

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

ANA PAULA DE ANDRADE SILVA

**ESTUDO COMPARATIVO DA SUPLEMENTAÇÃO
COM ÁCIDO ASCÓRBICO E VITAMINA E NA
CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA.**

BAURU
2010

ANA PAULA DE ANDRADE SILVA

**ESTUDO COMPARATIVO DA SUPLEMENTAÇÃO
COM ÁCIDO ASCÓRBICO E VITAMINA E NA
CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA.**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado à
Universidade Sagrado Coração, como requisito para
obtenção do título de bacharel em Nutrição.
Orientadora: Prof.^aMs. Daniela S. Biagioni Vulcano.
Co-Orientadora: Prof.^a Dra. Adriane Gasparino dos
Santos.

BAURU
2010

S5861e

Silva, Ana Paula de Andrade

Estudo comparativo da suplementação com ácido ascórbico e vitamina E na cirrose biliar secundária / Ana Paula de Andrade Silva -- 2010.

39f. : il.

Orientadora: Profa. Ms. Daniela S. Biagioni Vulcano.

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriane Gasparino dos Santos.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Sagrado Coração - Bauru - SP.

1. Cirrose biliar secundária. 2. Experimento em ratos. 3. Vitaminas antioxidantes. 4. Vitamina Tocoferol. 5. Vitamina Àcido Ascórbico. I. Vulcano, Daniela S. Biagioni. II. Santos, Adriane Gasparino dos. III. Título.

ANA PAULA DE ANDRADE SILVA

**ESTUDO COMPARATIVO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO
ASCÓRBICO E VITAMINA E NA CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA.**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado à Universidade Sagrado Coração, como requisito para obtenção do título de bacharel em Nutrição. Orientadora: Prof.^a Ms. Daniela S. Biagioni Vulcano.

Co-Orientadora: Prof.^a Dra. Adriane Gasparino dos Santos.

Bancada Examinadora:

Prof.^a Ms. Daniela S. Biagioni Vulcano
Universidade Sagrado Coração

Ms. Ana Paula Tardivo
Nutricionista STND-UNESP Botucatu

Bauru, 10 de dezembro de 2010.

Dedico este trabalho e agradeço:

Com um carinho exclusivo aos meus pais, Ivanise de Andrade Silva e Vanderlei Machado da Silva que fizeram meu sonho se tornar realidade e me deram sempre seu apoio durante meus estudos. Ao meu namorado Gabriel Felipe Correa Fávoro, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos e por me fazer uma pessoa cada dia mais feliz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Em especial a minha querida orientadora Prof.^a Ms. Daniela S. Biagioni Vulcano, pela sua orientação segura e extremamente competente e por toda sua dedicação, paciência, delicadeza, carinho, respeito, atenção e inteligência depositada em mim.

À Prof.^a Dra. Adriane Gasparino dos Santos, que contribuiu com sua sabedoria, paciência, atenção, carinho e dedicação, e que graças a ela essa pesquisa pode ser realizada com sucesso.

À Ms. Ana Paula Tardivo por ter se disponibilizado a ser minha Banca.

Aos funcionários do Biotério da Universidade Sagrado Coração, por me auxiliar durante o experimento.

À Diretora do Centro de Ciências da Saúde, Leila Maria Vieira, que autorizou a realização da pesquisa nas dependências da Universidade Sagrado Coração.

Aos professores mestres e doutores que a mim repassaram seus conhecimentos, fazendo que meu desenvolvimento fosse o melhor possível ao longo de toda a minha caminhada.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram ou torceram pela concretização desta pesquisa.

E a Deus, pois sem Ele nada seria possível, me fazendo superar as dificuldades encontradas pelo caminho e por me ajudar a obter mais esta conquista.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

“Se num dia de tristeza você tiver de escolher entre o mundo e o amor, escolha o amor e com ele conquiste o mundo.”

Albert Einstein

RESUMO

A cirrose é uma doença crônica que acomete o fígado total ou parcialmente, sendo definida por septos fibrosos que formam cicatrizes largas e nódulos parenquimatosos evoluindo para destruição total do fígado. A cirrose biliar apresenta alto índice de mortalidade e é a principal indicação de transplante hepático na infância. A deficiência de antioxidantes na dieta alimentar e de outras substâncias essenciais pode prejudicar o combate ao estresse oxidativo. O papel antioxidante da vitamina C baseia-se na reação com os radicais hidroperoxil (radicais livres). Ela também serve como coantioxidante, interagindo com a vitamina E por redução do radical α -tocoferil para α -tocoferol regenerado. A vitamina E é um excelente estabilizador de radicais livres e o mais importante antioxidante lipossolúvel nas células dos mamíferos. O objetivo do experimento foi avaliar o efeito da suplementação de ácido ascórbico e vitamina E no tratamento da cirrose biliar secundária em ratos, através da indução da cirrose biliar secundária, por ligadura de ducto biliar comum. Foram estudados 16 ratos da raça Wistar, machos com peso corporal médio de 100-150g cada, com 60 dias de vida, acompanhados por um período de 21 dias. O presente estudo avaliou 4 grupos distintos, com 4 ratos em cada grupo, sendo: um grupo “ligado” com administração livre diária de água e ração, outro “ligado” com administração livre diária de água e ácido ascórbico; outro “ligado” com administração livre diária de água e vitamina E e “ligado” com administração livre diária de água, ácido ascórbico e vitamina E. Foi avaliado e comparado o ganho e perda de peso dos animais, as transaminases como AST e ALT e a proteína albumina. Pode-se notar que o grupo suplementado com vitamina C+E obteve menor perda de peso ou menor retenção hídrica. Já o grupo suplementado apenas com vitamina E, obteve maior ganho de peso comparado com os demais grupos. Com relação aos valores médios das transaminases séricas, observou-se uma discreta melhora no grupo suplementado com vitamina C+E, tanto nos valores de AST, quanto no de ALT, porém sem diferença estatística. Não houve redução significativa da albumina nos grupos suplementados e nem no grupo controle, devido ao curto período de realização do experimento e o número reduzido de ratos em cada grupo. Pode-se concluir que os grupos suplementados com vitaminas antioxidantes não apresentaram, nos parâmetros avaliados, alterações significativas que pudessem sugerir uma ação hepatoprotetora.

Palavras-chave: Cirrose Biliar Secundária. Experimento em ratos. Vitaminas antioxidantes. Vitamina Tocoferol. Vitamina Ácido Ascórbico.

ABSTRACT

Cirrhosis is a chronic disease that affects total or partially the liver being set by fibrous septum that forms large scars and parenchymal nodules evolving to total destruction of the liver. Biliary cirrhosis has a high mortality level and it's the main indication to hepatic transplantation in childhood. Deficiency of antioxidants and other essential substances in the diet can harm the fighting against oxidative stress. The antioxidant function of Vitamin C is based on a reaction with hydroperoxyl radicals (free radicals). It also works as coantioxidant interacting with vitamin E by reducing α -tocopheryl radical to regenerate α -tocopherol. Vitamin E is an excellent stabilizer of free radicals and the most important lipid-soluble antioxidant in mammalian cells. The objective was to evaluate the supplementation effect of ascorbic acid and vitamin E in treatment of secondary biliary cirrhosis in rats through the induction of secondary biliary cirrhosis by common bile duct ligation. It was studied 16 Wistar rats, males with a mean body weight of 100-150g each, 60 days of life and monitored for a period of 21 days. This study evaluated four different groups with four rats in each, one group "treated" with free daily administration of water and feed, other "treated" with free daily administration of ascorbic acid and water; other "treated" with free daily administration of water and vitamin E and other "treated" with free daily administration of water, ascorbic acid and vitamin E. It has been compared and evaluated in the animals gain and loss of weight, transaminases such as ALT and AST, and protein albumin. It can be noticed that the group supplemented with vitamin C+E had less weight loss and lower water retention. Now the group supplemented with vitamin E resulted in a higher weight gain compared with the other groups. In relation to average values of serum transaminases there was a slight improvement in the group supplemented with vitamin C + E in both values of AST and ALT, but with no statistical difference. There was no significant reduction neither in albumin-supplemented groups, nor in the control group due to the short period of the experiment and the restricted number of rats in each group. It can be concluded that the group supplemented with antioxidant vitamins showed no significant changes in the evaluated parameters, changes that could suggest a hepatoprotective action.

