hollman, P.C.H., Van Trijp, J.M.P.; Buysman, M.N.C.P., Vandergaag, M.S., Mengelers, M.J.B., Vries, J.H.M. & Katan, M.B. (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. ***FEBS Lett.***, 418: 152-156.
- Holownia, A. & Braszko, J.J. (2004). Acetaminofeno alters microsomal ryanidine Ca²⁺ channel in HepG2 cells overexpressing CYP2E1. ***Biochem. Pharmacol.*** 68: 513–521
- Hu, F., Lu, R., Bao, H. & Liang, M. (2004). Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. ***Fitoterapia.***, 75: 14-23.
- Hu, M., Krausz, K., Chen, J., Ge, X., Li, J., Gelboin, H.L. and Gonzales, F.J. (2003). Identification of CYP1A2 as the main isoform for the phase I hydroxylated metabolism of genistein and a pro-drug converting enzyme of methylated isoflavones. ***Drug. Metab. Dispos.*** 31: 924 – 931.
- Janbaz, K.H., Saeed, S.A. & Gilani, A.H. (2004). Studies on the protective effects of caffeic acid and quercetin on chemical induced hepatotoxicity in rodents. ***Phytomedicine***, 11: 424–430

- Janchila, A.J., Yaziji, H., Lear, S.C., Martin, A.W. & Yam, L.T. (1996). Localization of tartrate-resistant acid phosphatase in human placenta. *Histochem.*, 28: 195-200.
- Jia, Z. (1997) Protein phosphatases: structures and implications. *Biochem. Cell. Biol.*, 75: 17-26.
- Johnson, J.L., Ellis, B.A., Noack, D., Seabra, M.C., & Catz, S.D., (2005). The Rab27a-binding protein, JFC1, regulates androgen-dependent secretion of prostate-specific antigen and prostatic-specific acid phosphatase. *Biochem. J.*, 391: 699–710.
- Johnson, L.N. & Barford, D. (1993). The effect of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 22: 199-232;
- Kang, T.B., & Liang, N.C. (1997). Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.*, 54: 1013-1018.
- Kaye J.A., Myers M.W. & Jick H. (2001). Acetaminofeno and the risk of renal and bladder cancer in the general practice research database. *Epidemiology.*, 12:690–694.
- Koes, R.E., Quattrocchio, F. & Mol, J.N.M. (1994). The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays.*, 16: 123-132.
- Korkina, L.G. & Afanas'ev, I.B. (1997). Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv. Pharmacol.*, 38: 151-163.
- Kraenzlin, M.E., Lau, K.H., Liang, L., Freeman, T.K., Singer, F.R., Stepan, J. & Baylink, D.J. (1990). Development of an immunoassay for human serum osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Clin Endocrinol Metab.*, 71: 442-51.
- Kuo, S.M. (1996). Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett.*, 110: 41-48.
- Lau, K.H., Stepan, J.J., Yoo, A., Mohan, S., Baylink, D.J., (1991). Evidence that tartrate-resistant acid phosphatases from osteoclastomas and hairy cell leukemia spleen are members of a multigene family. *Int. J. Biochem.*, 23:1237-1244.
- Le Marchand, L., Murphy, S.P., Hankin, J.H., Wilkens, L.R. & Kolonel, L.N. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *J. Nat. Cancer Inst.*, 92: 154-160.
- Lee, S.S.T., Buters, J.T.M., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P. & Gonzalez, F.J. (1996). Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminofeno. *J. Biol. Chem.*, 271: 12063–12067.

