

# **Avaliação do sistema enzimático citocromo P450 em ratos com cirrose biliar secundária**

SILVIA BONA<sup>1</sup>  
JULIANA TIEPPO<sup>2</sup>  
RAFAEL VERCELINO<sup>2</sup>  
NÁDIA TERESINHA SCHRÖDER<sup>3</sup>  
NORMA ANAIR POSSA MARRONI<sup>4</sup>  
MARILENE PORAWSKI<sup>5</sup>

## **RESUMO**

*Avaliamos o citocromo P450 no tecido hepático de ratos com cirrose biliar secundária, submetidos ao tratamento com quercetina. Foram utilizados vinte ratos machos Wistar, divididos em quatro grupos: Controle; Controle + quercetina; Ligadura do Ducto Biliar; Ligadura do Ducto Biliar + quercetina. A administração da quercetina se deu a partir do 14<sup>o</sup> dia do procedimento cirúrgico. Após 28 dias, os animais foram sacrificados, o fígado foi retirado e homogeneizado em Ultra -Turrax, da fração microsomal foram quantificados os componentes do citocromo P450. Os animais com cirrose biliar secundária apresentaram diminuição significativa nos níveis do citocromo P450 em relação aos demais grupos. A administração do flavonóide quercetina resultou em aumento significativo na atividade do citocromo P450. A cirrose possivelmente causou a destruição da membrana microsomal e conseqüentemente, a inativação do P450. A administração da quercetina possibilitou a normalização da atividade do citocromo P450.*

**Palavras-chave:** Citocromo P450, quercetina, cirrose.

---

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Biologia/ULBRA – Bolsista PROBIC/FAPERGS

<sup>2</sup> Doutorando(a) do Pós-Graduação em Fisiologia/UFRGS

<sup>3</sup> Professora do Curso de Biologia/ULBRA

<sup>4</sup> Professora do Curso de Fisioterapia/ULBRA e do Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA

<sup>5</sup> Professora - Orientadora do Curso de Fisioterapia/ULBRA(marilene.pg@terra.com.br)

## ABSTRACT

Here we have evaluated cytochrome P450 in the liver tissue of rats with secondary biliary cirrhosis submitted to treatment with the flavonoid quercetin. Twenty male Wistar rats divided in 4 groups were used: Control; Control + Quercetin; Biliary Duct Ligation; Biliary Duct Ligation + quercetin. Quercetin administration started at the 14th day after the surgical procedure. Twenty days later, the animals were sacrificed and their livers were removed and homogenized in Ultra-Turrax, and cytochrome P450 components were quantified from the microsomal fraction. The animals with secondary biliary cirrhosis presented a significant reduction in cytochrome P450 levels as compared to the other groups. With the administration of quercetin, we found a significant increase in cytochrome P450 activity. Cirrhosis probably caused the destruction of the microsomal membrane and, hence, the inactivity of P450. The administration of quercetin made normalization of cytochrome P450 activity possible.

**Key words:** Cytochrome P450, quercetin, cirrosis.

## INTRODUÇÃO

O fígado, quanto ao tamanho, é o segundo órgão do organismo humano e constitui cerca de 2,5% do peso corporal. A organização estrutural de seus elementos parenquimatosos e vasculares está disposta de tal maneira que lhe permite realizar mais de 1500 funções bioquímicas, que podem agrupar-se em metabólicas, como a síntese de vitaminas proteínas plasmáticas, conversão e desaminação de aminoácidos, formação da uréia, formação, armazenamento e degradação do glicogênio, gliconeogênese, formação de lipoproteínas, fosfolípidios e colesterol, detoxificação de substâncias e a formação da bile (GONZÁLEZ-GALLEGO, 1998).

O tecido hepático é sensível e pode ser lesado de diversas maneiras, ocorrendo dano celular, infiltrado inflamatório, lesões vasculares, colapso parenquimatoso e desorganização de estrutura com tentativa de regeneração, aumento de mitoses e aparecimento de tecido fibroso. Nas lesões agudas, pode

haver regeneração completa, mas, nas lesões crônicas, há sempre seqüelas e tendência à evolução, principalmente pelo desenvolvimento de fibrose e desorganização vascular.

