UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
TCC007- TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PEDRO ALVES MACHADO JUNIOR

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DA QUERCETINA SOBRE O PROCESSO REDOX E INFLAMAÇÃO HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS C57BL/6 EXPOSTOS A FUMAÇA DE CIGARRO

Ouro Preto
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
TCC007- TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DA QUERCETINA SOBRE O PROCESSO REDOX E INFLAMAÇÃO HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS C57BL/6 EXPOSTOS A FUMAÇA DE CIGARRO

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Farmácia

Área de concentração: Bioquímica metabólica e fisiológica

Orientador: Profª. Drª. Sílvia Dantas Cangussú
Co-orientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezzerra

PEDRO ALVES MACHADO JUNIOR

Ouro Preto
2019

M149e Machado Junior, Pedro Alves.
Efeitos da administração da quercetina sobre o processo redox e inflamação hepática em camundongos C57BL/6 expostos a fumaça de cigarro [manuscrito] / Pedro Alves Machado Junior. - 2019.

46f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Sílvia Dantas Cangussú.
Coorientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezzerra.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Reação de oxidação-redução. 2. Estresse oxidativo. 3. Quercetina . 4. Fígado-Doenças. I. Cangussú, Sílvia Dantas. II. Bezzerra, Frank Silva. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Titulo.

CDU: 577.1

Catalogação: ficha.sisbin@ufop.edu.br

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 444ª MONOGRAFIA DO CURSO DE FARMÁCIA DA ESCOLA DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. Aos 03 dias do mês de julho de dois mil e dezenove, quarta-feira, realizou-se, a partir das 17 horas e 30 minutos, no auditório da Escola de Farmácia, no Campus Morro do Cruzeiro, a sessão de defesa de monografia do candidato ao grau de Farmacêutico Generalista, **Pedro Alves Machado Júnior,** matrícula 15.1.2130, intitulada **Efeitos da administração da quercetina sobre o processo redox e inflamação hepática em camundongos c57bl/6 expostos à fumaça de cigarro.** A Banca Examinadora foi constituída pela doutoranda Daiane Teixeira de Oliveira, CIPHARMA/EF/UFOP, pelo Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão, DEFAR/EF/UFOP e pela orientadora Profa. Dra. Sílvia Dantas Cangussú, DECBI /ICEB/UFOP. De acordo com o regulamento do Curso, a orientadora, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra ao candidato, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva defesa do candidato. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença do candidato e do público, tendo deliberado pela sua aprovação, com a NOTA 100. Comunicou-se ao candidato que essa nota somente será liberada para a PROGRAD, após a entrega do exemplar definitivo de acordo com as normas estabelecidas pelo Sistema de Bibliotecas e Informação (Sisbin), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com as devidas correções sugeridas pela banca, com o aval escrito da orientadora. Nada mais havendo para constar, a presente ata foi lavrada por Gustavo Franco Campos, secretário do Colegiado de Farmácia, que após a leitura pública da mesma seguirá assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela Presidente do Colegiado. Ouro Preto, 03 de julho de 2019.

Profa. Dra. Silvia Dantas Cangussú
(orientadora)

Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão

Doutoranda Daiane Teixeira de Oliveira

Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva
Presidente do Colegiado de Farmácia

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família e a todos que me ajudaram conseguir chegar até aqui.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, professora Drª Sílvia Dantas Cangussú, por acreditar na minha capacidade e me oferecer a oportunidade de realizar esse trabalho, assim como todo o incentivo e auxílio na realização dele. Obrigado por essa jornada de conhecimento, pelos momentos vividos (tristes ou felizes). Obrigado por estar sempre presente, mesmo quando longe (na sua licença médica), nas horas que mais precisei. E acima de tudo obrigado por se tornar mais que minha orientadora, minha eterna amiga.

Ao professor Dr. Frank Silva Bezerra como meu co-orientador por compartilhar um pouco do seu conhecimento nas orientações e conselhos não somente relacionados ao trabalho, mas à vida também.

A equipe do Laboratório de Fisiopatologia Experimental (LAFEx), que considero como uma família, por toda amizade, trabalho em equipe e ajuda que foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço aqueles que não estão mais nessa equipe, mas mesmo de longe estão a me ajudar quando necessário (Thais Lourenço Martins, Camila de Oliveira, Mônica Campos, Jonathan Kofi, Amanda, Erika Tiemi, Matheus Rocha). Agradeço aquela que foi tirada de nós muito cedo, que sempre estava pronta a me ajudar nas orientações e que tenho como eterna amiga, Keila Karine Duarte Campos. Agradeço o companheirismo dessa equipe mais que competente, Laisy, Michel Ângelo, Daniela, Rafael, Leandro. Agradeço especialmente aquelas pessoas que sem elas não teria conseguido desenvolver esse trabalho, Natália Araújo por estarmos juntos nesse trabalho desde o início, a nossa pós-doc favorita, Natália Matos por sempre estar presente me auxiliando no que fosse necessário. À Ana Beatriz e Thalles Castro por se fazerem sempre presentes em toda minha experiência no laboratório, pela ajuda em todas as análises, pelos conselhos, sem vocês esse trabalho não teria sido o mesmo, obrigado do fundo do meu coração.

Agradeço ao professor Dr. Cristiano S. de Azevedo por me ajudar nas horas de angústias com leituras de artigos, relatórios, etc., e por ser essa pessoa maravilhosa com quem tenho a felicidade de conviver. Aos nossos grandes parceiros Dr. Guilherme de Paula, no auxílio as análises e a professora Drª Paula Melo pelo auxílio nas orientações e no desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

As doenças hepáticas representam importante foco de atenção tendo em vista as múltiplas funções do fígado no organismo. A maior parte dos fatores de risco evitáveis para o organismo, como o tabagismo, é fonte de espécies reativas de oxigênio e pode promover a progressão de doenças hepáticas. Estudos tem demonstrado que a quercetina, um antioxidante natural, apresenta papel antioxidante e anti-inflamatório em algumas patologias hepáticas, entretanto, o efeito hepatoprotetor e antioxidante deste flavonóide ainda não foram demonstrados em modelos experimentais de lesão hepática induzida por fumaça de cigarro (FC). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da administração da quercetina via gavagem orogástrica, no fígado de camundongos C57BL/6 expostos à FC em longo prazo. Os animais foram divididos em 5 grupos (n=10): controle (GC), propilenoglicol (GPG), quercetina (GQC), fumaça de cigarro (GFC), quercetina e FC (GQCFC). Os animais GC, GQC e GPG foram expostos ao ar ambiente por sessenta dias enquanto os grupos GFC e GQCFC foram expostos a 12 cigarros comerciais por dia, três vezes ao dia durante sessenta dias, através da utilização de uma câmara de inalação de FC. Os grupos GQC e GQCFC receberam quercetina, via gavagem orogástrica, na dose de 10 mg/kg/dia diluídos em 200 µl de propilenoglicol. O grupo GPG recebeu 200 µl de propilenoglicol via gavagem orogástrica. Vinte e quatro horas depois, os animais foram eutanasiados e amostras de sangue e tecido hepático foram coletadas para análises morfológicas, morfométricas e bioquímicas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00 para o Windows 7. Os dados foram expressos como média ± EPM ou medianas e $p < 0,05$ foi considerado significativo. As análises morfológicas do tecido hepático evidenciaram diversas injúrias provocadas pela FC, tais como: degeneração hidrópica, processo inflamatório, reação granulomatosa, hiperemia, congestão e hemorragia. A administração de quercetina promoveu diminuição ou desaparecimento dessas lesões. Houve maior influxo de células inflamatórias no fígado dos animais do grupo GFC em comparação aos GC, GQC, GPG e GQCFC. Parâmetros bioquímicos revelaram um aumento na atividade da superóxido dismutase no GFC comparado aos outros grupos. A atividade da catalase foi maior no GC quando comparada com o GFC e quando comparada ao GQCFC. O grupo exposto ao FC apresentou menor razão entre glutationa reduzida e oxidada (GSH/GSSG) e maiores níveis de peroxidação lipídica em relação aos outros grupos. Os resultados indicaram que a exposição à FC gera lesões e influxo de células inflamatórias no parênquima hepático, além de promover dano e estresse oxidativo. Por outro lado, a administração de quercetina levou à diminuição ou desaparecimento das lesões hepáticas, diminuição do influxo celular e promoveu melhora no dano e no estresse oxidativo gerado pela exposição à FC. Dessa maneira, podemos afirmar que a quercetina tem papel promissor como ferramenta farmacológica auxiliar no tratamento de danos gerados ao fígado pela exposição à fumaça de cigarro.

Palavras-chave: quercetina, inflamação hepática, lesão hepática, fumaça de cigarro, estresse oxidativo

ABSTRACT

Liver diseases represent an important focus of attention in view of the multiple functions of the liver in the body. Most avoidable risk factors to the body, such as smoking, are a source of reactive oxygen species and can lead to liver diseases. Studies have shown that quercetin, a natural antioxidant, has been shown to play an antioxidant and anti-inflammatory role in some liver diseases, however, the hepatoprotective and antioxidant effect of this flavonoid have not yet been demonstrated in experimental models of hepatic injury induced by cigarette smoke (CS). Thus, this study aimed to evaluate the effects of quercetin administration in C57BL/6 mice exposed to long-term exposure to CS. The animals were divided in 5 groups (n=10): control (CG), quercetin (QG), propylene glycol (PG), cigarette smoke (CSG), quercetin and CS (QCSG). Animals from CG, QG, and PG were exposed to ambient air while CSG, QCSG, and PCSG were exposed to CS to 12 commercial cigarettes a day for sixty days, in an inhalation chamber. QG and QCSG received by orogastric gavage 10 mg/kg/day diluted in 200 µL of propylene glycol. PG received by orogastric gavage 200 µL of propylene glycol. Twenty-four hours after, the animals were euthanized and blood and hepatic tissue samples were removed for morphological, morphometric and biochemical analyzes. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 5.00 for Windows 7. Data were expressed as mean ± SEM or median and $p < 0.05$ was considered significant. Morphological analyzes of liver tissue revealed several injuries caused by CS, such as: hydropic degeneration, inflammatory process, granulomatous reaction, hyperemia, congestion, and hemorrhage. Administration of quercetin promoted decrease or disappearance of these lesions. Moreover, there was a greater influx of inflammatory cells (number of cells/field) into the liver of animals exposed to CS compared to the other groups. Biochemical parameters revealed an increase in the activity of superoxide dismutase in CSG compared to the others. Catalase activity was higher in the CG when compared to the CSG and when compared to the QCSG. The group exposed to CS showed a lower ratio between reduced and oxidized glutathione (GSH/GSSG) compared to QG and QCSG. The levels of lipid peroxidation were higher in CSG compared to the other groups. Our data indicate that exposure to cigarette smoke generates hepatic lesions with influx of inflammatory cells into the hepatic parenchyma and promotes damage and oxidative stress. On the other hand, the administration of quercetin led to a decrease or disappearance of the hepatic lesions, a decrease in cellular influx and promoted an improvement in damage and oxidative stress generated by cigarette smoke exposure. Thus, we can affirm that quercetin has a promising role as an auxiliary pharmacological tool in the treatment of damage to the liver due to exposure to cigarette smoke.