Keywords: Secondary Biliary Cirrhosis. Experiment in Rats. Antioxidant Vitamins. Tocopherol Vitamin. Ascorbic Acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Foto do rato macho da raça Wistar.....	20
Figura 2 - Foto do animal sendo identificado com caneta retrojetora.....	20
Figura 3 e 4 - Fotos do preparo da anestesia e aplicação da mesma.....	21
Figura 5 - Foto da realização da tricotomia com o animal anestesiado em decúbito dorsal horizontal na mesa de cirurgia.....	21
Figura 6 e 7 - Fotos da realização de incisão na pele do animal.....	21
Figura 8 - Foto da abertura do peritônio com tesoura reta.....	22
Figura 9 - Foto da exposição do ducto biliar.....	22
Figura 10 e 11 - Fotos da dupla ligadura do ducto biliar comum.....	23
Figura 12 - Foto da realização da ressecção da porção do ducto biliar comum.....	23
Figura 13 e 14- Fotos do fechamento da parede abdominal e fim da cirurgia.....	23
Figura 15 - Foto da punção intracardíaca em animal anestesiado.....	24
Figura 16 - Tubos de ensaio na centrífuga.....	25
Figura 17 - Foto do soro separado do sangue.....	25
Gráfico 1 - Valores Médios Séricos das Transaminases.....	27
Gráfico 2 - Valores Médios da Albumina Sérica.....	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVO.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	17
3 JUSTIFICATIVA.....	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
6 CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIA.....	32
APÊNDICE A- Lista de Materiais.....	39

1 INTRODUÇÃO

“A atresia de vias biliares (AVB) é uma doença de etiologia desconhecida que incide em 1 para cada 12 mil nascidos vivos.” (ALAGILLE, 1984 *apud* VELHOTE et al., 2003, p. 135).

Para Velhote et al., (2003), a partir das primeiras semanas de vida se iniciam os sintomas e caracterizam-se por icterícia com predomínio de bilirrubina direta, acolia fecal, colúria e hepatomegalia. Quando não tratada adequadamente, a AVB resulta na perda progressiva, pós-natal, da permeabilidade dos ductos biliares, desencadeando processo de fibrose periportal progressiva culminando em cirrose biliar, hipertensão portal com varizes de esôfago, ascite, desnutrição, infecções de repetição e óbito antes dos dois anos de idade.

A laparoscopia na atresia de vias biliares pode ser utilizada como auxiliar no diagnóstico, porém a biópsia hepática é o padrão ouro para confirmação diagnóstica da doença. (SILVA; MAKSOUUD, 2003).

Para Silva e Maksoud (2003), o tratamento cirúrgico deve ser realizado preferencialmente até a 10ª semana de vida, período em que a cirrose ainda não está instalada e os resultados são mais favoráveis.

Sabe-se apenas que a AVB é uma doença colestática, não-congênita, de início no período neonatal precoce, tendo como resultado final a cirrose hepática. Qualquer que seja sua causa: genética, imunológica, viral ou outra, a doença caracteriza-se por processo inflamatório que agride as vias biliares intra e extra-hepática e resulta em colestase crônica progressiva, expressão anatomopatológica de obstrução biliar no parênquima hepático. (LEFKOWITCH, 1998; GAYOTTO et al., 2001 *apud* GIBELLI, 2003, p. 2).

A condição hepatobiliar mais comum no período neonatal e nos primeiros meses de vida é a colestase, caracterizada pela diminuição ou ausência do fluxo biliar, ou de algum de seus componentes. A deficiência da secreção de sais biliares resulta na má absorção de lipídios e vitaminas lipossolúveis. (POUPON et al., 2000; SPRAUL et al., 2001).

A bile é um dos principais meios de excreção de metabólitos e de drogas do organismo. Os ácidos biliares, acumulados durante a colestase, devido a sua ação detergente sobre a membrana do hepatócito e de organelas citoplasmáticas, são as substâncias mais nocivas presentes no fígado. Dado a isso, a mais temida complicação da colestase é a fibrose hepática, que pode evoluir para cirrose e para insuficiência hepática. (COSTA, et al., 2006).

A velocidade e intensidade do desenvolvimento de fibrose e cirrose hepática dependem do grau e características da obstrução biliar. (KULLAK-UBLICK; MEIER, 2000; CRAWFROD, 1994).

“O modelo favorito para colestase extra-hepática utiliza ratos submetidos à ligadura do ducto biliar comum, tendo como consequência, na maioria das vezes um quadro de fibrose biliar secundária.” (GREIM et al., 1972 *apud* BATTOCHIO et al., 2004, p. 70).

A ligadura do ducto biliar comum (LDBC) em ratos é um dos modelos experimentais mais utilizados para o estudo das doenças colestáticas do adulto. A seqüência de alterações histopatológicas e bioquímicas decorrentes da obstrução biliar no modelo de LDBC no animal adulto já foi bem estabelecida por vários autores. (CAMERON; OAKLEY, 1932 *apud* GIBELLI, 2003, p. 4).

Porém, as diferentes respostas da obstrução biliar, ainda não foram completamente estudadas nos organismos jovens. (GIBELLI, 2003).

Conforme estudo dos autores, quanto às diferenças histológicas secundárias à obstrução do ducto biliar comum em ratos jovens e adultos, e observaram resposta inflamatória inicial e proliferação ductular menos intensas nos animais jovens em relação aos adultos. Porém ao final de 40 dias de observação, houve evolução mais rápida para a fibrose com a formação de nódulos de regeneração e cirrose nos animais jovens. (MEDEIROS, 1988 *apud* GIBELLI, 2003, p. 4).

Sokol e Mack (2001) relatam que os altos índices de mortalidade motivaram o estudo de doenças colestáticas. Algumas doenças colestáticas, como a atresia de vias biliares, quando não tratada, apresentam 100% de mortalidade e é a principal indicação de transplante hepático na infância.

Para Kumar et al., (2005) a cirrose ou hepatopatia crônica, pode se apresentar de forma assintomática ou levar a uma insuficiência hepática. Trata-se de uma doença crônica que acomete o fígado total ou parcialmente, sendo definida por septos fibrosos que formam cicatrizes largas e nódulos parenquimatosos evoluindo para destruição total do fígado.

A redução do oxigênio molecular ocorre durante o processo cirrótico, havendo a necessidade permanente de inativar espécies reativas de oxigênio (radicais livres). Os danos induzidos pelos radicais livres podem afetar muitas moléculas biológicas, incluindo os carboidratos, as proteínas, os lipídeos e as vitaminas, especialmente as antioxidantes como A, E e C, presentes nos alimentos. Uma dieta rica em antioxidantes reduz os riscos das principais doenças humanas o que tem sido comprovado em evidências. (MILTERSTEINER et al., 2003).