A cirrose é uma hepatopatia crônica e progressiva que determina a disfunção hepática de grau variável, sendo caracterizada pela formação de nódulos de fibrose. Ocorre como resposta do tecido hepático às inúmeras agressões de natureza inflamatória, tóxica, metabólica e congestiva e com a conseqüente reação inflamatória e desorganização parenquimatosa (RODHEN et al., 1998).

## SISTEMA DE BIOTRANSFORMAÇÃO HEPÁTICA

Os organismos vivos estão expostos a um grande número de compostos potencialmente tóxicos, tanto de origem endógena quanto exógena, tendo desenvolvido sistemas enzimáticos como o do citocromo P450, que facilita a inativação e a eliminação desses compostos, principalmente lipofílicos, facilmen-

te absorvidos, que são convertidos em derivados polares antes de serem excretados pelos rins ou pela bile (KAMINSKY, 1985).

As reações da fase I da biotransformação são catalisadas principalmente pelo sistema P450 de monooxigenases, localizado na membrana do retículo endoplasmático liso das células. A complexidade desta organela está relacionada a sua superfície bidimensional que possui uma distribuição heterogênea de proteínas e lipídios, sendo a densidade das proteínas correspondente a 70% do peso total da membrana (HIRD et al., 1964; DE PIERRE & ERNSTER, 1977; PETERSON & PROUGH, 1986).

O termo “citocromo P450” foi usado pela primeira vez em 1962 para identificar uma hemoproteína com características únicas, valendo-lhe o nome de pigmento microsomal ligante ao monóxido de carbono (“microsomal carbon monoxid-binding pigment”) (OMURA & SATO, 1964a; OMURA & SATO, 1964b; BERNHARDT, 1995; OMURA, 1999). A característica clássica do sistema P450 é a posição peculiar do seu pico de Soret em 450 nm como resultado da formação do complexo Ferro com monóxido de carbono surgindo desta constatação o nome citocromo P450 (OMURA & SATO, 1964a; OMURA & SATO, 1964b; MANSUY, 1998).

Microsomas hepáticos catalisam uma grande variedade de reações de oxidação, como a hidroxilação de compostos aromáticos e alifáticos, a N-oxidação de drogas, etc. Essas reações são possíveis graças à associação dos diversos componentes do sistema microsomal (VROLIJK et al., 1994; KOBLYAKOV, 1995; OMURA, 1999).

Quando a estrutura do sistema P450 é perturbada por agentes estressores, como poluição, doenças ou drogas, ocorre o deslocamento do pico de 450nm para 420nm – semelhante ao da hemoglobina - gerando a forma P420 que é inativa (OMURA & SATO, 1964a; OMURA & SATO, 1964b). A desestabilização da membrana do retículo endoplasmático é responsável por deslocar o pico de 450nm para 420nm, o que demonstra a grande influência do ambiente lipídico para o funcionamento do citocromo P450 (NEBERT & GONZALEZ, 1987; BENHARDT, 1995; OMURA, 1999).

Em organismos eucariontes, o sistema P450 encontra-se na membrana do retículo endoplasmático liso e na membrana interna da mitocôndria. Nesses casos esta ancoragem na membrana se dá através de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. No entanto, a composição do sistema das monooxigenases no retículo endoplasmático é diferente da mitocondrial, conferindo ao sistema P450 diferentes funções. Enquanto o sistema P450 mitocondrial está envolvido na síntese de esteróides e clivagem de colesterol, o sistema P450 microsomal atua principalmente na biotransformação de xenobióticos (BLACK, 1992; COON et al., 1992; OMURA, 1999).

A reação clássica do sistema P450 envolve a transferência dos seus átomos de oxigênio para o substrato ? daí ser denominada monooxigenação. A ativação deste sistema necessita de dois equivalentes redutores que chegam até o citocromo P450 por dois passos redutores distintos. No primeiro, o elétron é transferido do NADPH para o citocromo P450 através da enzima NADPH citocromo P450 redutase. Já o segundo elétron pode vir de várias fontes, embora o doador mais comum seja o citocromo b5, através da enzima NADH citocromo b5 redutase. Estas

transferências geram espécies reativas do oxigênio na forma de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que por sua vez podem causar danos ao organismo por serem precursores do radical hidroxil (COON et al., 1992; GUENGERICH et al., 1995; GUENGERICH et al., 1998; KOBLYAKOV, 1998; OMURA, 1999).