Key words: quercetin, hepatic inflammation, liver injury, cigarette smoke, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....16

Figura 2.....20

Figura 3.....28

Figura 4..... 30

Figura 5.....31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....29

Tabela 2..... 33

Tabela 3.....37

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – Alanina aminotransferase
AST – Aspartato aminotransferase
BSA – Albumina bovina
CAT – Catalase
CCA – Centro de Ciência Animal
CCL2 - CC chemokine ligand
CO – Monóxido de carbono
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxiribonucléico
DNPH – 2,4- difenilhidrazina
DTNB – Ácido 5,5´-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
GC – Grupo controle
GFC – Grupo fumaça de cigarro
GPG – Grupo propilenoglicol
GQC – Grupo quercetina
GQCFC – Grupo suplementado com quercetina + fumaça de cigarro
GPx – Glutationa peroxidase
GSH – Glutationa reduzida
GSSG – Glutationa oxidada
ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)
FC – Fumaça de cigarro
HE – Hematoxilina e Eosina
IFN-γ – Interferon gama
IL-6 – Interleucina 6
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 – Interleucina 22
iNOS - Sintase induzida de óxido nítrico
MTT – Brometo de 3-[4,5 - dimetiltiazol - 2H] - 2,5 - difenilterazolio
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OPD - θ-phenylenediamine
PBS – Solução salina fosfatada
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SOD – Superóxido dismutase
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBA – Ácido tiobarbitúrico
TCA – Ácido tricloroacético
TEA – Trietanolamina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....15
3. OBJETIVOS.....18
   3.1.Geral.....18
   3.2.Específicos.....18
4. METODOLOGIA.....19
   4.1. Animais.....19
   4.2. Eutanásia, processamento tecidual e homogeneizado tecidual.....20
   4.3. Coloração com Hematoxilina e Eosina.....21
   4.4. Coloração com Picrosirius.....21
   4.5.Alterações histopatológicas do parênquima hepático.....21
   4.6. Biomarcador do dano e estresse oxidativo 22
      4.6.1. Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....22
      4.6.2. Proteína carbonilada.....22
      4.6.3. Atividade de enzimas antioxidantes: Superóxido dismutase (SOD).....23
      4.6.4. Atividade de enzimas antioxidantes: Catalase (CAT).....23
      4.6.5. Atividade de enzimas antioxidantes: Sistema Glutationa.....24
   4.7.Ensaios Imunoenzimáticos do fígado.....24
   4.8.Análises estatísticas.....25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....26
   5.1.Aspectos histopatológicos do parênquima hepático.....26
   5.2.Biomarcadores de estresse e dano oxidativo.....32
   5.3.Ensaios imunoenzimático.....36
6. CONCLUSÃO.....39
7. REFERÊNCIAS.....40
8. ANEXO.....47

1. INTRODUÇÃO

A fumaça de cigarro é composta de várias sustâncias químicas capazes de promover dano a vários tecidos biológicos. Tendo como principal mecanismo a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que desencadeia alterações no processo redox e inflamação, que são descritos na base patológica de várias comorbidades envolvendo a fumaça de cigarro. (Barbosa *et al.*, 2010; Westra *et al.*, 2013; Dalrymple *et al.*, 2015).

Atuando de maneira sistêmica a fumaça de cigarro exerce efeitos diretos em células e tecidos, desenvolvendo processos oxidativos, inibindo sistemas especializados no processo de neutralização e defesa. Contribuindo para a instalação do estresse oxidativo, seja por uma ação direta, na produção de ERO ou pela ativação do processo inflamatório que resulta na produção de espécies radicalares (Vaamonde-Garcia *et al.*, 2012; Hoffmann *et al.*, 2013).

As doenças hepáticas representam importante foco de atenção tendo em vista as múltiplas funções do fígado no organismo, dentre elas o processamento de drogas, álcool e outras toxinas. O desequilíbrio redox induzido pela exposição crônica à fumaça de cigarro produz toxinas com efeitos tóxicos diretos ou indiretos, efeitos imunológicos e efeitos oncogênicos no fígado, levando ao aumento do número de células inflamatórias, deposição de colágeno e apoptose. Seu curso frequente e diário pode levar ao carcinoma hepatocelular (Altamirano e Bataller, 2010).

Vários estudos têm demonstrado a ação anti-inflamatória e antioxidante de várias substâncias de origem natural na prevenção de doenças. Neste âmbito vale ressaltar o papel exercido pela quercetina, o flavonoide mais abundante na dieta, podendo ser encontrada em alimentos de origem vegetal como cebola, maçã, grãos e sementes entre outros. A maior parte da ingestão na dieta de quercetina consiste em seus derivados glicosados, o que reflete diretamente no perfil de biodisponibilidade e bioatividade dessa substância. Trabalhos sugerem que a maior absorção da quercetina se dá na forma aglicona e que existem diferentes mecanismos para absorção das suas diferentes apresentações, aglicona ou glicosada. Fortes evidências mostram que sua maior absorção ocorre na parte superior do intestino delgado, ocorrendo por difusão passiva (Crespy *et al.*, 1999; Nait Chabane *et al.*, 2009; Guo e Bruno, 2015).

A ingestão de quercetina por dia na dieta varia entre 5-40 mg/dia, entretanto, esses valores podem aumentar para 200-500 mg/dia em indivíduos que consomem grandes

quantidades de alimentos ricos neste nutriente. Entre os americanos consumo diário de quercetina é de 25 mg e a média de consumo na dieta ocidental é de cerca de 16 mg/dia (Sak, 2014; Carrasco-Pozo *et al.*, 2016).

Dessa maneira, foi demonstrado que a quercetina pode atuar de forma benéfica em várias patologias hepáticas por exercer ação moduladora sobre a inflamação, fibrose e o desequilíbrio redox através da interação com um amplo espectro de alvos moleculares centrais para a maquinaria de sinalização celular, tendo papel promissor no tratamento de doenças inflamatórias crônicas do fígado. Entretanto, o efeito hepatoprotetor e antioxidante da quercetina ainda não foram demonstrados em modelos experimentais de lesão hepática induzida por fumaça de cigarro. Portanto, este estudo tem como objetivo avaliar se a administração de quercetina será capaz de diminuir o desequilíbrio redox e inflamação hepática em camundongos com exposição à fumaça de cigarro em longo prazo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

As doenças hepáticas representam importante foco de atenção tendo em vista as múltiplas funções do fígado no organismo, dentre elas o processamento de drogas, álcool e outras toxinas. A maior parte dos fatores de risco evitáveis para o organismo (drogas, irradiação e tabagismo) é fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) e leva à disfunção celular e citoxicidade (Hoffmann *et al.*, 2001), podendo originar várias doenças hepáticas (Sanchez-Valle *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015).

A fumaça do cigarro (FC) contém substâncias como a nicotina, o monóxido de carbono, o alcatrão, os agrotóxicos e as substâncias radioativas com efeitos adversos para quase todos os órgãos do corpo, mesmo aqueles que não têm contato direto com a fumaça, como é o caso do fígado (El-Zayadi, 2006). Além disso, a maior parte da nicotina (90 a 95%) absorvida pelo organismo é metabolizada no fígado (Issa *et al.*, 2019).

Os compostos químicos da FC são capazes de promover dano oxidativo em moléculas como o ácido desoxirribonucléico (DNA), proteínas e ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (Martins Chaves *et al.*, 2000; Fubini e Hubbard, 2003; Perlstein e Lee, 2006). O excesso de ERO, que também pode ser gerado por células inflamatórias ativadas (Boutten *et al.*, 2010), rompe a homeostase provocando o desequilíbrio redox, que por sua vez resulta em estresse oxidativo.

O desequilíbrio redox induzido pela exposição à FC em longo prazo produz toxinas com efeitos imunológicos e oncogênicos no fígado (El-Zayadi, 2006). A FC aumenta a severidade das lesões hepáticas relacionadas à hepatite C (Pessione *et al.*, 2001) e à hepatite B (Yu *et al.*, 2000). Além disso, a FC pode levar à hipóxia tecidual por diminuir a capacidade de transporte de oxigênio pelas hemácias (El-Zayadi, 2006) e aumentar o risco do desenvolvimento de câncer hepático, principalmente o carcinoma hepatocelular (Yu *et al.*, 2000; Trichopoulos *et al.*, 2011).

Entretanto, organismos aeróbicos possuem um sistema antioxidante integrado capaz de bloquear os efeitos prejudiciais dos ERO. O sistema antioxidante enzimático ocorre através de enzimas antioxidantes endógenas ao organismo e o não enzimático, através de substâncias endógenas ou exógenas (adquiridas através da dieta) com efeito antioxidante (Birben *et al.*, 2012).

O sistema antioxidante enzimático é baseado na ação de três enzimas: a glutationa peroxidase (GPx), que promove a redução de peróxidos, a catalase (CAT), que converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular e a superóxido dismutase (SOD), que converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. O sistema não enzimático engloba os minerais, compostos fenólicos e vitaminas com função antioxidante que auxiliam neste sistema.

Embora os antioxidantes estejam disponíveis no corpo, tem sido demonstrada que a utilização de substâncias exógenas antioxidantes tem papel significativo como estratégia terapêutica para doenças hepáticas relacionadas ao estresse oxidativo (Chen, 2010), dentre eles os flavonoides (Pavanato *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2017).

A quercetina, um membro da família dos flavonoides, está presente em muitos alimentos como maçã, cebola e brócolis. Como todos os flavonoides, ela apresenta uma estrutura química básica contendo um esqueleto de difenil propano e dois anéis benzênicos ligados a um anel pirano e vários radicais hidroxila (3,3′,4′,5,7-pentahidroflavona), o que lhe confere efeitos antioxidante e anti-inflamatório (Ganesan *et al.*, 2010). Além de também ter sido descrita como anti-apoptótica e de ter atividade hepatoprotetora (Wu *et al.*, 2017).

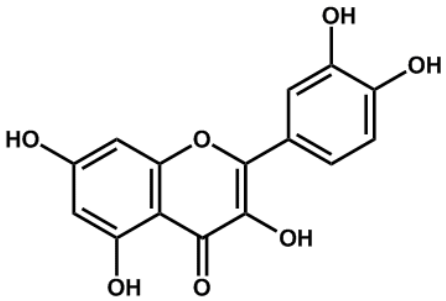

Figura 1: Fórmula estrutural da Quercetina Fonte: D'andrea (2015).

O efeito antioxidante da quercetina ocorre por vários mecanismos, tais como sua capacidade de reagir com espécies reativas e formar radicais fenoxi menos reativos, de atuar na prevenção da peroxidação lipídica através da neutralização de ERO e de inibir várias proteínas quinases (Kahraman *et al.*, 2003).

O papel antioxidante e anti-inflamatório exercido pela quercetina no fígado têm sido explorados por alguns autores. Um estudo em ratos com cirrose hepática induzida pelo tetracloreto de carbono mostrou que a administração de quercetina melhorou a histologia do

fígado e reduziu o conteúdo de colágeno, a expressão de iNOS (sintase induzida de óxido nítrico) e a peroxidação lipídica hepática (Pavanato *et al.*, 2003; Kabirifar *et al.*, 2017).

Chen (2010), descreveu efeito antioxidante, anti-inflamatório e hepatoprotetor da quercetina em modelo animal de lesão hepática provocada por etanol. Outro estudo envolvendo ratos obesos suplementados com uma combinação de compostos bioativos contendo quercetina sugeriu o papel da quercetina em auxiliar na prevenção da obesidade (Yang *et al.*, 2012). Além disso, alguns estudos demonstraram o papel da quercetina em diminuir os níveis de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no sangue, já que tais enzimas são liberadas após morte dos hepatócitos e são marcadores de dano hepático (Kabirifar *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017).

A atividade antioxidante da quercetina está principalmente ligada à presença de um anel catecol no anel B e uma hidroxila na posição 3 do anel C da sua estrutura. Fornecendo a quercetina uma conformação ideal para neutralização de espécies radicalares, tornando a quercetina um dos antioxidantes mais potentes entre os flavonoides (Lemanska *et al.*, 2004; Di Meo *et al.*, 2013). Seu poder antioxidante se dá por diversos mecanismos, sabe-se principalmente que ela está envolvida na modulação do conteúdo de ERO e também na atividade de enzimas antioxidantes, ambas as vias relacionadas ao desequilíbrio redox e inflamação hepática induzida pela fumaça de cigarro (Li *et al.*, 2016). Estudos que avaliam o efeito antioxidante da quercetina ainda são poucos, demonstrando assim a necessidade de estudos mais específicos da influência deste composto no balanço oxidante/antioxidante e nas vias de sinalização envolvidas neste processo. Além disso, o efeito hepatoprotetor e antioxidante da quercetina ainda não foram demonstrados em modelos experimentais de lesão hepática induzida por fumaça de cigarro.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar os efeitos da quercetina sobre o desequilíbrio redox e inflamação hepática em camundongos expostos à fumaça de cigarro.