O fornecimento dos antioxidantes para o organismo se dá através de uma alimentação saudável e equilibrada. A deficiência de antioxidantes na dieta alimentar e de outras substâncias essenciais pode levar ao estresse oxidativo. (AMORIM; TIRAPEGUI, 2008).

“A vitamina C (ácido ascórbico) é hidrossolúvel e está presente principalmente em frutas cítricas e vegetais verdes.” (BEATTIE; SHERLOK, 1976; CHAMPE; HARVEY, 1996 *apud* PASSONI, 2005, p. 28).

O ácido ascórbico, na sua forma pura, é bastante instável, sendo facilmente destruído por temperaturas elevadas, luz, umidade, microelementos e lipídios oxidados. Estes fatores também contribuem para as perdas de ácido ascórbico na ração durante o processo de industrialização e posterior armazenamento. (TACON, 1991; SKELBAEK, et al., 1990; MASUMOTO, et al., 1991 *apud* ROTTA 2003 p. 10).

O ácido ascórbico é o nome comum dado ao ácido 2,3-enediol-L-gulônico, sendo considerado o agente redutor mais potente disponível nas células e sua principal importância é devido a sua atuação como antioxidante, dado o seu alto potencial de redução. Porém, o ácido ascórbico também pode atuar como um pró-oxidante em determinadas condições. (KANEKO et al., 1997).

A vitamina C é o antioxidante mais abundante no organismo humano, especialmente na pele, e este se protege naturalmente utilizando antioxidantes para neutralizar os efeitos nocivos dos radicais livres. (PINNELL, 2003).

O ácido ascórbico é facilmente absorvido a partir do intestino delgado para o sangue por um mecanismo ativo e provavelmente também por difusão, passa rapidamente às suprarrenais, rins, fígado e baço. O conteúdo de vitamina C, na maioria desses órgãos, parece estar em equilíbrio com os níveis sanguíneos. Quantidades excessivas ingeridas até o nível de saturação de vários tecidos são excretadas na urina como ácido oxálico; ingestões maiores que 100g/dia levam à eliminação do excesso, como ácido ascórbico ou como dióxido de carbono exalado. (MAHAN; ARLIN, 2002).

Segundo Weber et al., (1996 *apud* PASSONI, 2005, p. 28-29) “o papel antioxidante da vitamina C baseia-se na reação com os radicais hidroperoxil, produzindo radicais ascórbicos. Ela também serve como coantioxidante, interagindo com a vitamina E por redução do radical α -tocoferil para α -tocoferol regenerado.”

Silva (2002), através de seus estudos, observou aumento significativo nos níveis séricos de vitamina E, utilizando suplementação de vitamina C em modelo experimental de colestase.

“Em pacientes com cirrose, a diminuição nos níveis sanguíneos de glutathione e o aumento no nível de dehydroascorbato, sugerem a presença de estresse oxidativo, o qual contribui para a baixa ingestão e utilização deficiente de vitamina C.” (MARTENSSON; MEISTER, 1992, *apud* PASSONI, 2005, p. 29).

Para Zannoni et al., (1982, *apud* PASSONI, 2005, p. 29) “deficiência de ácido ascórbico pode levar à diminuição hepática do citocromo P450 e, assim, afetar a atividade hepática da metabolização enzimática de drogas.”

O ácido ascórbico estimula a função de desintoxicação do fígado, atenua a hiperglobulina resultante da colestase e diminui o depósito de gordura hepática causado pela colestase, portanto, parece apresentar alguns benefícios na cirrose biliar secundária como efeito hepatoprotetor. (PASSONI; COELHO, 2008).

Segundo Azulay et al., (2009), o ácido ascórbico atuando como co-fator para as enzimas lisil e propil hidroxilases, estimulando a transcrição dos genes do colágeno, sendo também importante na cicatrização das feridas, essencial na síntese de colágeno. Melhora a fotoproteção, aumentando as defesas antioxidantes por fornecer suplemento seguro e efetivo de armazenamento nos tecidos. A vitamina C é bem absorvida mesmo na presença de colestase, devido ao fato de ser hidrossolúvel, por isso pode ter efeito positivo na cirrose biliar por ligadura.

“Deficiência de vitaminas hidrossolúveis têm sido descritas em pacientes com doença hepática grave” (WILLIAMS et al., 1978, *apud* PASSONI, 2005, p. 29-30).

Leevy et al., (1970, *apud* PASSONI, 2005, p. 30), “referem que alterações nos níveis circulantes das vitaminas A, C, E, B6 e ácido fólico estavam regularmente presentes em seus pacientes com doença hepática crônica ou aguda.”

Muitas vitaminas hidrossolúveis estão envolvidas na manutenção de reações do metabolismo energético, sendo a maioria, componentes de sistemas enzimáticos essenciais. Uma suplementação diária é desejável para evitar depleção das mesmas e prejuízo nas funções fisiológicas, visto que essas vitaminas geralmente não são armazenadas no organismo em quantidades apreciáveis. Embora pouco se conheça sobre o mecanismo da deficiência em pacientes pediátricos com hepatopatia crônica, considerando-se a baixa ingestão de alimentos, em geral recomenda-se suplementação com o dobro da dose padrão das vitaminas hidrossolúveis. (ROQUETE, 1994; MELENDEZ, 2002).

O tocoferol (vitamina E) é um antioxidante, também denominado "free radical scavenger", que demonstrou atenuar os efeitos cardiotóxicos provocados pela doxorubicina. (MILEI; BOVERIS; LISUY et al., 1986 *apud* COSTA, 2004, p. 253).

Segundo Burton et al., (1993) através de seus estudos, comprovaram que o tocoferol é um excelente estabilizador de radicais livres e o mais importante antioxidante lipossolúvel nas células dos mamíferos.

A patogênese da doença esteatose-hepática não-alcoólica (NASH) acontece através do tratamento com o uso da vitamina E. O estresse oxidativo gera radicais hidroxila e superóxidos, que reagem com o excesso de lipídeos para formar os peróxidos. Esperasse que através do uso de uma substância antioxidante, tal como a vitamina E, poderia ser possível bloquear ou minimizar a lesão celular. (LAVINE, 2000).

Halliwell e Gutteridge (1990, *abud* BONOMO 2010 p. 22) definiram antioxidantes como substâncias que são capazes de competir com substratos oxidáveis e, então, impedir ou inibir significativamente a oxidação desses substratos mesmo em concentrações relativamente baixas. Nesta definição estão incluídas as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GSH-PX) e catalase (CAT), assim como os compostos não-enzimáticos, como, por exemplo, α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascobato (vitamina C) e glutatona.

A vitamina E (alfa-tocoferol) é responsável por proteger a membrana celular da peroxidação lipídica por ser considerada a principal vitamina lipossolúvel. (THAKUR; SRIVASTAVA, 1996).

A deficiência desta vitamina pode causar baixo crescimento, exoftalmia, ascite, anemia, prejuízo à produção de eritrócitos, menor resposta de anticorpo, despigmentação e acúmulo de gordura no fígado. (TACON, 1992).

A suplementação com substâncias como a vitamina E, importante antioxidante lipofílico das membranas celulares é uma outra alternativa dietética que tem sido bastante investigada. Diversos efeitos benéficos desse procedimento incluem a proteção contra o prejuízo oxidativo em diversos tecidos, inibição da modificação do DNA e da incidência de câncer, em animais, e melhora da utilização de glicose e da resposta hepática à insulina, em humanos. (LEIBOVITZ et al., 1990; GARRIDO et al., 1993; ZHANG et al., 1997; PAOLISSO et al., 1993).