O citocromo b5 é uma hemoproteína intrínseca localizada na face externa da membrana microssomal, um polipeptídeo com massa molecular ao redor de 16.000Da, composta por dois domínios; um globular e hidrofílico, no qual se encontra o grupamento heme e, um segundo fragmento composto por aminoácidos hidrofóbicos, responsáveis pelo ancoramento do citocromo na membrana microssomal. Quando reduzida, esta hemoproteína apresenta um máximo em 423-424 nm. Além de participar dos processos de oxidação de drogas, o b5 também participa da síntese de alguns fosfolipídios, o que explica o fato deste citocromo ser amplamente distribuído entre os tecidos e localizado em diversos compartimentos celulares (GARDA & BRENNER, 1984; PETERSON & PROUGH, 1986).

## **CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA**

A cirrose biliar é uma enfermidade crônica e difusa do fígado com alterações da estrutura e função, seja intra ou extra-hepática, da árvore biliar (GONZÁLEZ-GALLEGO, 1998).

Entre os modelos experimentais utilizados para avaliar e acompanhar o desenvolvimento fisiopatológico da cirrose está a ligadura de ducto biliar (LDB).

É um modelo que provoca marcada proliferação do ducto pela estase biliar, áreas focais de

necrose centrolobular, necrose periportal, proliferação e dilatação dos ductos e canaliculos biliares dos espaços porta, colangite estéril ou infecciosa com infiltração de polimorfonucleares, edema e fibrose dos espaços porta levando a alterações sistêmicas, onde pela lesão hepatocelular não ocorre devidamente a filtração do sangue, promovendo o desenvolvimento de “shunts” portossistêmicos e dramática diminuição da capacidade fagocitária do fígado, permitindo a entrada de bactérias e endotoxinas na circulação (FALLON, et al., 1997).

Em ratos com cirrose biliar secundária, provocada pela LDB, observa-se hepatomegalia e esplenomegalia, que acontecem principalmente por aumento do tecido conjuntivo, assim como do epitélio biliar (YAARI et al., 1992).

## **QUERCETINA**

Considerando que na cirrose observa-se a existência de alterações nos mecanismos antioxidantes, que produzem desequilíbrio nos processos oxidativos/antioxidativos e que estudos com dietas ricas em frutas e vegetais são associados a baixas taxas de doenças crônicas, vários antioxidantes e flavonóides têm sido referidos, recentemente, como eficazes para diminuir a fibrose em modelos animais de cirrose por álcool ou por administração de tetracloreto de carbono (PAVANATO, et al., 2003).

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

Em estudos anteriores foi demonstrado que a quercetina e outros flavonóides apresentam

propriedades farmacológicas, incluindo atividades antiviral e carcinostática, supressão na proliferação de células, modificação da síntese de eicosanóides, proteção da LDL da oxidação, prevenção da agregação plaquetária, estabilização de células imunes e relaxamento da musculatura cardiovascular (FORMICA, 1995).

Este trabalho teve como objetivo geral a implantação e padronização da técnica de quantificação do citocromo P450 por espectrofotômetro em nosso laboratório.

E como objetivos específicos determinar a concentração total de proteínas microsossomais no tecido hepático de ratos cirróticos por LDB e tratamento com quercetina, e verificar o comportamento espectral dos componentes do sistema microsossomal: citocromos P450, P420 e b5 no tecido hepático de ratos cirróticos por LDB e submetidos ao tratamento com quercetina.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se um modelo experimental de cirrose biliar secundária, através da ligadura do ducto biliar comum. Foram utilizados vinte ratos machos Wistar, com peso entre 200 e 300 gramas, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Os animais foram mantidos no Biotério do centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre durante o experimento. A água e a ração foram administradas *ad libitum*.