3.2. Específicos

Em camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro de em longo prazo (60 dias), analisar o potencial da quercetina:

- em diminuir alterações histopatológicas do fígado (inflamação, hiperemia, congestão sinusoidal, processos degenerativos, fibrose).
- em diminuir a oxidação de lipídeos no tecido hepático, pela dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.
- sobre a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutationa total no tecido hepático.
- sobre a expressão CCL2 e citocinas pró-inflamatórias IL-6, IFN e a anti-inflamatória IL-10 no tecido hepático.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Foram utilizados 59 camundongos machos da linhagem C57BL/6, com 12 semanas de idade e massa corporal de aproximadamente 25 g, provenientes do biotério do Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais foram acondicionados em grupos de cinco por gaiola, com temperatura, umidade e luminosidade controladas e receberam água e ração padrão balanceada *ad libitum*. Depois eles foram divididos nos seguintes grupos: o primeiro grupo, animais expostos ao ar ambiente (GC), o segundo, recebeu propilenoglicol por gavagem orogástrica (GPG), o terceiro com quercetina 10 mg/kg/dia diluído em propilenoglicol por gavagem orogástrica (GQC) (Ganesan *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012), o quarto exposto à FC (12 cigarros, 3 vezes ao dia) durante sessenta dias consecutivos (GFC), o quinto expostos à FC (12 cigarros, 3 vezes ao dia) durante sessenta dias consecutivos e tratados com quercetina 10 mg/kg/dia diluído em propilenoglicol por gavagem (GQCFC). A administração da quercetina ocorreu por via gavagem orogástrica no volume de 10mg/kg/dia 12 horas antes de cada exposição à fumaça de cigarro (Ganesan *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012).

Nesse experimento, cada grupo exposto à FC foi exposto a um total de 12 cigarros comerciais por dia, três vezes ao dia, ou seja, quatro cigarros ao início da manhã, quatro à hora do almoço e quatro ao final da tarde durante sessenta dias consecutivos. Estes camundongos foram colocados em uma câmara de inalação (40 cm x 30 cm x 25 cm), dentro de uma capela de exaustão. Cada cigarro foi acoplado a uma seringa plástica de 60 ml, com a qual se injetou a fumaça no interior da câmara de inalação. O procedimento de insuflar e desinsuflar a seringa termina com a queima do cigarro até o seu terço final, que durou em média 3 minutos. Um cigarro gera aproximadamente 1L de fumaça que foi diluída em 30 L (capacidade da câmara). A concentração de fumaça no interior da câmara é de 3% durante 6 minutos por cigarro (que produz concentrações de monóxido de carbono que variam de 250 para 350 ppm no interior da câmara). Após este período, a câmara foi aberta para total exaustão da fumaça e, por um minuto, os animais tiveram contato com o ar ambiente, quando então, o procedimento foi repetido com os demais cigarros (figura 2) (Campos *et al.*, 2013). Os animais ventilados em ar ambiente nas mesmas condições foram considerados dos grupos controles.

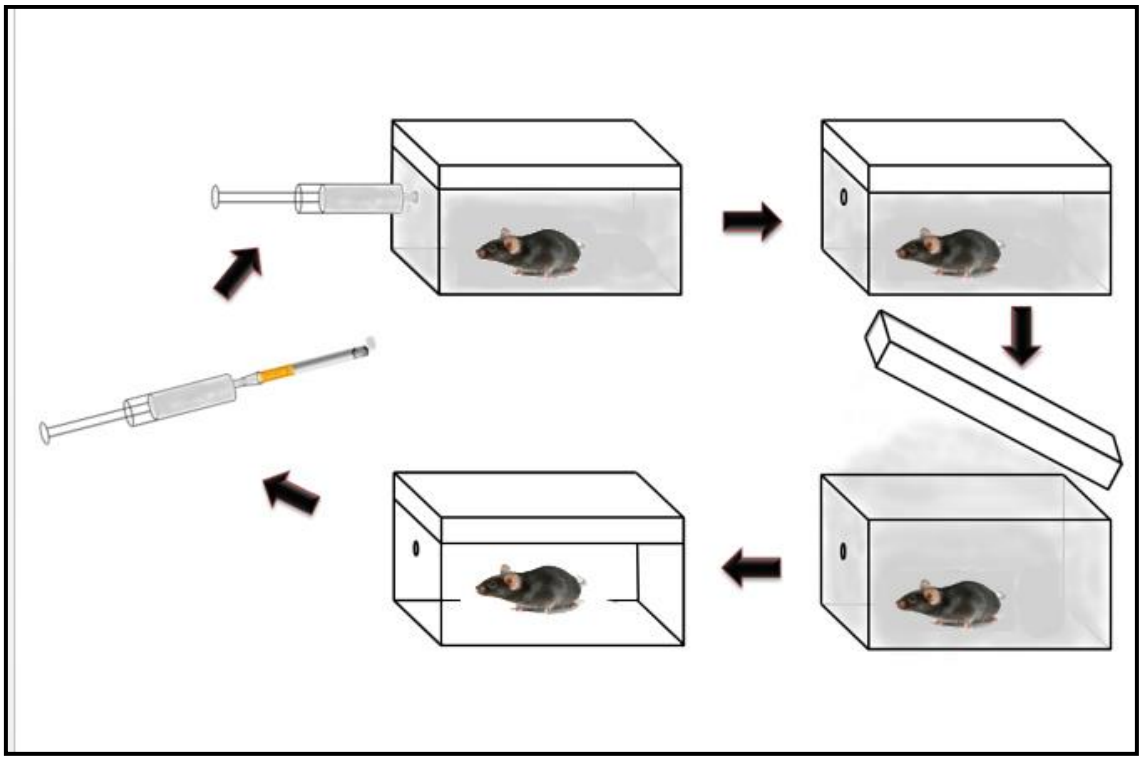

Figura 2. Esquema da Câmara de Inalação (40 cm de comprimento, 30 cm de largura e 25 cm de altura) (Campos *et al.*, 2013).

O presente estudo foi aceito pelo comitê de ética para estudos com animais experimentais da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) sob o protocolo de número 2015/20 (**ANEXO**). Vinte quatro horas após a última exposição à fumaça de cigarro os animais foram eutanasiados.

4.2. Eutanásia, processamento tecidual e homogeneizado tecidual

Após vinte e quatro horas de exposição ao oxigênio, todos os animais foram submetidos à anestesia com ketamina (130 mg / kg) e xilazina (0,3 mg / kg) e eutanasiados por exsanguinação. Imediatamente após a eutanásia, fragmentos de tecido hepático foram coletados, e fixados em formol tamponado 4% por 24-48 horas, e depois processados rotineiramente para inclusão em parafina. Os cortes histológicos de 4 micrômetros foram corados em Hematoxilina e Eosina, além de Picrosirus (avaliação da fibrose tecidual) para as análises histopatológicas e morfométricas.

Parte do tecido hepático foi mantida em gelo até o final do procedimento, a fim de evitar lise celular. Após a eutanásia de todos os grupos, estas amostras mantidas em gelo foram centrifugadas (Centrifuga Micro FANEM mod. 243M, São Paulo, Brasil) a 1500 x g (4.700 RPM) por 10 minutos e o sobrenadante coletado e estocado em freezer (-80ºC).

4.3. Coloração com Hematoxilina e Eosina

Secções de fígado fixadas em lâminas histológicas de vidro foram desparafinadas em xilol e hidratadas em uma serie decrescente de álcoois (absoluto 90°, 80° e 70°). Após hidratação as lâminas foram coradas por 1 minuto e 30 segundos pela solução de Hematoxilina Harris, seguida de diferenciação em água corrente por 30 minutos. As lâminas foram posteriormente coradas pela solução de Eosina por 40 segundos, desidratadas em série crescente de álcoois (70°, 80°, 90° e absoluto) e montadas com lamínula e solução de Entellan.

4.4. Coloração com Picrosirius

Para marcação de fibras colágenas foi utilizada a técnica de Picrosirius. Após a microtomia do tecido hepático, Secções de fígado fixadas em lâminas histológicas de vidro foram desparafinadas em xilol e hidratadas em uma serie decrescente de álcoois (absoluto 90°, 80° e 70°). Após, os cortes foram incubados por 1 hora com o corante Sirius Red 0,1% em solução saturada de ácido pícrico. Posteriormente, foram imersos em uma solução de ácido acético 1% por 30 minutos, sendo lavados em água corrente no fim da incubação. As lâminas foram então incubadas com hematoxilina por 5 minutos, seguida de diferenciação em ácido clorídrico por alguns segundos. Finalmente, as lâminas foram imersas em álcool absoluto I e II, durante 1 minuto em cada solução, terminando em uma imersão de xilol por 3 minutos e montadas com lamínula e solução de Entellan.

4.5. Alterações histopatológicas do parênquima hepático

As análises histopatológicas foram realizadas morfologicamente, de maneira semi-quantitativa em microscopia óptica no aumento de 40x e de maneira quantitativa em técnicas de Morfometria e Densitometria Digital através da digitalização de imagens em microscópio LEICA DM5000B acoplado a câmera digital da LEICA DFC 300FX por intermédios do Software Leica Aplications. Após obtenção das imagens na fotodocumentação utilizando o software Leica Application Suite V 3.6, avaliamos, de maneira semi-quantitativa, a presença e o tipo de fenômenos degenerativos, tais como, inflamação, degeneração hidrópica, congestão sinusoidal, hiperemia, hemorragia, presença de granulomas nas regiões intralobulares e nos espaços-porta, fibrose e necrose. Utilizamos a ferramenta na plataforma de morfometria/análise de imagem para obtenção de dados de inflamação, onde foi realizada a contagem de núcleos inflamatórios utilizando o software Leica Application Qwin V3. A

análise de deposição de colágeno (fibrose) foi realizada através do programa ImageJ/Fiji 1.46r (desenvolvido por Wayne Rasband do Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland), com código-fonte livre, para quantificação dessas áreas.

4.6. Biomarcadores de estresse e dano oxidativo

4.6.1. Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi determinada através do ensaio de substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando o método descrito por (Buege e Aust, 1978). A determinação da concentração de TBARS se baseia na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídeos oxidados. Resumidamente, 100 mg do parênquima hepático foram homogeneizados com 1 mL de tampão por 10 minutos a 4º C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. 500 µL do sobrenadante do homogenato foram misturados com ácido tricloroacético (TCA) (28% p/v em HCL 0,25N) e TBA (1% em ácido) e colocados em banho de gelo. O precipitado foi removido por centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos a 4º C, e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 535 nm. A concentração de TBARS foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar (ε= 1,56 x 105L x mol-1 x cm-1), seguindo a lei de Lambert Beer. Os resultados foram expressos em U/ml/mg proteína (Soares et al., 2016).

4.6.2. Proteína Carbonilada

Espécies reativas de oxigênio podem reagir com proteínas causando modificação oxidativa de proteínas e formação de compostos carbonílicos, que podem ser detectados por métodos sensíveis. Para a determinação de proteína carbonilada foi utilizado um protocolo adaptado do método descrito por Reznick e Packer (1994). 500 µL do homogeneizado hepático foi colocado em tubos de polipropileno e adicionados e 500 µL de TCA 10%, misturou-se no vórtex e em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi misturado com 500 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e no escuro, por uma hora e a cada 15 minutos eram misturadas no vórtex. Ao final do período foi acrescentado 500 µL de TCA e as amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e 1 mL da mistura de etanol/acetato de etila (1:1) foi adicionado aos tubos e misturados no vórtex e novamente centrifugados, essa etapa da reação foi repetida por duas vezes. Após a segunda lavagem com a solução de etanol/acetato de etila o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de Dodecil sulfato de sódio (SDS) 6%

misturou-se no vórtex e centrifugou-se à 10000 rpm por 10 minutos à 4ºC. Os sobrenadantes foram lidos no espectrofotômetro a 370 nm. A concentração de proteína carbonilada nas amostras foi determinada de acordo com a equação de Lambert Beer, obtendo os resultados em mmol/mL.

Para a determinação da concentração de proteína carbonilada em relação à concentração de proteínas totais utilizou-se o valor encontrado na análise de proteínas pelo método de (Bradford, 1976).

4.6.3. Atividade de enzimas antioxidantes: Catalase (CAT)

A atividade de Catalase (CAT) foi mensurada de acordo com o método descrito por (Aebi, 1984) a partir do decréscimo de H_2O_2 a uma absorbância de 240 nm. O método se baseia na decomposição enzimática do H_2O_2 em um intervalo de 60 segundos por espectrofotometria. Para a preparação das amostras 100 mg do tecido foram homogeneizados com 1 mL de tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm a 4ºC. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica.