As funções que esta vitamina desempenha no organismo como agente antioxidante, envolvido no retardamento do envelhecimento e na proteção a doenças crônicas não transmissíveis, como Alzheimer, Parkinson, câncer e doenças cardiovasculares, tem despertado interesse cada vez maior em seu estudo. (BIANCHINI et al., 2003; BRIGELIUS-FLOHÉ et al., 2002; MEYDANI 2000).

Através da inativação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, a vitamina E previne o dano oxidativo celular. Além da sua ação antioxidante, são discutidas as suas

propriedades não antioxidantes como modulação da sinalização celular e da transcrição de genes. (MUNTEANU, 2004).

A vitamina E é um termo geral empregado para designar oito compostos lipossolúveis, os α , β , γ e δ tocoferóis e α , β , γ e δ tocotrienóis. Cada um desses compostos pode apresentar a mesma ou diferentes atividades biológicas, porém, com especificidades. Embora o processo de absorção intestinal seja o mesmo, há uma diferenciação no metabolismo desses compostos. Tal diferenciação ocorre no fígado, no qual uma proteína específica de transferência do α -tocoferol tem maior afinidade para se ligar a esse composto na forma natural do que aos outros isômeros ou à forma sintética. (GUINAZI, 2004; HOPE; KRENNRICH, 2000).

Muitos pesquisadores tem estudado a vitamina E devido a sua atividade antioxidante e sua capacidade de prevenir doenças crônicas, principalmente as que se acreditam terem um componente de estresse oxidativo, como doenças cardiovasculares (DCV), aterosclerose e câncer. (UPSTON et al., 1999).

“O ácido ascórbico é um importante anti-oxidante em humanos, enquanto a vitamina E é o maior antioxidante lipossolúvel e o mais eficaz protetor da oxidação das lipoproteínas, partículas que oxidadas são altamente tóxicas e aterogênicas.” (MIKHAIL et al., 1994. p. 575).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação de ácido ascórbico e vitamina E no tratamento da cirrose biliar secundária em ratos.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Induzir a cirrose biliar secundária por ligadura de ducto biliar comum
- Comparar o ganho e perda de peso dos animais;
- Identificar possíveis maneiras de retardar a progressão da doença;
- Verificar a função e a integridade hepática através da análise das enzimas séricas Aminotransferases Aspartato (AST) e Alanina (ALT) e da Albumina.

3 JUSTIFICATIVA

Este trabalho justifica-se devido a estudos realizados no começo do século XX, por pesquisadores americanos e ingleses, que utilizaram ratos ao iniciarem suas pesquisas com requerimento de vitaminas. Devido ao baixo consumo alimentar, econômicos aos laboratórios, e a facilidade de uso, atualmente os ratos são muito utilizados em outros tipos de pesquisas como testes biológicos e psicológicos. Nos ratos, é possível avaliar o efeito de quantidades mínimas do material em experiência, pois o teste seria bem mais difícil em animais de maior porte.

Considerando que a cirrose biliar produz radicais livres e a vitamina E e a vitamina C são potentes antioxidantes justifica-se a suplementação destes micronutrientes na presença de cirrose biliar secundária com o intuito de minimizar a produção de radicais livres, bem como avaliar o seu possível efeito hepatoprotetor.

Portanto, o presente estudo espera encontrar situação semelhante na cirrose biliar secundária utilizando uma suplementação com esses micronutrientes em ratos jovens com 60 dias de vida, com ligadura do ducto biliar comum.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos de manutenção, anestesia, cirurgia e eutanásia dos animais serão realizados segundo as recomendações do Canadian Council of Animal Care (1984) e do Guide for the Care and Use of Laboratory Animals National Research Council, EUA e seguindo os Princípios Éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) com o intuito de diminuir qualquer sofrimento dos animais em estudo.

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram estudados 16 ratos da raça Wistar, machos com peso corporal médio de 100-150g cada e com 60 dias de vida e acompanhados por um período de 21 dias. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Universidade Sagrado Coração, sendo selecionados aleatoriamente e mantidos em gaiolas próprias. Após o procedimento cirúrgico passaram a receber ração comercial e água *ad libitum*. O processo de colestase obstrutiva resultou da ligadura e ressecção do ducto biliar comum.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

O presente estudo avaliou 4 grupos distintos, com 4 ratos cada. Cada grupo foi submetido a um dos tratamentos descritos abaixo:

- Grupo 1: “Ligado” com administração livre diária de água e ração
- Grupo 2: “Ligado” com administração livre diária de água e 0,2 ml de ácido ascórbico;
- Grupo 3: “Ligado” com administração livre diária de água e 0,2 ml de vitamina E;
- Grupo 4: “Ligado” com administração livre diária de água e 0,2 ml de ácido ascórbico e 0,2 ml de vitamina E.

Os ratos foram submetidos ao ciclo claro-escuro (12 horas de iluminação artificial e 12 horas de escuro) e controle de temperatura (em torno de 22 a 23 °C) e pesados no início do experimento e no dia da eutanásia. Após obtenção desses dados foi calculado o ganho de peso de cada animal subtraindo o peso final pelo peso inicial.



Figura 1 - Foto do rato macho da raça Wistar.
Fonte: Fotografado pela autora.

4.3 EXECUÇÃO DA LIGADURA E RESSECÇÃO DO DUCTO BILIAR COMUM

A ligadura e ressecção do ducto biliar comum foram realizadas segundo a técnica descrita por Cameron e Oakley (1932), adaptada por Battochio (2004), como segue abaixo:

- Identificação dos animais de cada grupo;



Figura 2 - Foto do animal sendo identificado com caneta retroprojetora.
Fonte: Fotografado pela autora.

- Anestesia com 0,1ml de Cloridrato de Xilazina – Rumpum (analgésico, sedativo e relaxante muscular) e 0,1ml de Cloridrato de Cetamina - Dopalem (agente anestésico);



Figura 3 e 4 - Fotos do preparo da anestesia e aplicação da mesma.
Fonte: Fotografado pela autora.

- Posicionamento dos animais em decúbito dorsal horizontal na mesa de cirurgia;
- Tricotomia da parede abdominal anterior;



Figura 5 - Foto da realização da tricotomia com o animal anestesiado em decúbito dorsal horizontal na mesa de cirurgia.
Fonte: Fotografado pela autora.

- Incisão da pele na linha mediana, desde o apêndice xifóide até a cicatriz umbilical;



Figura 6 e 7 - Fotos da realização de incisão na pele do animal.
Fonte: Fotografado pela autora.

- Exposição das camadas musculares e da linha alba;
- Incisão da linha alba do mesmo tamanho da abertura da pele;
- Abertura do peritônio com tesoura reta sem exposição dos órgãos abdominais;



Figura 8 - Foto da abertura do peritônio com tesoura reta.
Fonte: Fotografado pela autora.

- Exposição do ducto biliar com abaixamento do duodeno;



Figura 9 - Foto da exposição do ducto biliar.
Fonte: Fotografado pela autora.

- Dissecção do ducto biliar desde abaixo da entrada do último ducto biliar até a sua porção distal, próxima ao duodeno;
- Dupla ligadura do ducto biliar comum, sendo colocadas as ligaduras o mais proximal e mais distalmente possível;



Figura 10 e 11 - Fotos da dupla ligadura do ducto biliar comum.
Fonte: Fotografado pela autora.

- Ressecção da porção do ducto biliar comum entre as duas ligaduras.



Figura 12 - Foto da realização da ressecção da porção do ducto biliar comum.
Fonte: Fotografado pela autora.

- Fechamento da parede abdominal com sutura contínua, feita com fio próprio para este procedimento.