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

1. Grupo Controle: submetido à simulação da LDB (Sham-operated) (CO).

2. Grupo Controle + quercetina: submetido à simulação da LDB (Sham-operated) e tratamento com quercetina (CO + Q).
3. Grupo Submetido à Ligadura do Ducto Biliar (LDB).
4. Grupo Submetido à LDB e tratamento com quercetina (LDB + Q).

Os procedimentos com os animais ocorreram de acordo com o preconizado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GOLDIN & RAYMUNDO, 1997).

Para a intervenção cirúrgica, os animais foram anestesiados com uma mistura de Cloridrato de Xilazina 2% 50mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Cetamina 100mg/Kg de peso corporal intraperitonealmente (i.p.). Realizou-se uma laparotomia ventral média, seguida da dissecação do ducto biliar comum na altura da desembocadura dos ductos pancreáticos, ligando-os por meio de dois nós para posterior secção entre eles. A cavidade abdominal foi fechada primeiramente com pontos contínuos fechando o peritônio e a camada muscular, e por pontos separados em "U" no plano cutâneo. Os animais do grupo controle não foram submetidos à LDB, sendo realizada somente a manipulação do ducto mediante o estresse cirúrgico e fechamento da cavidade.

A administração da quercetina deu-se a partir do 14º dia do procedimento cirúrgico i.p., na dose de 50 mg/kg de peso do animal, sendo que os animais controle receberam solução fisiológica na mesma via i.p.

Após 28 dias da LDB, os animais foram mortos, o fígado retirado e congelado a -70°C para posteriores análises.

## Obtenção da Fração Microsomal e Quantificação dos Componentes do Sistema Microsomal Hepático

A quantificação do citocromo P450 foi realizada a partir dos microsomas extraídos do retículo endoplasmático do tecido hepático. Os fígados foram homogeneizados em Ultra-Turrax por 15 segundos em uma razão 1:4 (w/v) de Tampão Fosfato de Potássio 0,1M e pH 7,5; 0,15M de KCl e 1mM de EDTA.

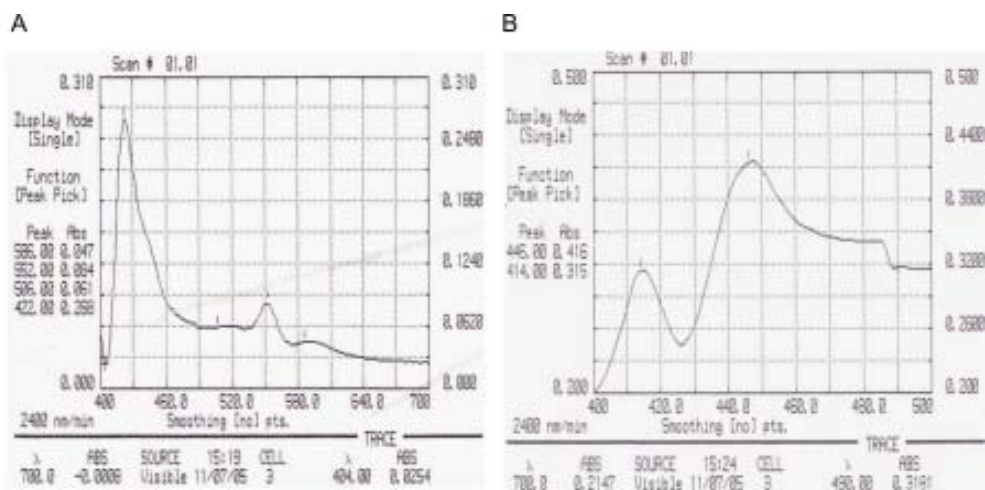
O homogeneizado foi submetido à centrifugação de 12.000 x g durante 20 minutos, da qual se retirou o sobrenadante que foi submetido a duas novas centrifugações de 105.000 x g, durante 60 minutos, que resultaram no isolamento das proteínas citossólicas no sobrenadante e as microsomas no pellet. O precipitado microsomal foi suspenso em Tampão Fosfato de Potássio 0,2M pH 7,5 com glicerol (mesma metodologia do tampão de lavagem, mas

acrescido de 20% de glicerol para a conservação dos microsomas) em uma razão de 1:3 (v/v), (VROLIJK et al., 1994).