Foram utilizados os reagentes: tampão fosfato e peróxido de hidrogênio. Após o preparo dos reagentes foi iniciada a leitura em espectrofotômetro. O tampão com o peróxido foi aliquotado juntamente com cada amostra em cubeta de quartzo (970 µL e 30 µL, respectivamente) e lidos a 240 nm durante 60 segundos, com registros a cada 10 segundos. A atividade da catalase foi determinada pela diminuição da absorbância a 240 nm, de acordo com a Lei de Lambert Beer, onde 1 U equivale a 1 µmol de hidrólise de H_2O_2 por minuto, por mL.

4.6.4. Atividade de enzimas antioxidantes: Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade de Superóxido Dismutase (SOD) foi mensurada no homogeneizado tecidual de acordo com o método descrito por Marklund e Marklund. O método é baseado na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol. Os reagentes utilizados foram: fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), Pirogalol e MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]- 2,5-difenilterazolio) e Dimetilsulfóxido (DMSO). Para a realização da dosagem, fragmentos de 50 mg de tecido foram homogeneizados com 500 µL tampão fosfato (pH 7,0), em seguida, centrifugados por 10 minutos a 12000 rpm a 4ºC. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi pipetado em placa de 96 poços seguido a adição dos reagentes.

A placa foi incubada por 5 minutos a 37ºC, logo após 150µL de DMSO foram adicionados para parar a reação. Posteriormente a placa foi lida em espectrofotômetro de placas à 570 nm. Após a leitura da placa o valor de absorbância foi convertido em unidade de SOD pela subtração do valor de absorbância da amostra pelo valor do branco, seguido pela divisão desse valor pelo encontrado na subtração do padrão pelo branco. O resultado foi representado em U/mg de proteína.

4.6.5. Atividade de enzimas antioxidantes: Sistema glutationa

A dosagem de glutationa foi adaptada do kit comercial Sigma #CS0260, que utiliza um método cinético para mensurar os níveis de glutationa total (GSH + GSSG) em amostras biológicas através da redução do Ácido 5,5´-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) à TNB. Para realizar essa análise, 50mg de fígado foi homogeneizado com 500 µL de ácido sulfosalicílico 5% (SSA), em seguida as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos à 4ºC. O sobrenadante foi coletado e usado como amostra biológica. A dosagem foi realizada em placa de 96 poços.

As concentrações de glutationa total e oxidada foram obtidas através da curva padrão preparada em cada dosagem. Para encontrar a concentração de glutationa reduzida nas amostras foi subtraído o valor de glutationa oxidada do valor de concentração da glutationa total. Obteve-se a relação GSH/GSSG através da divisão dos resultados de concentração de GSH pelos resultados de GSSG (Murta *et al.*, 2016; Bandeira *et al.*, 2017).

4.7. Ensaios Imunoenzimáticos do fígado

Sobrenadantes advindos da trituração de fragmentos do fígado foram conservados em temperatura de 80ºC negativos. Posteriormente, esses materiais biológicos foram descongelados e usados para avaliação dos marcadores biológicos (IL-6, IL-10, IFN-γ e CCL2). Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados em placas de 96 poços onde foram adicionados 100 µl de anticorpo monoclonal contra a proteína (ou peptídeo) de interesse, diluídos em PBS contendo 0,1% de albumina de soro bovino - BSA (SIGMA). Após incubação por 12 horas à temperatura ambiente, os anticorpos não adsorvidos foram descartados e as placas bloqueadas com 300µl/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1%, durante 1 hora a 37ºC. As amostras de sobrenadante, previamente padronizadas por nosso grupo, foram aplicadas em um volume de 100 µl para cada poço. Paralelamente, a proteína investigada foi diluída em várias concentrações para o estabelecimento da curva padrão e, a

seguir, realizada incubação por 12 horas à temperatura ambiente. Posteriormente os anticorpos secundários foram diluídos em PBS-BSA 0.1% e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. Finalmente, 100µl de estreptoavidina ligada à peroxidase na diluição de 1:4000 em PBS-BSA 0.1% foram adicionados à placa e a mesma mantida sob agitação por 30 minutos. O cromógeno escolhido para revelação foi o OPD (θ-phenylenediamine-SIGMA) ou tetrametilbenzidina, diluído em tampão citrato de acordo com recomendação do fabricante. No momento da aplicação de 100µl desta solução nos poços, foi ainda adicionado 2µl/placa de H_2O_2 30 volumes como catalisador da reação. Após 20 minutos de incubação em ausência de luz, a reação sofreu bloqueio adicionando-se 50µl de H_2SO_4 3 M por poço. A leitura da intensidade de marcação foi realizada em leitor de ELISA utilizando-se o comprimento de onda de 490 nM. Foram utilizados kits para estes ensaios e possíveis alterações puderam ocorrer no protocolo acima, de acordo com os fabricantes (R&D Systems e Peprotech).

4.8. Análises estatísticas

A avaliação da normalidade foi realizada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para os dados paramétricos foi utilizada análise de variância univariada (one-way ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste KrusKal-Wallis seguido pelo pós-teste de Tukey. Diferença significativa foi considerada quando o valor de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows 7, GraphPad Software (San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1.Aspectos histopatológicos do parênquima hepático

Como esperado, a avaliação histológica revelou que o grupo de camundongos controle (GC) apresentou a histologia hepática preservada (figuras 3A, 4A), o mesmo aconteceu com a histologia hepática dos grupos de camundongos que foram submetidos apenas à gavagem orogástrica com propilenoglicol (GPG) (figura 4B) e que receberam quercetina (GQC) (figura 4C). A fumaça de cigarro resultou em alterações do parênquima hepático. As análises morfológicas do tecido evidenciaram diversas injúrias tais como: degeneração hidrópica, processo inflamatório lobular e portal, reação granulomatosa, hiperemia, congestão de capilares sinusóides e focos de hemorragia (Figura 3B-E). A administração de quercetina (GQCFC) promoveu diminuição ou desaparecimento das lesões decorrentes da exposição à fumaça de cigarro (Figuras 3F, 4F, tabela 1).

Uma das lesões observadas com maior frequência neste estudo foi a degeneração hidrópica, também chamada de degeneração balonizante ou vacuolar, caracterizada pelo acúmulo citoplasmático de água e eletrólitos, deixando as células com citoplasma claro à coloração histológica, com aspecto granuloso e alteração da proporção citoplasma/núcleo (figuras 3A-F). Esta alteração, em estágios avançados, provoca compressão dos capilares sinusóides deixando-os pouco visíveis e dificultando a circulação sanguínea. A análise morfológica demonstrou degeneração hidrópica em todos os grupos, entretanto, nos animais expostos à fumaça de cigarro foram observados estágios mais avançados dessa lesão, com distribuição mais ampla no parênquima hepático, quando comparados com os outros grupos (figura 3A-E).

Outras alterações detectadas nos animais foram a congestão sinusoidal e a hiperemia ativa portal e centro-lobular. A primeira foi caracterizada pela retenção de sangue no interior dos capilares sinusóides e a segunda pelo acúmulo de sangue por dilatação da veia porta e da veia centro-lobular (figura 3B, tabela). Ambas as alterações foram mais frequentes nos animais expostos à fumaça de cigarro (GFC, 70%), e pouco frequentes nos grupos GQC e GPG (10%). Além disso, a administração de quercetina no grupo exposto à fumaça de cigarro (GQCFC) provocou redução brusca de tais alterações (20%) (tabela 1).

Foi observada a presença focos de hemorragia em 30% dos animais expostos à fumaça de cigarro, em decorrência da ruptura dos capilares nos locais de congestão (figura 3C). Esta lesão não foi visível nos outros grupos (tabela 1).

Infiltrados inflamatórios no espaço porta e nos lóbulos hepáticos foram observados de maneira mais evidente nos animais expostos à fumaça de cigarro (GFC, 90%) (figura 3D, tabela 1) em relação aos grupos GQC (10%) e GPG (30%). A administração de quercetina no grupo exposto à fumaça de cigarro (GQCFC) reduziu a frequência de infiltrado inflamatório para 10% dos animais. Em relação à formação de granulomas, notou-se que esta lesão ocorreu apenas nos animais expostos à fumaça de cigarro, e em grande proporção (70%) (figura 3B, E, tabela 1).

Também foram analisadas a presença de áreas com necrose dos hepatócitos e a deposição de colágeno tecidual (fibrose), estas alterações não foram encontradas em nenhum dos grupos estudados (tabela 1). Para confirmar a ausência de fibrose tecidual, foi realizada a coloração de Picrosirius que destaca as fibras em vermelho, o que confirmou este achado histológico (figura 4). A ausência de fibrose no grupo GFC pode estar diretamente relacionada à alta taxa de metabolização do fígado, visto que este é o órgão central responsável por realizar todo o processo de desintoxicação de xenobióticos no corpo. Apesar da exposição à fumaça de cigarro em longo prazo provocar um processo inflamatório e mudanças da arquitetura tecidual hepática, isoladamente esta exposição não foi suficiente para levar a uma maior deposição de colágeno, que caracterizasse uma possível fibrose.

Várias das alterações histopatológicas do parênquima hepático observadas no presente estudo, também foram descritas na literatura em trabalhos envolvendo fumaça de cigarro (Azzalini *et al.*, 2010; Adedayo *et al.*, 2011; Ogenyi *et al.*, 2015). Ogenyi *et al.* (2015) descrevendo os efeitos da fumaça de cigarro na arquitetura hepática de ratos, observou congestão sinusoidal e portal assim como degeneração hidrópica e gordurosa nesses animais, além do influxo de células inflamatórias. Ainda neste contexto, Adedayo *et al.* (2011) relataram que a exposição ao extrato de fumaça de tabaco leva a alterações como degeneração e ruptura dos hepatócitos, além de degeneração de células que revestem os ductos biliares no parênquima hepático de ratos. Azzalini *et al.* (2010), avaliando os efeitos da exposição à fumaça de cigarro a longo prazo em ratos obesos, observaram lesões como inflamação lobular e portal, lesão hepatocelular e necrose lobular.