Figura 13 e 14 - Fotos do fechamento da parede abdominal e fim da cirurgia.
Fonte: Fotografado pela autora.

Os materiais que foram utilizados na pesquisa encontram-se descritos no Apêndice A.

4.4 ADMINISTRAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO E VITAMINA E

Os animais do grupo ligado receberam a solução aquosa de vitamina C (*Roche®*), (ácido ascórbico) e vitamina E em quantidades de 0,2 ml/dia de ambas as vitaminas via peritoneal.

4.5 EUTANÁSIA

Os animais foram anestesiados com 0,2 ml de Cloridrato de Xilazina – Rumpum (analgésico, sedativo e relaxante muscular) e 0,2 ml de Cloridrato de Cetamina - Dopalem (agente anestésico). O sangue foi colhido por punção cardíaca e o soro foi utilizado para determinação da função e lesão hepática.



Figura 15- Foto da punção intracardíaca em animal anestesiado.
Fonte: Fotografado pela autora.

Ao coletar o sangue dos animais, estes foram colocados em tubos de ensaio individuais, com gel anticoagulante no fundo, tampado e agitado manualmente. Em seguida, os tubos foram colocados em uma centrífuga por um período de 10 minutos para separação do soro e sangue, para a realização dos exames laboratoriais.



Figura 16- Tubos de ensaio na centrifuga.
Fonte: Fotografado pela autora.



Figura 17- Foto do soro separado do sangue.
Fonte: Fotografado pela autora.

4.6 MEDIDAS REALIZADAS APÓS A EUTANÁSIA

Foi realizada avaliação de função hepática através da atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e da concentração sérica de albumina, através de sangue colhido na realização da eutanásia.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As planilhas dos dados foram compiladas no programa Excel (2010), sendo as análises descritivas (média e desvio padrão) realizadas no mesmo programa. O teste t de student para comparação entre os grupos foi realizado pelo programa PASW Statistics 18 (2010) e o nível de significância considerado foi de 5%.

Tabela 1- Média e DP da Variável Peso (kg)

	PI (Kg)	PF (Kg)	PF – PI	Valor de p
Cirrose	198,33 ± 17,41	227,27 ± 57,65	35,53 ± 70,69	p>0,05
Vitamina C	164,4 ± 18,80	205 ± 9,02	32,93 ± 6,35	p>0,05
Vitamina E	173,55 ± 14,92	212,53 ± 21,28	46,33 ± 18,15	p>0,05
Vitamina C+E	186,75 ± 10,18	198,27 ± 7,10	11,33 ± 11,36	p>0,05

Fonte: Elaborado pela autora.

No início do experimento, todos os ratos foram pesados e apresentaram médias de peso inicial de 198,33 ± 17,41 no grupo cirrótico, 164,4 ± 18,80 no grupo suplementado com vitamina C (Roche ®), 173,55 ± 14,92 no grupo suplementado com vitamina E (tocoferol) e 186,75 ± 10,18 no grupo suplementado com as duas vitaminas, C+E.

No final do experimento, todos os ratos foram pesados novamente, onde os do grupo cirrose apresentaram médias de peso final significativamente maior, sendo de 227,27 ± 57,65, do que os dos demais suplementados. Os ratos suplementados com vitamina C+E apresentaram médias de peso final menor do que os outros suplementados e o grupo cirrótico, porém sem diferença estatística significativa.

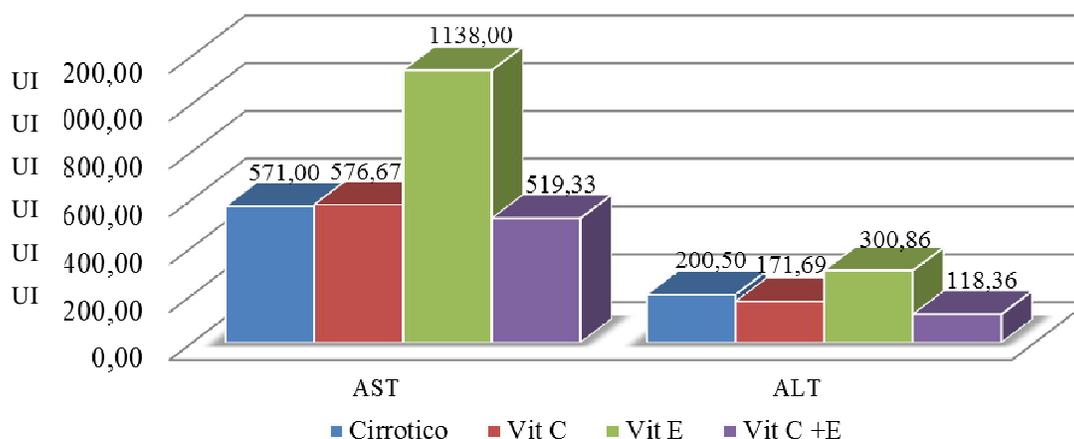
Na relação peso final com peso inicial, pode-se notar que o grupo suplementado com vitamina C+E obteve menor perda de peso ou menor retenção de líquidos. Já o grupo com apenas vitamina E, foram os que resultaram em um maior ganho de peso comparado com os demais grupos, sendo as vitaminas que mais se destacaram em relação à perda e ganho de peso.

No trabalho experimental de Passoni (2005), os resultados em relação ao peso, sugerem que a suplementação de vitamina C na dose empregada tem efeito estimulante sobre o crescimento de animais não colestáticos semelhante ao efeito observado em animais colestáticos. O efeito da vitamina C estimulando o crescimento não é influenciado pela colestase. Isto sugere que a ação da vitamina C atua por mecanismos que não sofrem

influência da colestase, ou seja, da má absorção de vitamina lipossolúvel; da alteração no metabolismo de lipídios e lipoproteínas e da desnutrição.

No experimento de Costa (2004), em um dos seus grupos suplementados que receberam doxorrubicina e tocoferol, o peso médio dos ratos esteve estatisticamente menor do que a média do grupo controle.

Gráfico 1- Valores Médios Séricos das Transaminases



Fonte: Elaborado pela autora.

São reconhecidas várias aminotransferases em diversos tecidos, mas as de maior interesse, por serem detectadas no soro são a Aspartato Transaminase AST e a alanina transaminase ALT. (KALIL; BERSCH, 2001).

A AST está presente em altas concentrações em muitos tecidos corporais, especialmente fígado, músculo esquelético e músculo cardíaco. Qualquer dano a um desses órgãos poderá danificar sua atividade, mas a diferenciação das isoenzimas não é feita rotineiramente como também a diferenciação entre a enzima citosólica (70%) e a mitocondrial (30%). (MILLER, 2002).

A elevação de origem hepática dos níveis séricos de AST ocorre por algum grau de lesão hepatocelular aguda de qualquer fator etiológico, sendo assim liberada das células lesadas. Os níveis séricos em cerca de 8 horas, tornam se elevados, atingem um pico de 2436 horas e se o episódio for de curta duração, normalizam se em três a seis dias. (RAVEL, 1997).

A ALT é encontrada principalmente no fígado e em menor quantidade no rim e coração. (MILLER, 2002) É essencialmente citoplasmática e sua meia vida sérica é de aproximadamente 47 horas. (PANTEGHINI, 1990).

A colestase, em humanos, é acompanhada de elevação significativa de ALT e AST, sendo importantes marcadores de lesão hepatocelular. (LECHNER, 1998).

Através de estudo em recém-nascidos apresentando doença hepática, mostrou um aumento da relação AST/ALT naqueles com evolução clínica ruim, e diminuição dessa relação naqueles com boa evolução no mesmo período. (ROSENTAL; HAIGHT, 1990).