A concentração das proteínas dos microsomas do fígado foi determinada pelo método de LOWRY et al. (1951), usando Albumina Bovina como padrão.

Para a caracterização espectral dos citocromos b5, P420 e P450, a suspensão microsomal foi diluída até uma concentração final de 1mg/ml, à qual acrescentou-se uma pequena quantidade de cristais de Ditionita de Sódio, o que permitiu a visualização do citocromo b5 (Figura 1 A). Nesta situação, a amostra foi lida contra uma solução de microsomas.

A concentração do citocromo b5 da amostra se calcula considerando o coeficiente de extinção molar deste citocromo que é de  $185\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  e expresso em mmoles de citocromo b5/mg de proteína microsomal.



**Figura 1** - Características espectrais dos dois principais componentes do sistema microsomal hepático. (A) Citocromo b5 e (B) Citocromo P450 em suspensões microsomais 1mg/ml reduzidas. Os citocromos foram identificados segundo o método de OMURA & SATO (1964a).

Os citocromo P450 e P420 são identificados através da geração de um composto formado entre os microssomas reduzidos com ditionita de sódio e borbulhados com 80ml de monóxido de carbono na suspensão de microssomas 1mg/ml reduzidos com Ditionita de Sódio, Figura 1 B (OMURA & SATO, 1964a; OMURA & SATO, 1964b).

A concentração do citocromo P450 da amostra calcula-se considerando o coeficiente de extinção molar deste citocromo que é de  $91\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  e expresso em mmoles de citocromo P450/mg de proteínas microssomais.

A concentração do citocromo P420 da amostra calcula-se considerando o coeficiente de extinção molar deste citocromo que é de  $111\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  e expresso em mmoles de citocromo P420/mg de proteínas microssomais.

As medidas foram feitas em um Espectrofotômetro Beckman DU70 em uma faixa de absorção de 400 - 700nm.

### **Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão para cada grupo experimental.

Para análise estatística, foi utilizado o software GraphPad InStat, versão 3.0, sendo utilizada ANOVA, seguido do teste de "Student Newman Keuls", sendo significativo quando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os animais com cirrose biliar secundária por LDB apresentam diminuição significativa nos níveis do citocromo P450 em relação aos demais gru-

pos; a administração da quercetina demonstra que o grupo LDB + Q aumenta significativamente a concentração do citocromo P450, voltando aos níveis próximos aos do controle (Figura 2 A).

A alta concentração de espécies reativas do oxigênio produzidas pelo modelo de LDB, conforme os achados de PERES (2000), TIEPPO (2005), ocasionou lipoperoxidação, decréscimo das enzimas antioxidantes e um desequilíbrio oxidante/antioxidante. Essa situação pode ocasionar a inibição do mecanismo catalítico do citocromo P450; tal constatação ocorre apenas em situações especiais como em doenças como a cirrose, ou em altas concentrações de xenobióticos no meio. Uma das hipóteses para explicar essa inativação seria a interação do radical ânion superóxido com o grupamento heme dos componentes do sistema mitocondrial hepático, que leva à inativação da proteína, pois altera seu estado redox (BENHARDT, 1995; FAROMBI, 2000).

PAVANATO et al. (2003) verificaram que na cirrose induzida por tetracloreto de carbono ocorre alteração nas provas de integridade hepática, aumento de fibrose hepática observada pelos valores de colágeno, aumento da expressão da iNOS e da lipoperoxidação hepática. A administração da quercetina diminui a lipoperoxidação, a fibrose, a expressão da iNOS, bem como a histologia hepática.

PERES et al. (2000) demonstraram, em um modelo experimental de cirrose biliar secundária, que a quercetina e a rutina produziram efeito hepatoprotetor, reduzindo a peroxidação lipídica, preservando parcialmente a atividade das enzimas antioxidantes, diminuindo a fibrose e a concentração de colágeno.