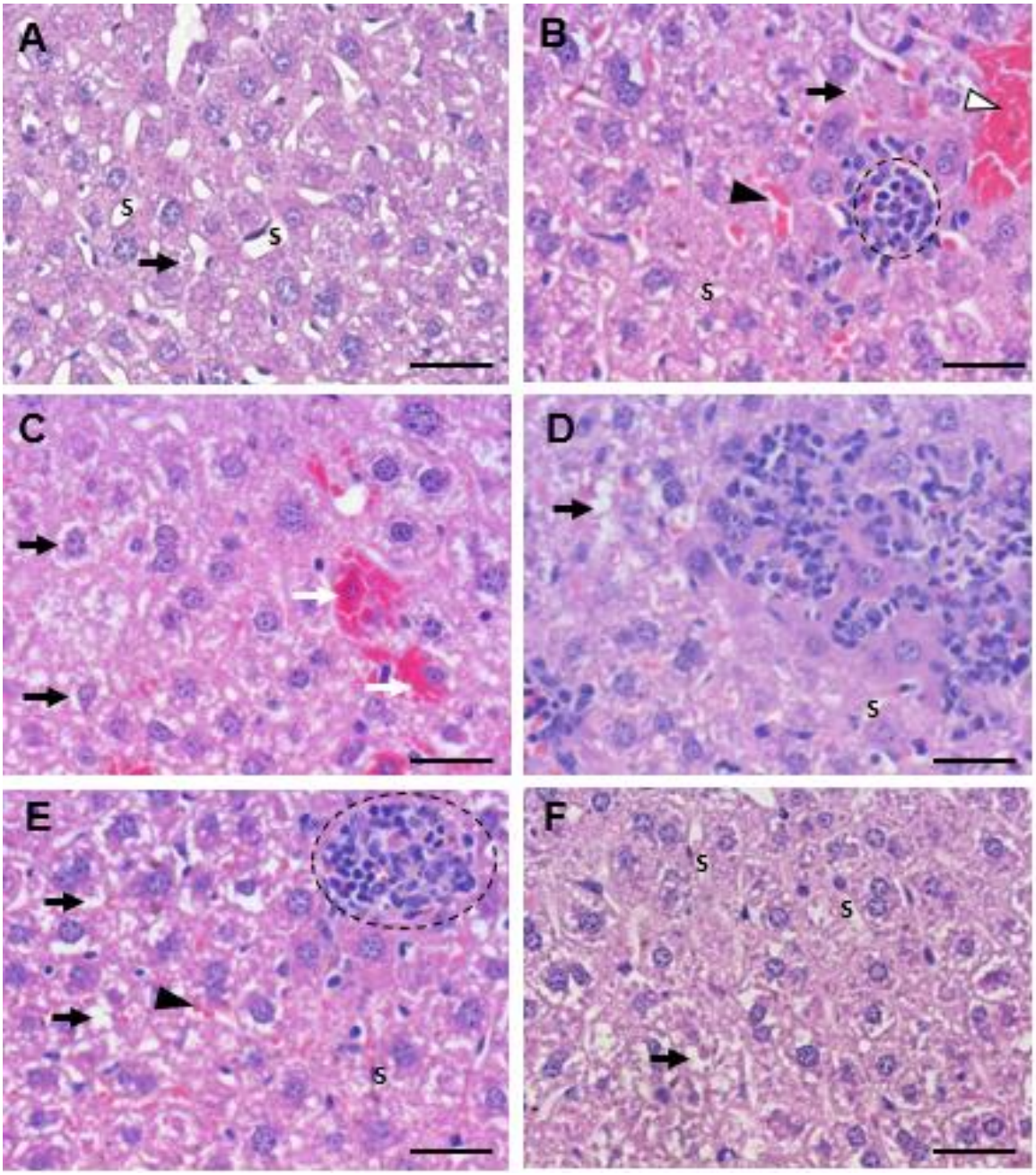

Figura 3: **Características histopatológicas dos fígados de camundongos C57BL/6 expostos ao ar ambiente (GC) (A), grupo exposto à fumaça de cigarro (GFC) (B, C, D, E) e grupo administrado com quercetina e exposto à fumaça de cigarro (GFCQC) (F).** A) Fígado com parênquima bem preservado, apresentando degeneração hidrópica em pequena proporção (seta preta). Capilares sinusóides (s). B) Observe a presença degeneração hidrópica (seta preta) dando ao citoplasma aspecto claro e granuloso e sinusóides congestos (cabeça de seta preta) ou pouco visíveis, devido ao grande aumento de volume das células. Delimitado pelo círculo pontilhado é visualizado um granuloma, comumente presente nesses animais. Capilares com aspecto preservado são também visualizados (s). C) Degeneração hidrópica (seta preta) e focos de hemorragia (seta branca). D) E) Observe grande área à direita da imagem ocupada por infiltrado inflamatório. Degeneração hidrópica (seta preta). Capilar de aspecto preservado (s). F) O grupo exposto a fumaça de cigarro e administrado com quercetina apresentou diminuição das lesões decorrentes da exposição à fumaça de cigarro, muitas vezes apresentando características morfológicas idênticas aquelas do grupo controle. Observe degeneração hidrópica (seta preta) e capilares sinusóides preservados (s). A coloração utilizada foi Hematoxilina-eosina. Barra = 100 µm. Os grupos GQC e GPG mostraram as mesmas características histológicas de GC.

Tabela 1: Frequência de lesões observadas em microscopia óptica no fígado de camundongos C57BL/6

Lesão encontrada	GC N (%) N=10	GQC N (%) N=10	GPG N (%) N=10	GFC N (%) N=10	GQCFC N (%) N=10
Degeneração hidrópica	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)
Congestão sinusoidal	0 (0)	1 (10)	1 (10)	7 (70)	2 (20)
Hiperemia	0 (0)	1 (10)	1 (10)	10 (100)	3 (30)
Hemorragia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (30)	0 (0)
Infiltrado inflamatório lobular ou portal	0 (0)	1 (10)	3 (30)	9 (90)	1 (10)
Granuloma	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (70)	0 (0)
Fibrose	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Necrose	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

(GC) animais expostos ao ar ambiente, (GPG) animais submetidos apenas à gavagem orogástrica com propilenoglicol, (GQC) animais administrados com quercetina, (GFC) animais expostos à fumaça de cigarro e (GQCFC) animais administrados com quercetina e expostos à fumaça de cigarro.

Por outro lado, quando os animais administrados com quercetina foram expostos à fumaça de cigarro houve uma diminuição ou completa ausência das lesões induzidas pela fumaça de cigarro. O papel antioxidante e anti-inflamatório da quercetina é conhecido e relatado em algumas patologias hepáticas (Lee *et al.*, 2013; Kalantari *et al.*, 2018). Kalantari *et al.* (2018) descreveu os efeitos da quercetina em diminuir a lesões hepáticas induzidas por hidroperóxido de terc-butila em camundongos. Resultados semelhantes foram observados em um estudo de dano hepático induzido em ratos por dimetilnitrosamina, em que a quercetina foi capaz de reduzir a necrose hemorrágica e a deposição de colágeno nos lóbulos hepáticos (Lee *et al.*, 2013). Nossos resultados mostraram que a quercetina foi capaz de reduzir todas as lesões hepáticas induzidas pela fumaça de cigarro, exercendo um efeito hepatoprotetor ao dano causado pelo cigarro. Assim, apesar do já demonstrado papel da quercetina como antioxidante e anti-inflamatório em patologias hepáticas, esta é a primeira investigação que analisa este efeito em modelo experimental de lesão hepática induzida por fumaça de cigarro.

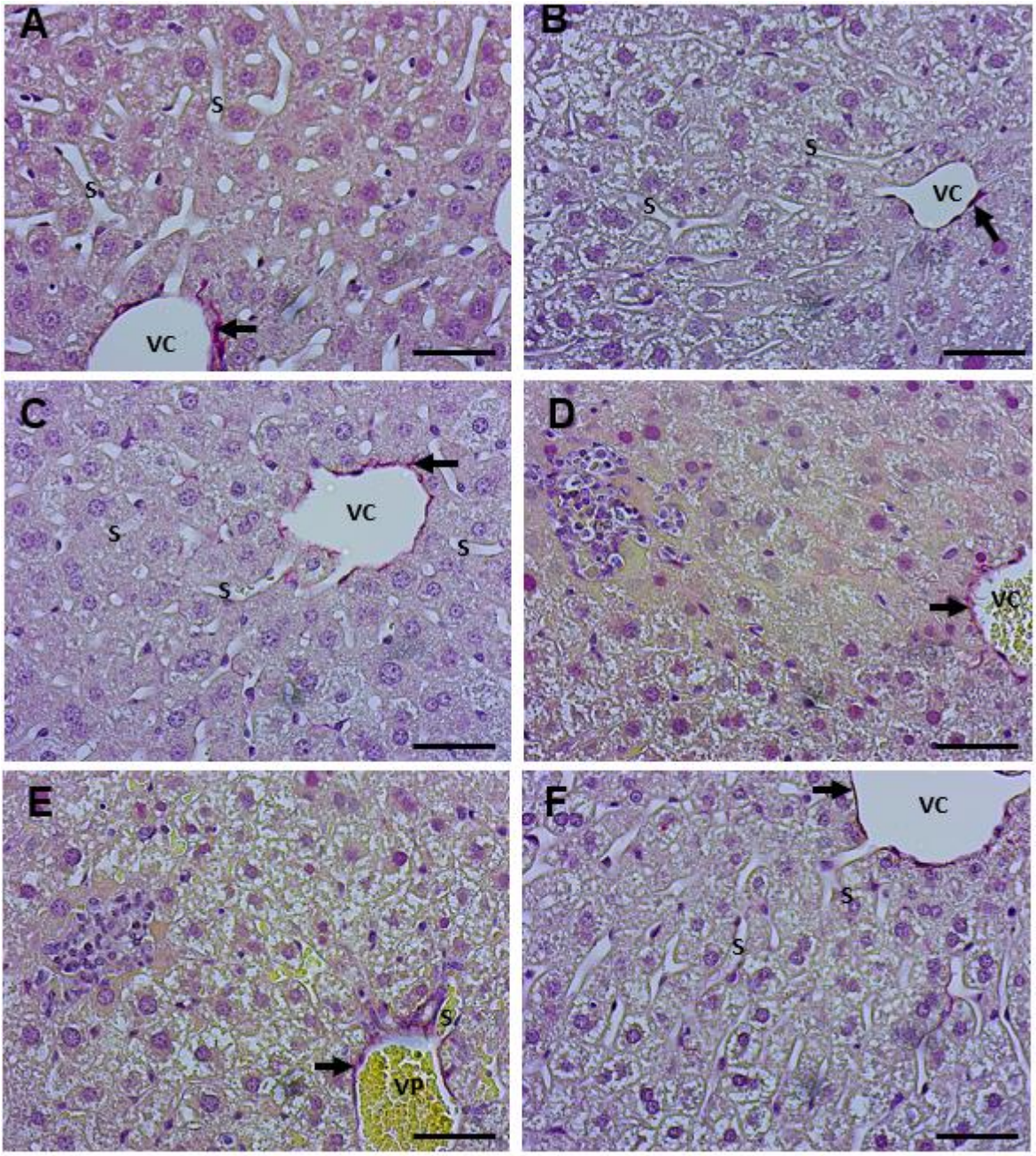

Figura 4: Estudo histológico de seções de fígados corados com picrosirius de camundongos C57BL/6 do grupo controle (GC) (A), grupo propilenoglicol (GPG) (B), grupo administrado com quercetina (GQC) (C), grupo exposto à fumaça de cigarro (GFC) (D, E) e grupo administrado com quercetina e exposto à fumaça de cigarro (GFCQC) (F). As imagens confirmam a ausência de fibrose tecidual, demonstrando deposição de colágeno semelhante em todos os grupos (setas). Veia centro-lobular (VC), capilares sinusóides (S), veia porta (VP). Barra = 100 µm.

No presente estudo a inflamação hepática foi avaliada por meio de uma análise semi-quantitativa do número de núcleos inflamatórios utilizando o software Leica Application Qwin V3. O grupo exposto à fumaça de cigarro apresentou um maior influxo de células inflamatórias em relação aos demais grupos (figura 5). Isso mostra que a fumaça de cigarro, como xenobiótico, possivelmente atua na resposta imunorregulatória levando à ativação de células de Kupffer a produzir mediadores quimiotáticos. Isso resulta em um aumento do

número total de leucócitos, que quando ativados levam ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, contribuindo assim para a instalação do desequilíbrio redox e um possível dano tecidual. Diversos estudos mostraram uma relação da fumaça de cigarro com um maior influxo de leucócitos totais, seja pela formação de espécies reativas de oxigênio ou pela presença da nicotina (Nowak *et al.*, 1990; Bhalla *et al.*, 2009; Pena *et al.*, 2016). De acordo com Laskin e Pendino (1995), a presença de diferentes xenobióticos no fígado pode desencadear uma ativação das células de Kupffer (responsáveis pela resposta imune nesse órgão) a secretarem mediadores pró-inflamatórios, o que pode resultar em uma quimiotaxia de leucócitos totais. No presente estudo, o aumento do número de núcleos inflamatórios pode estar relacionado, com a resposta inflamatória mediada pelas células de defesa residentes do fígado, mas também pode estar diretamente ligado ao tempo de exposição à fumaça de cigarro ao qual os animais foram submetidos, uma vez que se trata de uma exposição a longo prazo.