- Lee, W.M., (2004). Acetaminofeno and the U.S. acute liver failure group: lowering the risks of hepatic failure. **Hepatology**, 40: 6–9.
- Lepley, D.M. & Pelling, J.C. (1997). Induction of P21/WAF 1 and G1 cell-cycle arrest by the chemopreventive agent apigenin. **Mol. Carcinog.**, 19: 74-82.
- Lepley, D.M., Li, B, Birt, D.F. & Pelling, J.C. (1996). The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratynocytes. **Carcinogenesis**, 17: 2367-2375.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J., (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193: 265-275.
- Marchand, L.L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids: a review. **Biomed. Pharmacother.**, 56: 296-301.
- Mennen, L.I., Walker, R., Bennetau-Pelissero C., Scalbert A. (2005). Risks and safety of polyphenol consumption. **Am.J. Clin. Nutr.**, 81, 326S–329S.
- Metodiewa, D., Jaiswal, A.K., Cenas, N., Dickancaité, E. & Aguilar, J.S. (1999). Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. **Free Radical Biol. & Med.**, 26: 107-116.
- Middleton, E. JR., Kandaswami, C. & Theoharides T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalin cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol. Rev.**, 52: 673-751.
- Min, B.S., Nakamura, N., Miyashiro, H., Kim, Y.H. & Harttori, M. (2000). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and ribonuclease H activities by constituents of juglans mandshurica. **Chem. Pharmac. Bulletin.**, 48: 194-200.
- Minato, K.I., Miyake, Y, Fukumoto, S., Yamamoto, K., Kato Y., Shimomura, Y & Osawa, T. (2003). Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. **Life Sci.**, 72: 1609-1616.
- Miranda, M.A. (2005). Efeito de flavonóides sobre a atividade enzimática de fosfatases in vitro e in vivo. **Tese de Doutorado**, Instituto de Biologia, UNICAMP.
- Miranda, M.A., Okamoto, A.K., Ferreira, C.V., Silva, T.L., Granjeiro, J.M. & Aoyama, H. (2006). Differential effects of flavonoids on bovine kidney low molecular mass protein tyrosine phosphatase. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, 21: 419-425.
- Moon, T, Chi M.H., Kim, D.H., Yoon, C.N., & Choi, Y.K. (2000). Quantitative structure-activity relationships (QSAR) study of flavonoid derivatives for inhibition of cytochrome P450 1A2. **Quant. Struct. Act. Relat.**, 19: 257–263.

- Nelson, S.D., (1990). Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminofeno. ***Seminars in Liver Disease***, 10: 267–278.
- Oliveira, F.A., Chaves, M.H., Almeida, F.R.C., Lima, JR. R.C.P., Silva, R.M., Maia, J.L., Brito, G.A.A.C., Santos, F.A., Rao, V.S. (2005) Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. ***J. of Ethnopharmac.***, 98: 103–108
- Ono, K. & Nakane, H. (1990). Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. ***J. Biochem.***, 108: 609–613.
- Otake, Y. & Walle, T. (2001). Oxidation of the flavonoids galangin and kaempferide by human liver microsomes and CYP1A1, CYP1A2 and CYP2C9. ***Drug. Metab. Dispos.*** 30: 103-105.
- Paganga, G. & Rice-Evans, C.A. (1997). The identification of flavonoids as glycosides in human plasm. ***FEBS Lett.***, 401: 78-82.
- Palombino, D.D. (2006) Extração, purificação e isolamento de antocianinas de jambolão (*Syzygium cumini*) e avaliação dos seus efeitos biológicos. ***Tese de Mestrado***, Instituto de Biologia, UNICAMP.
- Peterson, J. & Dwyer, J. (1998). Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. ***Nutr. Res.***, 18: 1995-2018.
- Prescott, L.F. (2000). Paracetamol, alcohol and the liver. ***British J. Pharmacol.***, 49: 291–301.
- Ray, S.D., Mumaw, V.R., Raje, R.R. & Fariss, M.W. (1996). Protection of AAP-induced hepatocellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinate pretreatment. ***J. Pharmacol. Exper. Ther.*** 279: 1470–1483.
- Rej, R., (1978). Aspartate aminotransferase activity and isoenzyme proportions in human liver tissues. ***Clin. Chem.*** 24: 1971.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. ***Free Rad. Biol. Med.***, 20: 933-956.
- Robak, J. & Gryglewski, R.J. (1998). Flavonoids are scavengers of super oxide anions. ***Biochem. Pharmacol.***, 37: 837-841.
- Robinson, D.B. & Glew, R.H., (1980). Acid Phosphatase in Gaucher's Disease ***Clin. Chem.***, 26: 912-912.