Com relação aos valores médios das transaminases séricas, observou-se uma discreta melhora no grupo suplementado com vitamina C+E, tanto nos valores de Aminotransferases Aspartato (AST), quanto no de Alanina (ALT), porém sem diferença estatística.

Em seu estudo, Passoni (2008), afirma que a colestase significativamente aumentou o nível sérico de AST e ALT, independentemente do efeito do ácido ascórbico, e o ácido ascórbico não interferiu no efeito da colestase. A suplementação com ácido ascórbico provavelmente atenuou os efeitos da colestase, normalizando ou aumentando a produção de apolipoproteína A1 e, conseqüentemente, de VLDL e lipase lipoproteica, normalizando o transporte de triglicérides para os tecidos e reduzindo a porcentagem de gordura no fígado.

Segundo Weber et al., (1996) o papel coantioxidante da vitamina C interagindo com a vitamina E leva na redução do radical α -tocoferil para α -tocoferol regenerado.

Halim et al. (1997) demonstraram em sua pesquisa em ratos, que o uso de antioxidantes, tais como silimarina (30 mg/kg), vitamina E 200 IU/kg e vitamina C (50 mg/kg) modulavam significativamente os distúrbios causados por tetracloreto de carbono (CCl₄), podendo eventualmente ser importantes na profilaxia da lipoperoxidação e conseqüente fibrose hepática causada pelos radicais livres.

Um fator importante de ser ressaltado é o fato de que as transaminases de um dos ratos (principalmente AST) apresentaram valores discrepantes o que resultou no desvio da média neste grupo.

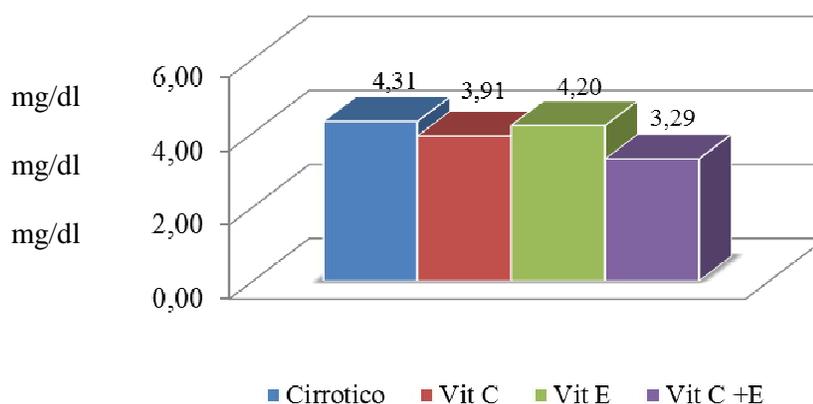
Diversos estudos demonstram que as elevações dos níveis plasmáticos de enzimas hepáticas como AST, ALT, GGT (gama glutamil transferase) e ALP ou FAL (fosfatase alcalina), estão relacionadas com o aumento da taxa metabólica do fígado indicando toxicidade hepática, principalmente quando exposto a drogas, agentes virais ou bacterianos. (BJORNSSON, 2006; TAKAHASHI et al., 1995).

A cirrose hepática pode ser considerada uma patologia de intenso estresse oxidativo, que ocorre devido ao efeito nocivo dos radicais livres que causam potencial dano biológico

em diversos sistemas, e em excesso são hepatotóxicos. (VALKO et al., 2007).

As vitaminas antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células podendo ser coadjuvantes no tratamento da mesma. (ATOUI et al., 2005; BARREIROS; DAVID, 2006; BIENERT et al., 2006; URTAOSUN; NIETO, 2007).

Gráfico 2- Valores Médios da Albumina Sérica



Fonte: Elaborado pela autora.

A albumina desempenha funções biológicas diversas, que incluem a ligação e o transporte de numerosas substâncias, tais como íons metálicos, aminoácidos, hormônios, ácidos graxos, bilirrubina, enzimas, drogas e /ou produtos tóxicos e sua síntese se dá no fígado. Exerce igualmente um papel vital na preservação e na distribuição de água nos três compartimentos corporais. (MILLER, 2002).

A albumina é responsável por 50% do total de proteínas, sendo a proteína mais abundante no plasma. (DUFOUR et al., 2000).

A meia vida da concentração de albumina sérica é razoavelmente prolongada (14 a 20 dias) na circulação, com menos de 5% de renovação diária, não sendo um bom indicador de lesão hepática aguda ou discreta (BATRES; MALLER, 2001).

Existe uma reserva substancial de síntese hepática de albumina; consequentemente a síntese adequada continua até que ocorra a lesão hepatocelular. (DUFOUR et al., 2000).

Após os 21 dias de acompanhamento, não houve nenhuma alteração da albumina nos grupos suplementados e nem no grupo controle. Vale ressaltar que os valores de albumina

sérica estão relacionados com a gravidade da doença hepática e que provavelmente o número de dias de acompanhamento tenham sido insuficientes para detectar alterações nesta variável.

Krahenbuhl et al. (1995), comprovaram que as concentrações séricas de albumina na ligadura do ducto biliar diminuem significativamente entre 14 e 30 dias pós ligadura, quando comparadas com os controles.

No experimento de Maia et al., (2003), as concentrações séricas da albumina não se modificaram, nos tempos estudados, em nenhum dos dois grupos. É possível que esse fato possa ser justificado pelo breve tempo do estudo (7 dias).

No estudo de Passoni (2005), a colestase diminuiu os níveis séricos de albumina independentemente do efeito da vitamina C. A vitamina C não interferiu nesse efeito da colestase.

De acordo com estudo de Marineli et al., (1995 *apud* QUARESMA et al., 2003, p. 29). “realizaram estudos com 80 ratos wistar e demonstraram que após 30 dias de ligadura do ducto hepático comum ocorreu aumento de bilirrubinas, fosfatase alcalina e transaminases e diminuição dos níveis séricos de albumina.”

6 CONCLUSÃO

Neste experimento com ligadura do ducto biliar comum em ratos, pode-se concluir que o grupo suplementado com vitamina E, vitamina C e vitamina E+C não apresentaram influência nos parâmetros avaliados (AST, ALT e albumina), quando comparado ao grupo não suplementado. Uma das possíveis explicações seria o curto período de realização do experimento, comparado aos outros trabalhos, e o número reduzido de ratos em cada grupo.

Assim, novas pesquisas com maior número de ratos e maior tempo de acompanhamento devem ser realizadas.

REFERÊNCIAS

ALAGILLE, D. Adaptation of experimental model of extrahepatic cholestasis in young rats. Acta Extrahepatic biliary atresia. **Hepatology**, EUA, p. 4:7, 1984.

AMORIM, A.G., TIRAPÉGUI, J. Aspectos atuais da relação entre exercício físico, estresse oxidativo e magnésio. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.21, n.5, p. 563-575, 2008.

ATOUI, A. et al. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chem**, Inglaterra, v.89, n.1, p. 27-36, 2005.

AZULAY, M.M. et al. Vitamina C. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, p. 265-274, maio/jun. 2003.

BATRES, L.A., MALLER, E.S. Laboratory assessment of liver function and injury in children. In: SUCHY, F.J., SOKOL, R.J., BALISTRERI, W.F. (Eds). **Liver disease in children**, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.15569, 2001.

BATTOCHIO, A. R. et al. Adaptação do modelo experimental de colestase extra-hepática em ratos jovens. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.19, n.1, 2004.

BEATTIE, A.D., SHERLOCK, S. Ascorbic acid deficiency in liver disease. **Gut**, Inglaterra, v.17, p.5715, 1976.