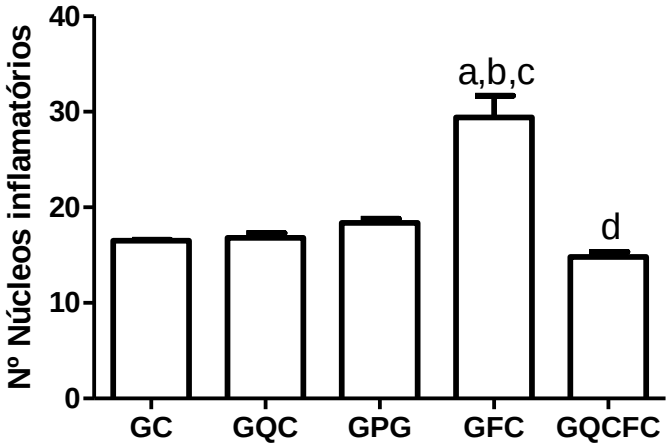

Figura 5: Número de núcleos inflamatórios no parênquima hepático de camundongos C57BL/6 dos grupos controle (GC), administrado com quercetina (GQC), propilenoglicol (GPG), exposto à fumaça de cigarro (GFC) e administrado com quercetina e exposto à fumaça de cigarro (GQCFC). (a), (b) e (c) representam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. (d) representa diferença estatisticamente significativa em relação GFC. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média e foram analisados por One-way ANOVA, seguido do teste post-hoc de Tukey ($p < 0,05$).

No grupo administrado com quercetina e exposto à fumaça de cigarro (GQCFC) houve uma redução significativa do número de células inflamatórias em relação ao grupo que apenas foi exposto à fumaça de cigarro (GFC) (figura 5). Tal efeito observado é atribuído a forte ação anti-inflamatória da quercetina em modular a resposta inflamatória e a sua atividade citoprotetora (Li *et al.*, 2016). Resultados semelhantes foram descritos por Yang *et al.* (2012), em um estudo da inflamação das vias aéreas e a produção de muco induzida pela fumaça de cigarro. Estes autores verificaram uma diminuição do influxo inflamatório no lavado broncoalveolar quando os animais foram suplementados com a quercetina. Além disso, em um estudo de cirrose hepática induzida por tetracloreto de carbono, tendo como principais mecanismos para o seu desenvolvimento o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica, a quercetina foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e exercer um efeito citoprotetor nos hepatócitos (Pavanato *et al.*, 2003). Chen (2010) avaliando os efeitos da quercetina em lesão hepática induzida por etanol, verificou que ela foi capaz de reduzir significativamente os valores de citocinas proinflamatórias envolvidas na ativação de células de Kupffer e recrutamento celular, exercendo um efeito hepatoprotetor nos animais tratados com etanol. Nossos resultados corroboram o que já está descrito na literatura, confirmando a capacidade anti-inflamatória e moduladora da quercetina.

5.2. Biomarcadores de estresse e dano oxidativo

No presente trabalho foi determinada a atividade das principais enzimas constituintes do sistema de defesa antioxidante com o objetivo de investigar o desequilíbrio redox induzido pela fumaça de cigarro e o efeito da quercetina sobre esse desequilíbrio. Não houve diferença na oxidação proteica entre os grupos (tabela 2). A enzima superóxido dismutase (SOD) apresentou maior atividade no grupo exposto à fumaça de cigarro (GFC) relação aos demais grupos (tabela 2). O aumento da atividade de SOD no tecido hepático provocado pela fumaça de cigarro também foi descrito por Gupta *et al.* (1988) e Baskaran *et al.* (1999) em ratos. Essa enzima compreende a primeira linha de defesa frente a espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo capaz de dismutar o ânion superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para posterior ação de outras enzimas capazes de transformar essa espécie radical (Yuan e Kaplowitz, 2009; Birben *et al.*, 2012). A fumaça de cigarro por si só já é uma fonte de ERO e sua presença leva a quimiotaxia de leucócitos totais que por sua vez geram mais espécies reativas. O aumento da atividade dessa enzima pode estar diretamente relacionado com as espécies reativas de oxigênio ou até mesmo com a nicotina, presentes na fumaça de cigarro,

como já descrito por Husain *et al.* (2001), avaliando o efeito crônico da interação do etanol e da nicotina no sistema de defesa antioxidante em diferentes tecidos de ratos.

Tabela 2. Biomarcadores do estresse oxidativo

	GC	GQC	GPG	GFC	GQCFC
SOD (U/mg ptn)	90,74±4,724	93,26±5,425	88,01±5,002	115,4±5,855[abc]	81,42±5,362[d]
CAT (U/mg ptn)	0,2888±0,02761	0,2241±0,01669	0,2051±0,03605	0,1308±0,03241[a]	0,1445±0,02176[a]
GSH/GSSG (nmol/mL)	7,214(2,599:13,30)	6,057(5,246:9,042)	5,845(4,111:6,845)	0,4146(0,3427:1,409)[b]	6,618(3,199:10,64)[d]
TBARS (nmol/mg ptn)	0,3408±0,02287	0,3193±0,02951	0,2493±0,02148	2,073±0,5026[abc]	0,2761±0,04263[d]
PTN carbonilada (nmol/mg ptn)	12,73±1,248	16,07±2,050	13,13±1,900	16,18±0,9378	14,12±1,589

(a) representa diferença significativa quando comparado ao GC. (b) representa diferença significativa quando comparado ao grupo GQC, (c) representa diferença significativa entre os grupos quando comparado com GPG e (d) mostra diferença significativa quando comparado com o grupo GFC. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média e foram analisados por One-way ANOVA, seguido do teste post-hoc de Tukey ($p < 0,05$). (GC) animais expostos ao ar ambiente, (GPG) animais submetidos apenas à gavagem orogástrica com propilenoglicol, (GQC) animais administrados com quercetina, (GFC) animais expostos à fumaça de cigarro e (GQCFC) animais administrados com quercetina e expostos à fumaça de cigarro.

A administração de quercetina no grupo exposto à fumaça de cigarro (GQCFC) provocou diminuição dos níveis de SOD quando comparado ao grupo GFC, e seus valores foram semelhantes aos grupos controle (GC), quercetina (GQC) e propilenoglicol (GPG) (tabela 2). Nossos resultados comprovaram a capacidade do flavonoide quercetina em combater e neutralizar as espécies reativas de oxigênio, impedindo o estabelecimento do estresse oxidativo e estão em concordância com experimentos prévios de Dias *et al.* (2005). Estes autores, avaliando os efeitos da quercetina sobre o estresse oxidativo e mediadores inflamatórios no fígado de ratos com *Diabetes mellitus* induzido por estreptozotocina, verificaram que a quercetina foi capaz de diminuir o aporte de ERO, ao diminuir a atividade de SOD.

No grupo exposto à fumaça de cigarro (GFC) houve uma redução da razão GSH/GSSG, frente ao aumento das espécies reativas de oxigênio e ao desequilíbrio redox estabelecido, em relação aos grupos GC, GQC e GPG (tabela 2). Este resultado nos leva a inferir que a atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx) está elevada no fígado desses animais. A glutationa peroxidase (GPx) é uma enzima constituinte do sistema de defesa antioxidante, sendo capaz transformar o radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em 2

moléculas de água (H_2O) (Yuan e Kaplowitz, 2009; Birben *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2017), neutralizando espécies reativas de oxigênio (Raza *et al.*, 2013). Nosso grupo de pesquisa também observou redução da razão GSH/GSSG nos pulmões de camundongos expostos a fumaça de cigarro a longo prazo (Campos *et al.*, 2017), o que nos levou a sugerir uma alta atividade da enzima glutationa peroxidase nos pulmões desses animais. Também em pulmões de ratos expostos à fumaça de cigarro, Yang *et al.* (2012) verificaram um decréscimo de glutationa total. Além disso, Bindu e Annamalai (2004) verificaram uma diminuição da atividade da glutationa reduzida e um aumento da atividade de glutationa peroxidase no fígado de animais expostos à fumaça de cigarro.

Nos animais que foram administrados com quercetina e expostos à fumaça de cigarro (GQCFC) houve um aumento da relação GSH/GSSG, quando comparados com o grupo GFC, e seus valores foram semelhantes aos grupos controle (GC), quercetina (GQC) e propilenoglicol (GPG) (tabela 2). Nossos resultados corroboram com estudos de Olayinka *et al.* (2015) e Chen (2010) acerca da capacidade da quercetina em aumentar a relação GSH/GSSG em lesão hepática. Olayinka *et al.* (2015) observaram que a quercetina protege o tecido hepático contra a diminuição da atividade de GSH em fígados de ratos tratados com procarbazina e Chen (2010) observou resultado semelhante em modelo de lesão hepática induzida por etanol. Além disso, Yang *et al.* (2012) descreveram o papel da quercetina em impedir o decréscimo da glutationa total em pulmões de ratos expostos a fumaça de cigarro. Em artigo de revisão, Xu *et al.* (2019) relataram os efeitos antioxidantes da quercetina na modulação do sistema antioxidante e oxidante, sendo ela capaz de aumentar os níveis de glutationa total. Assim, devido ao seu papel em modular espécies reativas de oxigênio, podemos inferir que a quercetina promoveu uma normalidade da atividade da enzima glutationa peroxidase nos animais expostos à fumaça de cigarro.

Não observamos diferença significativa na atividade da enzima catalase (CAT) quando comparados os animais GFC e GQCFC (tabela 2). Entretanto, a atividade de CAT foi reduzida nesses dois grupos em relação aos outros (tabela 2). A catalase faz parte do sistema de defesa antioxidante enzimático capaz de converter o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular (O_2). Diversos trabalhos, tanto em pulmão quanto no fígado, relataram uma diminuição da atividade de catalase em modelos que promovem o aumento de espécies reativas de oxigênio (Helen e Vijayammal, 1997; Husain *et al.*, 2001; Bezerra *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2019). No presente estudo a diminuição da atividade da catalase no

grupo GFC pode ser atribuída ao aumento do aporte de ERO, o que supera a atividade antioxidante dessa enzima. Todavia, o sistema glutationa que compõe o sistema de defesa antioxidante é o mais abundante no fígado, apresentando uma maior biossíntese nesse órgão (Lu, 1999; 2013). Sendo assim, espera-se que tal sistema esteja mais ativo na neutralização de ERO produzidas pela fumaça de cigarro quando outros componentes do sistema de defesa antioxidante se apresentam em baixa, como é o caso da CAT nesse estudo. A atividade de CAT reduzida no GQCFC pode ser explicada pelo fato desta enzima se apresentar em menor proporção no fígado quando se compara com o pulmão. Sendo o sistema glutationa mais ativo no fígado, os efeitos da quercetina podem estar direcionados para o aumento dos níveis do sistema glutationa em relação a CAT, justificando seu baixo efeito sobre a atividade dessa enzima. Tal efeito se deve ao poder de modulação da quercetina no processo oxidativo, seja modulação ao nível de oxidantes ou do sistema de defesa antioxidante (Xu *et al.*, 2019).

O dano provocado pela FC na porção lipídica da membrana celular foi mensurado através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Assim, observamos maior nível de TBARS no grupo GFC em relação aos demais (tabela 2). Nossos resultados mostram que as ERO advindas da FC têm como alvo também os lipídios de membrana, alterando sua composição, organização, fluidez e integridade levando a lesão celular. Resultados semelhantes forma observados por Nemmar *et al.* (2013), estudando o papel do estresse oxidativo em camundongos expostos à FC a curto prazo. Estes autores verificaram que, mesmo em um curto período de exposição, a FC era capaz de causar danos em vários órgãos, o que se refletiu no aumento da peroxidação lipídica no fígado dos animais. Baskaran *et al.* (1999) e Bindu e Annamalai (2004) também relataram alta peroxidação lipídica em animais expostos à FC, e descreveram o fígado como um dos órgãos mais afetados pelas ERO. Estudos em pulmão desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa Campos *et al.* (2019) também detectaram elevada concentração de TBARS em camundongos C57BL/6 expostos à FC a longo prazo.

A administração de quercetina reduziu os níveis de TBARS nos animais expostos à fumaça de cigarro (GQCFC) quando comparados ao grupo apenas exposto à fumaça de cigarro (GFC) (tabela 2), e seus valores foram semelhantes aos dos grupos GC, GQC e GPG (tabela 2). (Kalantari *et al.*, 2018) descreveram a capacidade da quercetina em reduzir a peroxidação lipídica em camundongos com dano hepático induzido por hidroperóxido de terc-butila. De acordo com Xu *et al.* (2019), os efeitos da quercetina em diminuir a peroxidação

lipídica estão ligados à sua capacidade de reduzir ERO, restaurar o equilíbrio redox e induzir a produção de enzimas do sistema de defesa antioxidante. Estudos com outros agentes indutores do estresse oxidativo, como endotoxinas, relataram o efeito hepatoprotetor da quercetina em diminuir o estresse oxidativo e peroxidação lipídica dos animais expostos a esses agentes (Pilkhwal *et al.,* 2019). Nossos resultados comprovam que a quercetina é capaz de diminuir a peroxidação lipídica, prevenindo o dano oxidativo no tecido hepático dos animais, provocado pela fumaça de cigarro. Isso se deve a capacidade da quercetina em diminuir o influxo de ERO nos tecidos e prevenir o desequilíbrio redox induzido por essas espécies (Bao *et al.*, 2017).