- Sahu, S.C. & Gray, G.C. (1997). Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. ***Food Chem Toxicol***, 35: 4436-4447.
- Shimizu, I. (2000). Sho-saiko-to: Japanese herbal medicine for protection against hepatic fibrosis and carcinoma. ***J. Gastroenterol. Hepatol.***, 15: 84-90.
- Shimizu, K., Kondo, R. & Sakai, K. (2000). Inhibition of tyrosinase by flavonoids stilbenes and related 4-substituted resorcinols: Structure-activity investigations. ***Planta Medica.***, 66: 11-15.
- Shinozuka, K, Kikuchi, Y, Nishino, C., Mori, A. & Tawata, S. (1988). Inhibitory effect of Flavonoids on DNA-dependent DNA and RNA polymerases. ***Experientia.***, 44: 882–885.
- Silberberg, M., Morand, C., Mathevon, T., Besson, C., Manach, C., Scalbert, A. & Remesy, C., (2005). The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. ***Eur. J. Nutr.***, 45: 1436-6207.
- Silva, T.M.A. (2002). *Relação entre o efeito citotóxico de biocompostos sobre linfócitos T e a atividade de fosfatases*. ***Tese de Doutorado***, Instituto de Biologia, UNICAMP.
- Solimani, R. (1997). The flavonols quercetin, rutin and morin in DNA solution: UV-vis dichroic (and mid-infrared) analysis explain the possible association between the biopolymer and a nucleophilic vegetable-dye. ***Biochim. Biophys. Acta.***, 1336: 281-294.
- Srivastava, A.K. (1985). Inhibition of phosphorylase kinase, and tyrosine protein kinase activities by quercetin. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.***, 131: 1–5.
- Takakura, K., Beckman, J.S., MacMillan-Crow, L.A. & Crow, J.P. (1999). Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite. ***Arch. Biochem. Biophys.***, 369: 197-207.
- Tapiero, H., Tew, K.D., Nguyen Ba, G., Mathe, G. (2002). Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies?. ***Biomed. Pharmacother.***, 56, 200-207.
- Thabrew, M., Joice, P., Rajatissa, W., (1987). A comparative study of the efficacy of *Pavetta indica* and *Osbeckia octandra* in the treatment of liver dysfunction. ***Plan. Med.*** 53: 239–241.

- Torel, J., Cillard, J. & Cillard, P. (1986). Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radicals. *Phytochemistry*, 25: 383-385
- Trowbridge, I.S. (1991). CD 45. A prototype for transmembrane protein tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.*, 266: 23517-23520;
- Tsyrllov, I.B., Mikhailenko, V.M. & Gelboin, H.V. (1994). Isozyme- and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1A P-450s to different flavonoids. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)* 1205: 325-335.
- Uddin, S & Choudhry, A. (1995). Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the DNA synthesis of human leukemia Cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 36: 545–550.
- Valentovic, M., Terneus, M., Harmon, R.C., Carpenter, A.B. (2004). S-Adenosylmethionine (SAME) attenuates acetaminophen hepatotoxicity in C57BL/6 mice. *Toxic. Letters*, 154: 165–174
- Van Zanden, J.J., Ben Hamman, O., Van Iersel, M.L., Boeren, S., Cnubben, N.H., Lo Bello, M., Vervoort, J., van Bladeren, P.J. & Rietjens, I.M. (2003). Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by the flavonoid quercetin. *Chem. Biol. Interact.*, 145: 139-48.
- Walle, T., Otake, Y., Brubaker, J.A., Walle, U.K. & Halushka, P.V. (2001). Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 51: 143 – 146.
- Wang, H.K., Xia, Y., Yang, Z.Y., Natschke, S.L. & Lee, K.H. (1998). Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 439: 191-225.
- Wang, I.K., Lin-Shiau, S.Y. & Lin, J.K. (1999). Introduction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur. J.Cancer*, 35: 1517-1524.
- Young, C.R. & Mazure, C. (1998). Fulminant Hepatic Failure from Acetaminofeno in an Anorexic Patient treated with Carbamazepine. *J Clin Psychiatry*, 59: 622.
- Zhai, S., Daí, R., Wei, X, Friedman F.K. & Vestal, R.E. (1998). Inhibition of methoxyresorufin demethylase activity by flavonoids in human liver microsomes. *Life Sci.* 63:119 – 123.
- Zhang, M., Zhou, M., Van Etten, R.L. & Stauffacher, C.V. (1997). Crystal structure of bovine low molecular weight phosphotyrosyl phosphatase complexed with the transition state analog vanadate. *Biochem.*, 36: 15-23.

Zi, X., Mukhtar, H & Agarwal, R. (1997). Novel cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin: inhibitor of mRNA expression of an endogenous tumor promoter TNF. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.***, 239: 334-399.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/ tese de

mestrado/doutorado intitulada "Efeito da quercetina nas atividades fosfatásicas e seu efeito protetor na hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno em camundongos"

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1060-1).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (Protocolo nº _____).

Camila de Andrade Camargo
Aluno: Camila de Andrade Camargo

Hiroshi Aoyama
Orientador: Hiroshi Aoyama

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Profa. Maria Aparecida Guardado
Nome: CEEA/IB/Unicamp
Função: Comissão de Ética na Experimentação Animal