BIANCHINI, R., PENTEADO, M.V.C. Vitamina E. In: _____; _____. **Vitaminas**: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri: Manole, p. 23-164, 2003.

BJORNSSON, E. Drug-induced liver injury: Hy's rule revisited. **Clinical pharmacology and therapeutics**, EUA, v.79, n.6, p. 521, jun. 2006.

BONOMO, L.F. Excesso de ferro altera o *status* oxidativo, a homeostase de colesterol e glicose e a expressão de PPAR-A em hamsteres. **American journal of clinical nutrition**, Ouro Preto, v.76, n.4, p. 703, 2010.

BURTON, G.W. Antioxidants mechanisms of vitamin E and β - Carotene. **From basic science to medicine**, Switzerland Birkhäuser Verlag Basel, 1993.

CAMERON, G.R., OAKLEY, C.L. Ligation of the common bile duct. **J. Pathol bacteriol**, Índia, v.35, p. 769-98, 1932.

CHAMPE, P.C., HARVEY, R.A. **Bioquímica ilustrada**. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996. 446p.

COSTA, L.A.L., TEIXEIRA, V.N., SCHNEIDER, A. Estudo comparativo do possível efeito protetor da vitamina e na injúria pulmonar obtida por administração de doxorubicina em ratos. **Revista Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 31, n.4, p. 253, jul./ago. 2004.

COSTA, E.L.O., AZEVEDO JUNIOR, G.M., PETROIANU, A. Efeito da ressecção do íleo terminal na fibrose hepática secundária à ligadura do ducto hepático comum em ratos. **Revista Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v.33, n.1, p. 19-23, 2006.

CRAWFROD, J.M. The liver and the biliary tract: the liver. In: COFRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. **Robbins: pathologic basic of disease**. 5 th ed. Philadelphia: Saunders, p. 2, 1994.

DUFOUR, R.D. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I performance characteristics of laboratory tests. **Clínica Chimica Acta**, Holanda, v.46, p. 202-749, 2000.

GARRIDO, A. et al. Increased susceptibility of cellular membranes to the induction of oxidative stress after ingestion of high doses of fish oil: effect of aging and protective action of dl- α -tocopherol supplementation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Chapel Hill, v.4, n.2, p.118-122, 1993.

GAYOTTO, L.C.C, MELLO, E.S., STRAUSS, E. **Colestase**. In: Gayotto L.C.C Alves V.A.F. **Doenças do fígado e vias biliares**. São Paulo: Atheneu, 2001. p.753-762.

GIBELLI, N.E.M. **Fibrose portal e periportal na obstrução extra-hepática experimental em ratos jovens e adultos: contribuição para o estudo da atresia das vias biliares**. São Paulo: [s.n.], 2003.

GREIM, H. et al. **Bile acids in normal rat livers and in those after bile duct ligation**. *Gastroenterology*, v.63, p. 837-45, 1972.

GROPPER, S.A., SMITH, J.L., GROFF, J.L. The water-soluble vitamins. In: GROPPER, S.A., SMITH, J.L., GROFF, J.L., editors. **Advanced nutrition and human metabolism**. 4th ed. Belmont, CA: ThomsomWadsworth, p. 263-71, 2004.

GUINAZI, M. **Tocoferóis e tocotrienóis em hortaliças, ovos e óleos vegetais utilizados em restaurantes comerciais.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004.

HALIM, A.B. et al. Biochemical effect of antioxidants on lipids and liver function in experimental induced liver damage. **Annals of clinical biochemistry**, Inglaterra, v.34, n.6, p. 656-63, 1997.

HALLIWELL, B.H., GUTTERIDGE, J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, EUA, v.186, p. 1-85, 1990.

HOPE, P.P., KRENNRICH, G. Bioavailability and potency of natural-source and all-racemic α -tocopherol in the human: a dispute. **European journal of nutrition**, Alemanha, v.39, n.5, p. 183-93, 2000.

KALIL, A.N., BERSCH, V.P. **Exames complementares em vias biliares.** In: KALIL, A.N., COELHO, J., STRAUSS, E. Fígado e vias biliares. Livraria e Editora Revinter, cap.43, p. 5548, 2001.

KANEKO, J.J., HARVEY, J.W., BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals.** 5.ed. San Diego: Academic Press, p. 907, 1997.

KRAHENBUHL, S. et al. Characterization of mechanism causing by hypoalbuminemia in rats with long-term bile duct ligation. **Journal of hepatology**, Inglaterra, v.23, n.1, p. 79-86, 1995.

KULLAK-UBLICK, G.A., MÉIER, P.J. Pathophysiology of liver disease: mechanisms of cholestasis. **Clinics in liver disease**, EUA, p. 2, 2000.

KUMAR, V., ABBAS, K., FAUSTO, N. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças.** Rio De Janeiro: Elsevier, 2005.

LAVINE, J.E. Vitamine E treatment of nonalcoholic steatohepatitis in children: a pilot study. **The Journal of pediatrics**, EUA, v.136, p. 734-8, 2000.

LECHNER, A.J., VELASQUEZ, A. Cholestatic liver injury increases circulating TNF α and IL6 and mortality after Escherichia coli endotoxemia. **American journal of respiratory and critical care medicine**, EUA, v.157, p. 15508, 1998.

LEEVY, C.M., THOMPSON, A., BAKER, H. Vitamins and liver injury. **American journal of respiratory and critical care medicine**, EUA, v.23, p. 4939, 1970.

LEFKOWITZ, J.H. Bilizary Atresia. **Mayo Clinic Proceedings**, EUA, v.73, p. 90-5, 1998.

LEIBOVITZ, B.E., HU, M.L., TAPPEL, A.L. Lipid peroxidation in rat tissue slices: effect of dietary vitamin E, corn oil-lard and menhaden oil. **Lipids**, Champaign, v.25, n.3, p. 125-129, 1990.

MAHAN, K.L., ARLIN, T.M. Vitaminas. In: KRAUSE, M.V. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 10.ed. São Paulo: Roca, cap.6, p.71103, 2002.

MAIA, E. L. C. et al. Repercussões temporais da ligadura do ducto biliar principal em ratos wistar. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.18, n.1, p. 49, 2003.

MARINELLI, I.A. et al. Morphological changes before and after biliodigestive derivation in experimental cirrhosis induced by biliary ligation in the rat. **Revista espanhola de enfermidades digestivas**, Espanha, v.87, n.1, p. 25-31, 1995.

MARTENSSON, J., MEISTER, A. Glutathione deficiency increases hepatic ascorbic acid synthesis in adult mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v.89, p.115-668, 1992.

MASUMOTO, T., HOSOKAWA, H., SHIMENO, S. **Ascorbic acid's role in aquaculture nutrition**. In: Aquaculture feed processing and nutrition workshop, 1991, Thailand and Indonesia. Proceedings, Singapore: Americam Soybean Association, 1991.

MEDEIROS, M.V., FREITAS, L.A.R., ANDRADE, Z.A. Differences in hepatic pathologic resulting from bile duct obstruction in young and old rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, Brasil, v.21, p. 75-83, 1988.

MELLENDEZ, R. Importance of watersoluble vitamins as regulatory factors of genetic expression. **Revista de investigación clínica**, México, v 54, p.7783, 2002.

MEYDANI, M. Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. **The American journal of clinical nutrition**, EUA, v.71, n.6, 1665-68, 2000.

MIKHAIL, M.S. et al. Preeclampsia and antioxidant nutrients: decreased plasma levels of reduced ascorbic acid, α -tocopherol, and β -carotene in women with preeclampsia. **American journal of obstetrics and gynecology**, EUA, v.171, p. 150-7, 1994.