5.3. Ensaios imunoenzimáticos

No presente estudo, foi realizado o ensaio imunoenzimático a fim de analisar o envolvimento da quimiocina CCL2 e das interleucinas 6 (IL-6), 10 (IL-10), e interferon (IFN) no processo inflamatório hepático provocado pela exposição à fumaça de cigarro. Não houve diferença significativa nos níveis de IL-6 entre os grupos (tabela 3). O grupo exposto à fumaça de cigarro apresentou maiores níveis de IL-10 em relação aos demais grupos (tabela 3). Em trabalho anterior desenvolvido por nosso grupo de pesquisa em um modelo de exposição à fumaça de cigarro a longo prazo (Campos *et al.*, 2019), nós também observamos um aumento dos níveis de IL-10 no pulmão de camundongos expostos à fumaça de cigarro em relação aos demais grupos, e atribuímos tal resultado à forte resposta inflamatória que se encontrava naquele órgão. Sendo a IL-10 uma interleucina anti-inflamatória, ela está envolvida na modulação da resposta inflamatória, inibindo o recrutamento e produção de interleucinas pró-inflamatórias como IL-12 e mediadores pró-inflamatórios como CCL2 (Moore *et al.,* 2001). No presente trabalho observamos ainda que os níveis de INF e da quimiocina CCL2 seguiram o mesmo perfil, apresentando uma diminuição no grupo exposto à fumaça de cigarro (GFC) (tabela 3). CCL2 é uma quimiocina pró-inflamatória envolvida na quimiotaxia e ativação de células inflamatórias, tendo uma resposta mais específica para macrófagos. Nossos resultados contradizem estudos envolvendo exposição à fumaça de cigarro no pulmão, os quais mostraram que a concentração de CCL2 se encontra elevada nesse órgão, seja em resposta ao insulto oxidativo provocado por ERO ou ao recrutar leucócitos para o local da injúria onde ocorre processo inflamatório (Braber *et al.*, 2010; Brunssencoy *et al.,* 2017).

Tabela 3: Marcadores inflamatórios no fígado

	GC	QC	PG	FC	QCFC
CCL2 (pg/mL)	4025±137,6	3153±134,4	3279±250,9	1852±303,7[abc]	3694±175,9[d]
IFN (pg/mL)	537,6,2±11,85	559,1±42,43	513,3±42,14	324,6±21,60[abc]	519,3±24,11[d]
IL-10 (pg/mL)	1466±99,79	1472±43,66	1529±149,6	2342±218,1[abc]	1699±57,57[d]
IL-6 (pg/ml)	1711±57,72	1688±48,11	1712±49,65	1781±57,32	1669±56,08

(a) representa diferença significativa quando comparado ao GC. (b) representa diferença significativa quando comparado ao grupo QC, (c) representa diferença significativa entre os grupos quando comparado com PG e (d) mostra diferença significativa quando comparado com o grupo FC. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média e foram analisados por One-way ANOVA, seguido do teste post-hoc de Tukey ($p < 0,05$). (GC) animais expostos ao ar ambiente, (GPG) animais submetidos apenas à gavagem orogástrica com propilenoglicol, (GQC) animais administrados com quercetina, (GFC) animais expostos à fumaça de cigarro e (GQCFC) animais administrados com quercetina e expostos à fumaça de cigarro.

No contexto dos nossos resultados, Bhalla *et al.* (2009) relataram o papel da IL-10 em suprimir a produção de IFN. Assim, a presença de ERO no parênquima hepático desencadearia a ativação de células de Kupffer do fígado (macrófagos hepáticos residentes), o que levaria a uma produção de mediadores pró-inflamatórios e consequentemente quimiotaxia de mais leucócitos totais, a fim de resolver o insulto provocado por ERO. Nossos resultados mostram que o aumento da IL-10 no tecido hepático de camundongos expostos à FC pode ser uma resposta ao influxo de células inflamatórias nesse órgão, e que a diminuição de mediadores pró-inflamatórios como CCL2 e INF, pode ser consequência da atuação da IL-10 em inibir a atividade pró-inflamatória desses mediadores em recrutar mais células inflamatórias para o fígado.

Ao administrar quercetina nos animais expostos à FC (GQCFC), os níveis das citocinas IFN, IL-10 e da quimiocina CCL2 voltaram aos valores semelhantes aos observados nos grupos controles (GC, GQC e GPG). Nossos resultados corroboram aqueles de Chen (2010), estudando os efeitos protetores da quercetina em lesão hepática induzida por etanol. Esse autor verificou que a quercetina normalizou dos níveis de citocinas e quimiocinas no tecido hepático exposto a esse agente oxidativo. Alguns trabalhos descreveram os efeitos da quercetina na modulação da resposta inflamatória, no que compreende a indução ou repressão da produção de citocinas pró ou anti-inflamatórias, desempenhando papel direto no processo imune (Zhang *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016). Nossos

resultados estão em acordo com trabalhos já publicados e confirmam a capacidade de modulação da quercetina na resposta imune, tanto anti- como pró-inflamatória, frente ao insulto desenvolvido pela ação da fumaça de cigarro, seja pelo estabelecimento do processo redox ou recrutamento e sinalização de leucócitos totais para o local da lesão.

6. Conclusão

Nossos resultados demonstraram que a fumaça de cigarro é um xenobiótico de ação direta e relevante no fígado, por gerar ERO instalando o desequilíbrio redox e inflamação. Por outro lado, a administração de quercetina foi capaz de combater o dano oxidativo e inflamação gerados pela exposição à fumaça de cigarro, exercendo um efeito protetor nas células desse órgão. Dessa maneira, podemos afirmar que a quercetina tem papel promissor como ferramenta farmacológica auxiliar no tratamento de danos gerados ao fígado pela exposição à fumaça de cigarro.

7. REFERÊNCIAS

ADEDAYO, A. D. et al. Histological study of smoke extract of Tobacco nicotiana on the heart, liver, lungs, kidney, and testes of male Sprague-Dawley rats. **Niger Med J,** v. 52, n. 4, p. 217-22, Oct 2011. ISSN 0300-1652 (Print)0300-1652. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.4103/0300-1652.93791 >.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol,** v. 105, p. 121-6, 1984. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

ALTAMIRANO, J.; BATALLER, R. Cigarette smoking and chronic liver diseases. **Gut,** v. 59, n. 9, p. 1159-62, Sep 2010. ISSN 0017-5749. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1136/gut.2008.162453 >.

AZZALINI, L. et al. Cigarette smoking exacerbates nonalcoholic fatty liver disease in obese rats. **Hepatology,** v. 51, n. 5, p. 1567-76, May 2010. ISSN 0270-9139. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1002/hep.23516 >.

BANDEIRA, A. C. B. et al. Lycopene pretreatment improves hepatotoxicity induced by acetaminophen in C57BL/6 mice. **Bioorg Med Chem,** v. 25, n. 3, p. 1057-1065, Feb 1 2017. ISSN 0968-0896. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.12.018 >.

BAO, D. et al. Protective Effect of Quercetin against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Rat Pheochromocytoma (PC-12) Cells. **Molecules,** v. 22, n. 7, Jul 6 2017. ISSN 1420-3049. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.3390/molecules22071122 >.

BARBOSA, K. B. F. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. 08/2010 2010. Disponível em: < http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS⟨=p&nextAction=lnk&exprSearch=569135&indexSearch=ID >.

BASKARAN, S.; LAKSHMI, S.; PRASAD, P. R. Effect of cigarette smoke on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in albino rat. **Indian J Exp Biol,** v. 37, n. 12, p. 1196-200, Dec 1999. ISSN 0019-5189 (Print)0019-5189. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

BEZERRA, F. S. et al. Long-term exposure to cigarette smoke impairs lung function and increases HMGB-1 expression in mice. **Respir Physiol Neurobiol,** v. 177, n. 2, p. 120-6, Jul 31 2011. ISSN 1569-9048. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2011.03.023 >.

BHALLA, D. K. et al. Cigarette smoke, inflammation, and lung injury: a mechanistic perspective. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev,** v. 12, n. 1, p. 45-64, Jan 2009. ISSN 1093-7404. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1080/10937400802545094 >.

BINDU, M. P.; ANNAMALAI, P. T. Combined effect of alcohol and cigarette smoke on lipid peroxidation and antioxidant status in rats. **Indian J Biochem Biophys,** v. 41, n. 1, p. 40-4, Feb 2004. ISSN 0301-1208 (Print)0301-1208. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J,** v. 5, n. 1, p. 9-19, Jan 2012. ISSN 1939-4551 (Print)1939-4551. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613 >.

BOUTTEN, A. et al. Oxidative stress targets in pulmonary emphysema: focus on the Nrf2 pathway. **Expert Opin Ther Targets,** v. 14, n. 3, p. 329-46, Mar 2010. ISSN 1472-8222. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1517/14728221003629750 >.

BRABER, S. et al. Inflammatory changes in the airways of mice caused by cigarette smoke exposure are only partially reversed after smoking cessation. **Respir Res,** v. 11, p. 99, Jul 22 2010. ISSN 1465-9921. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1186/1465-9921-11-99 >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem,** v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print)0003-2697. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

BRUNSSENCOY et al. Evaluation of Cytotoxic, Oxidative, and Pro-Inflammatory Effects of Aqueous Cigarette Smoke Extract on Human Monocytes: A Potential Model System for Assessment of Next-Generation Tobacco and Nicotine Products. **https://home.liebertpub.com/aivt**, 2017-03-01 2017. Disponível em: < https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/aivt.2016.0037 >.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol,** v. 52, p. 302-10, 1978. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

CAMPOS, K. K. et al. Temporal analysis of oxidative effects on the pulmonary inflammatory response in mice exposed to cigarette smoke. **Cell Immunol,** v. 284, n. 1-2, p. 29-36, Jul-Aug 2013. ISSN 0008-8749. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.07.002 >.

CAMPOS, K. K. D. et al. The antioxidant and anti-inflammatory properties of lycopene in mice lungs exposed to cigarette smoke. **J Nutr Biochem,** v. 48, p. 9-20, Oct 2017. ISSN 0955-2863. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.06.004 >.

CAMPOS, K. K. D. et al. Lycopene mitigates pulmonary emphysema induced by cigarette smoke in a murine model. **J Nutr Biochem,** v. 65, p. 93-100, Mar 2019. ISSN 0955-2863. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.12.008 >.

CARRASCO-POZO, C. et al. Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage: role of NF-kappaB and Nrf2. **J Nutr Biochem,** v. 27, p. 289-98, Jan 2016. ISSN 0955-2863. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.09.016 >.

CHEN, X. Protective effects of quercetin on liver injury induced by ethanol. **Pharmacogn Mag,** v. 6, n. 22, p. 135-41, Apr 2010. ISSN 0973-1296. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.4103/0973-1296.62900 >.

CRESPY, V. et al. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. **Am J Physiol,** v. 277, n. 1, p. G120-6, Jul 1999b. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.1999.277.1.G120 >.

D'ANDREA, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? **Fitoterapia,** v. 106, p. 256-71, Oct 2015. ISSN 0367-326x. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2015.09.018 >.

DALRYMPLE, A. et al. An improved method for the isolation of rat alveolar type II lung cells: Use in the Comet assay to determine DNA damage induced by cigarette smoke. **Regul Toxicol Pharmacol,** v. 72, n. 1, p. 141-9, Jun 2015. ISSN 0273-2300. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.03.013 >.

DI MEO, F. et al. Free radical scavenging by natural polyphenols: atom versus electron transfer. **J Phys Chem A,** v. 117, n. 10, p. 2082-92, Mar 14 2013. ISSN 1089-5639. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1021/jp3116319 >.

DIAS, A. S. et al. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. **J Nutr,** v. 135, n. 10, p. 2299-304, Oct 2005. ISSN 0022-3166 (Print)0022-3166. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1093/jn/135.10.2299 >.

EL-ZAYADI, A. R. Heavy smoking and liver. **World J Gastroenterol,** v. 12, n. 38, p. 6098-101, Oct 14 2006. ISSN 1007-9327 (Print)2219-2840 (Electronic). Disponível em: < http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v12.i38.6098 >.

FUBINI, B.; HUBBARD, A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. **Free Radic Biol Med,** v. 34, n. 12, p. 1507-16, Jun 15 2003. ISSN 0891-5849 (Print)0891-5849. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

GANESAN, S. et al. Quercetin prevents progression of disease in elastase/LPS-exposed mice by negatively regulating MMP expression. **Respir Res,** v. 11, p. 131, Sep 28 2010. ISSN 1465-9921. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1186/1465-9921-11-131 >.

GUO, Y.; BRUNO, R. S. Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. **J Nutr Biochem,** v. 26, n. 3, p. 201-10, Mar 2015. ISSN 0955-2863. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.10.008 >.

GUPTA, M. P.; KHANDUJA, K. L.; SHARMA, R. R. Effect of cigarette smoke inhalation on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the rat. **Toxicol Lett,** v. 41, n. 2, p. 107-14, May 1988. ISSN 0378-4274 (Print)0378-4274. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

HELEN, A.; VIJAYAMMAL, P. L. Vitamin C supplementation on hepatic oxidative stress induced by cigarette smoke. **J Appl Toxicol,** v. 17, n. 5, p. 289-95, Sep-Oct 1997. ISSN 0260-437X (Print)0260-437x. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

HOFFMANN, D.; HOFFMANN, I.; EL-BAYOUMY, K. The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. **Chem Res Toxicol,** v. 14, n. 7, p. 767-90, Jul 2001. ISSN 0893-228X (Print)0893-228x. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

HOFFMANN, R. F. et al. Prolonged cigarette smoke exposure alters mitochondrial structure and function in airway epithelial cells. **Respir Res,** v. 14, p. 97, Oct 2 2013. ISSN 1465-9921. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1186/1465-9921-14-97 >.

HUSAIN, K. et al. Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. **Alcohol,** v. 25, n. 2, p. 89-97, Oct 2001. ISSN 0741-8329 (Print)0741-8329. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

ISSA, J. S. et al. Intervenção sobre tabagismo realizada por cardiologista em rotina ambulatorial. 2019.

KABIRIFAR, R. et al. Quercetin protects liver injury induced by bile duct ligation via attenuation of Rac1 and NADPH oxidase1 expression in rats. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int,** v. 16, n. 1, p. 88-95, Feb 2017. ISSN 1499-3872 (Print). Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

KAHRAMAN, A. et al. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. **Toxicology,** v. 183, n. 1-3, p. 133-42, Feb 1 2003. ISSN 0300-483X (Print)0300-483x. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

KALANTARI, H. et al. Antioxidant and hepatoprotective effects of Capparis spinosa L. fractions and Quercetin on tert-butyl hydroperoxide- induced acute liver damage in mice. **J Tradit Complement Med,** v. 8, n. 1, p. 120-127, Jan 2018. ISSN 2225-4110 (Print)2225-4110. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.04.010 >.

LASKIN, D. L.; PENDINO, K. J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Annu Rev Pharmacol Toxicol,** v. 35, p. 655-77, 1995. ISSN 0362-1642 (Print)0362-1642. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pa.35.040195.003255 >.

LEE, C. C. et al. Rutin and quercetin, bioactive compounds from tartary buckwheat, prevent liver inflammatory injury. **Food Funct,** v. 4, n. 5, p. 794-802, Apr 30 2013. ISSN 2042-6496. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1039/c3fo30389f >.

LEMANSKA, K. et al. The effect of catechol O-methylation on radical scavenging characteristics of quercetin and luteolin--a mechanistic insight. **Free Radic Res,** v. 38, n. 6, p. 639-47, Jun 2004. ISSN 1071-5762 (Print)1029-2470. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

LI, S. et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. In: (Ed.). **Int J Mol Sci**, v.16, 2015. p.26087-124. ISBN 1422-0067 (Electronic).

LI, Y. et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. **Nutrients,** v. 8, n. 3, p. 167, Mar 15 2016. ISSN 2072-6643. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.3390/nu8030167 >.

LU, S. C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. **Faseb j,** v. 13, n. 10, p. 1169-83, Jul 1999. ISSN 0892-6638 (Print)0892-6638. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

LU, S. C. GLUTATHIONE SYNTHESIS. **Biochim Biophys Acta,** v. 1830, n. 5, p. 3143-53, May 2013. ISSN 0006-3002 (Print). Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008 >.

MARTINS CHAVES, M. et al. Increase of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species generated by phagocyting granulocytes related to age. **Mech Ageing Dev,** v. 119, n.

1-2, p. 1-8, Oct 20 2000. ISSN 0047-6374 (Print)0047-6374. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol,** v. 19, p. 683-765, 2001. ISSN 0732-0582 (Print)0732-0582. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683 >.

MURTA, G. L. et al. Oxidative effects on lung inflammatory response in rats exposed to different concentrations of formaldehyde. **Environ Pollut,** v. 211, p. 206-13, Apr 2016. ISSN 0269-7491. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.054 >.

NAIT CHABANE, M. et al. Quercetin and naringenin transport across human intestinal Caco-2 cells. **J Pharm Pharmacol,** v. 61, n. 11, p. 1473-83, Nov 2009. ISSN 0022-3573. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1211/jpp/61.11.0006 >.

NEMMAR, A. et al. Short-term systemic effects of nose-only cigarette smoke exposure in mice: role of oxidative stress. **Cell Physiol Biochem,** v. 31, n. 1, p. 15-24, 2013. ISSN 1015-8987. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1159/000343345 >.

NOWAK, D.; RUTA, U.; PIASECKA, G. Nicotine increases human polymorphonuclear leukocytes chemotactic response--a possible additional mechanism of lung injury in cigarette smokers. **Exp Pathol,** v. 39, n. 1, p. 37-43, 1990. ISSN 0232-1513 (Print)0232-1513. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

OGENYI, S. I. et al. Histological and Biochemical Effects of Cigarette Smoke on the Liver of Wistar Rats. **SCIENCEDOMAIN international,** v. 7, n. 2, p. 119-125, 2015. ISSN 2347-565. Disponível em: < https://www.academia.edu/12823694/Histological_and_Biochemical_Effects_of_Cigarette_Smoke_on_the_Liver_of_Wistar_Rats >.

OLAYINKA, E. T. et al. Quercetin, a Flavonoid Antioxidant, Ameliorated Procarbazine-Induced Oxidative Damage to Murine Tissues. In: (Ed.). **Antioxidants (Basel)**, v.4, 2015. p.304-21. ISBN 2076-3921 (Electronic).

PAVANATO, A. et al. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. **Dig Dis Sci,** v. 48, n. 4, p. 824-9, Apr 2003. ISSN 0163-2116 (Print)0163-2116. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

PENA, K. B. et al. The administration of a high refined carbohydrate diet promoted an increase in pulmonary inflammation and oxidative stress in mice exposed to cigarette smoke. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis,** v. 11, p. 3207-3217, 2016. ISSN 1176-9106. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.2147/copd.s119485 >.

PERLSTEIN, T. S.; LEE, R. T. Smoking, metalloproteinases, and vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** v. 26, n. 2, p. 250-6, Feb 2006. ISSN 1079-5642. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000199268.27395.4f >.

PESSIONE, F. et al. Cigarette smoking and hepatic lesions in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology,** v. 34, n. 1, p. 121-5, Jul 2001. ISSN 0270-9139 (Print)0270-9139. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1053/jhep.2001.25385 >.

PILKHWAL, S. et al. Effect of Bioflavonoid Quercetin on Endotoxin- Induced Hepatotoxicity and Oxidative Stress in Rat Liver. 2019. Disponível em: < https://pdfs.semanticscholar.org/6da1/0672b61dd232c4f2df296e6cd1b99ea6bc67.pdf >.

RAZA, H.; JOHN, A.; NEMMAR, A. Short-term effects of nose-only cigarette smoke exposure on glutathione redox homeostasis, cytochrome P450 1A1/2 and respiratory enzyme activities in mice tissues. **Cell Physiol Biochem,** v. 31, n. 4-5, p. 683-92, 2013. ISSN 1015-8987. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1159/000350087 >.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol,** v. 233, p. 357-63, 1994. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

SAK, K. Site-specific anticancer effects of dietary flavonoid quercetin. **Nutr Cancer,** v. 66, n. 2, p. 177-93, 2014. ISSN 0163-5581. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2014.864418 >.

SANCHEZ-VALLE, V. et al. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. **Curr Med Chem,** v. 19, n. 28, p. 4850-60, 2012. ISSN 0929-8673. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

SOARES, N. P. et al. The Effects of the Combination of a Refined Carbohydrate Diet and Exposure to Hyperoxia in Mice. **Oxid Med Cell Longev,** v. 2016, p. 1014928, 2016. ISSN 1942-0994. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1155/2016/1014928 >.

TRICHOPOULOS, D. et al. Hepatocellular carcinoma risk factors and disease burden in a European cohort: a nested case-control study. **J Natl Cancer Inst,** v. 103, n. 22, p. 1686-95, Nov 16 2011. ISSN 0027-8874. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djr395 >.

VAAMONDE-GARCIA, C. et al. Mitochondrial dysfunction increases inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes. **Arthritis Rheum,** v. 64, n. 9, p. 2927-36, Sep 2012. ISSN 0004-3591. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1002/art.34508 >.

WESTRA, J. W. et al. A Modular Cell-Type Focused Inflammatory Process Network Model for Non-Diseased Pulmonary Tissue. In: (Ed.). **Bioinform Biol Insights**, v.7, 2013. p.167-92. ISBN 1177-9322 (Electronic).

WU, L. et al. Hepatoprotective effect of quercetin via TRAF6/JNK pathway in acute hepatitis. **Biomed Pharmacother,** v. 96, p. 1137-1146, Dec 2017. ISSN 0753-3322. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.109 >.

XU, D. et al. Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. **Molecules,** v. 24, n. 6, Mar 21 2019. ISSN 1420-3049. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.3390/molecules24061123 >.

YANG, T. et al. Quercetin attenuates airway inflammation and mucus production induced by cigarette smoke in rats. **Int Immunopharmacol,** v. 13, n. 1, p. 73-81, May 2012. ISSN 1567-5769. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2012.03.006 >.

YU, M. W. et al. Role of N-acetyltransferase polymorphisms in hepatitis B related hepatocellular carcinoma: impact of smoking on risk. **Gut,** v. 47, n. 5, p. 703-9, Nov 2000. ISSN 0017-5749 (Print)0017-5749. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1136/gut.47.5.703 >.

YUAN, L.; KAPLOWITZ, N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. **Mol Aspects Med,** v. 30, n. 1-2, p. 29-41, Feb-Apr 2009. ISSN 0098-2997. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.003 >.

ZHANG, J. P. et al. Inhibitory effect of quercetin on tumor necrosis factor and interleukin-1 beta pro-osteoclastic activities. **Zhongguo Yao Li Xue Bao,** v. 17, n. 3, p. 261-3, May 1996. ISSN 0253-9756 (Print)0253-9756. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

8. ANEXO

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@ufop.edu.br

OFÍCIO CEUA Nº. 094/2015, de 16 de novembro de 2015

Ilustríssimo(a) Senhor(a)
Professor(a) Doutor(a) Frank Silva Bezerra
DECBI/UFOP

Senhor(a) Pesquisador(a),

Estamos enviando o certificado de aprovação do protocolo nº. 2015/20, "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA QUERCETINA SOBRE O DESEQUILÍBRIO REDOX E INFLAMAÇÃO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 EXPOSTOS À FUMAÇA DE CIGARRO".

2. Atendendo ao art. 6º, IX, da Resolução Normativa CONCEA nº 1, de 09.07.2010, solicitamos que encaminhe a CEUA/UFOP o relatório final do projeto, após executá-lo, conforme modelo do site da CEUA.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Lenice Kappes Becker
Coordenadora da CEUA/UFOP.