MILEI, J. et al. **Amelioration of adriamycin-induced cardiotoxicity in rabbits by prenylamine and vitamins A and E**. **American heart journal**, EUA, v.111, n.1, p. 95-102, 1986.

MILLER, O. **O laboratório e as técnicas de imagem no diagnóstico clínico**. São Paulo: Atheneu, 2002, p. 9239.

MILTERSTEINER, et al. Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. **Acta Cirurgia Brasileira**, São Paulo, v. 18, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/abc>>. Acesso em: 20 nov. 2009.

MUNTEANU, A., ZINGG, J.M., AZZI, A. **Anti-atherosclerotic effects of vitamin E: myth or reality**. **Journal of cellular and molecular medicine**, Ingraterra, v.8, n.1, p. 59-76, 2004.

PANTEGHINI, M. Aspartate aminotransferase isoenzymes. **Clinical biochemistry**, EUA, v.23, p. 3119, 1990.

PAOLISSO, G. et al. Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetic patients. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.57, n.5, p. 650-656, 1993.

PASSONI, C.R., COELHO, C. A. **Suplementação com ácido ascórbico tem efeito citoprotetor na cirrose biliar secundária: estudo experimental em ratos jovens**. **J. Pediatr.**, v. 84, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/>>. Acesso em: 10 de nov. de 2009.

PASSONI, C.R.M.S. **Suplementação com ácido ascórbico tem efeito citoprotetor na cirrose biliar secundária: estudo experimental em ratos jovens**. Botucatu: [s.n.], 2005. p. 28.

PINNELL, S.R. **Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection**. **Journal of the American Academy of Dermatology**, EUA, v.48, n.1, p. 1-19, 2003.

POUPON, R., CHAZOILLERES, O., POUPON, R.E. **Chronic cholestatic diseases**. **Journal of hepatology**, Inglaterra, v.32, n.1, p. 129-40, 2000.

QUARESMA, A.B. et al., **Estudo Bioquímico do Sangue de ratos após Ligadura do Ducto Hepático Direito**. Santa Catarina [s.n.], p. 29, 2003.

RAVEL, R. Provas hepáticas e do trato biliar. In: RAVEL, R. **Laboratório Clínico: Aplicações dos dados laboratoriais**. [S.l: s.n.], cap.20, p. 27289, 1997.

ROQUETE, V.L.M. Atresia de vias biliares extrahepáticas. In: PERET, F.A.L. **Manual de suporte nutricional em gastroenterologia pediátrica**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, cap.17, p.17788, 1994.

ROSENTAL, P., HAIGHT, M. Aminotransferases as a prognostic index in infants with liver disease. **Clinical chemistry**, EUA, v.36, p .3468, 1990.

ROTTA, M.A. **Utilização do Ácido Ascórbico (Vitamina C) pelos Peixes**. Corumbá, 2003. p. 10.

SILVA, M.M., MAKSOUUD J.G.M. Videocirurgia na Atresia de Vias Biliares. In Maksoud JG, Cirurgia Pediátrica, 2ª edição, **Revinter**, p. 904:909, 2003.

SILVA, C.R.M. **Efeito da suplementação de vitamina C (ácido ascórbico) sobre as alterações nutricionais decorrentes da cirrose biliar secundária: estudo experimental em ratos jovens hepáticos**. Botucatu, 2002. 200p. Tese (Mestrado em Fisiopatologia em Clínica Médica – Metabolismo e Nutrição) – Departamento de Clínica Médica – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

SKELBAEK, T. et al. Stability in fish feed and bioavailability to rainbow trout of two ascorbic acid forms. **Aquaculture**, Inglaterra, v.84, n.3-4, p. 335-343, 1990.

SOKOL, R.R.J., MACK, C. Etiopathogenesis of biliary atresia. **Seminars in liver disease**, EUA, v.21, n.4, p. 517-24, 2001.

SPRAUL, A.D. et al. Tandard treatment of tocopherol in alagille patients with severe cholestasis is insufficient. **Pediatric research** , EUA, v.49, p. 232-6, 2001.

TACON, A. G. J. **Vitamin nutrition in shrimp and fish**. In: Aquaculture feed processing and nutrition workshop, 1991, Thailand and Indonesia. Proceedings, Singapore: Americam Soybean Association, Editado por D. M. Akiyama e R.K.H.Tan, 1991.

TACON, A.G.J. **Nutritional fish pathology. Morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish.** Rome: Food and Agriculture Organization, p.1-75, 1992.

TAKAHASHI, H., FUJIMOTO, J., HANADA, S., ISSELBACHER, K.J. Acute hepatitis in rats expressing human hepatitis B virus transgenes. **Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A.** v.28, n.5, p. 1470-4, Feb 1995.

THAKUR, M.L., SRIVASTAVA, U.S. Vitamin-E metabolism and its application. **Nutrition Research,** Tarrytown, v.16, n.10, p. 1767-1809, 1996.

UPSTON, J. M. et al. Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as potential antiatherogenic supplement. **The Faseb journal,** v. 13, n. 9, p. 977-94, 1999.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry cell biology,** Holanda, v. 39, n.1, p. 44-84.

VELHOTE, M.C.P., SILVA, M.M., ANDRADE, W.C., MACKSOD, J.G. Videocirurgia na Atresia de Vias Biliares. **Revista Brasileira de Videocirurgia,** p. 135, 2003.

WEBER, P., BENDICH, SCHALCH, W. Vitamin C and human health: a review of recent data relevant to human requirements. **International journal for vitamin and nutrition research,** Suíça, v.66, p. 1930, 1996.

WILLIAMS, R., DAVIS, M., LABADARIOS, D., ROSSOW J.E. Water Soluble Vitamins in Severe Liver Disease. **South African Medical J.,** v.54, p. 186, 1978.

ZANNONI V.G., HOLSZTYNSKA E.J., LAU S.S. Biochemical functions of ascorbic acid in drug metabolism. In: Seib PA, Tolbert B, editors. **Ascorbic acid: chemistry, metabolism and uses.** American Chemical Society, Washington, p. 349-68, 1982.

ZANNONI, V.G., HOLSZTYNSKA, E.J., LAU, S.S. Biochemical functions of ascorbic acid in drug metabolism. In: SEIB, P.A.. **Ascorbic acid: advances in chemistry, metabolism and uses.** Washington: American Chemical Society, p. 349-68, 1982.

ZHANG, D., OKADA, S., YU, Y., ZHENG, P., YAMAGUCHI, R., KASAI, H. Vitamin E Inhibits Apoptosis, DNA Modification, and Cancer Incidence Induced by Iron-mediated Peroxidation in Wistar Rat Kidney. **Cancer Research,** Baltimore, v.57, n.12, p. 2410-2414, 1997.

APÊNDICE A – Lista de Materiais

- Ratos *Wistar*
- Cloridrato de Xilazina (0,1ml) – *Rumpim*
- Cloridrato de Cetamina(0,1ml) - *Dopalem*
- Pincel atômico
- Caixa plástica para acondicionamento dos ratos - Gaiola
- Tesoura cirúrgica
- Bisturi cirúrgico
- Pinça cirúrgica
- Gazes
- Seringas
- Pontas para seringa
- Tubo coletor
- Suporte de madeira
- Fita crepe
- Luvas
- Maca
- Eppendorf
- Pipeta automática
- Centrífuga
- Refrigerador
- Ração
- Água
- Pote de água
- Balança semi analítica
- Pote plástico para pesagem dos animais
- Vitamina E
- Ácido Ascórbico