MILTERSTAINER et al., em 2003, demons-

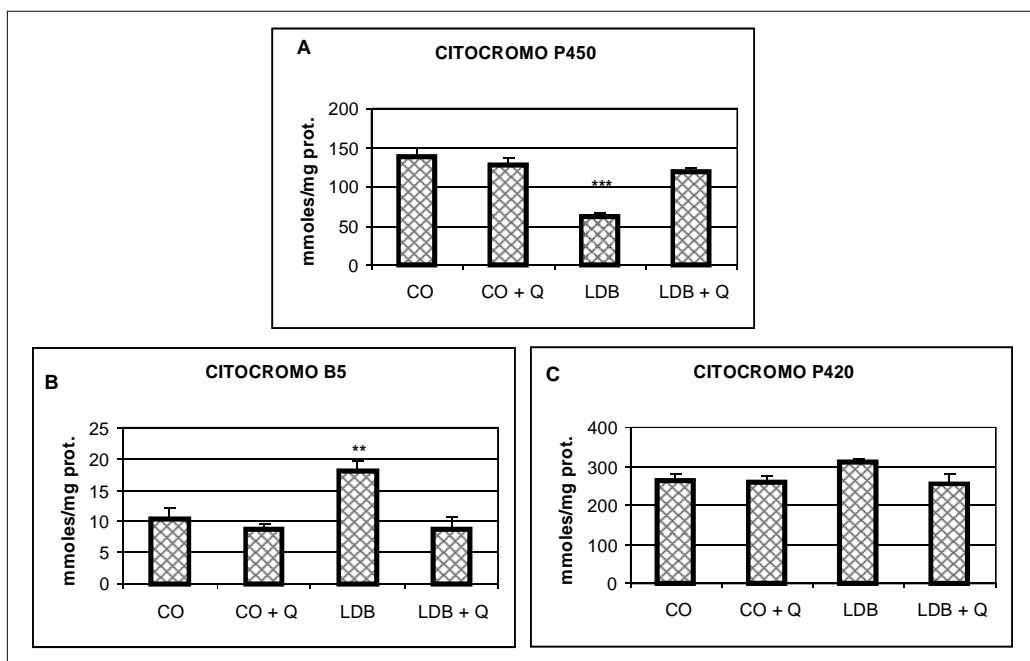
traram que a ação da quercetina a longo prazo, após 14 dias da LDB, mostrou poder antioxidante do flavonóide sobre o parênquima hepático, maior do que se iniciado 24 horas após a cirurgia. Discute-se a eficácia quando já está instalada a cirrose.

MATOS, em 1999, observou que a administração dos flavonóides rutina e quercetina previne parcialmente a diminuição da concentração hepática do citocromo P450 e a redução da fluidez da membrana microsomal induzida pela obstru-

ção do ducto biliar.

No nosso modelo experimental, a atividade do citocromo b5 aumentou significativamente no grupo LDB em relação aos demais, e, com a administração da quercetina, sua concentração tornou-se semelhante à do grupo controle, (Figura 2B).

A forma inativa do P450, o P420, apresenta tendência de aumento no grupo LDB, porém estes valores não são significativos, (Figura 2C).



**Figura 2** - Atividade dos principais componentes do sistema microsomal hepático em ratos. (A) Citocromo P450, (B) Citocromo b5 e (C) Citocromo P420 em suspensões microsomais 1mg/ml reduzidas. Os citocromos foram identificados segundo o método de OMURA & SATO (1964a). Onde (\*\*\*) diferença significativa LDB em relação aos demais grupos, com  $p < 0,001$  e (\*\*) diferença significativa do grupo LDB em relação aos demais grupos, com  $p < 0,01$ .

## CONCLUSÃO

Pela análise espectral do sistema citocromo P450, houve diminuição acentuada da concen-

tração do P450 na cirrose biliar secundária, a administração da quercetina nesses animais possibilitou o aumento da concentração do citocromo P450.



A cirrose biliar secundária pode estar causando a destruição da membrana do hepatócito e, conseqüentemente, a inativação do sistema P450, cuja atividade é dependente da organização dos fosfolipídios do meio, indicando que ocorreu lesão. Com a administração da quercetina, que possui ação de "Scavenger" de radicais livres, provavelmente ocorreu reestruturação da membrana celular, possibilitando a normalização da atividade do citocromo P450.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 3.ed. New York & London: Garland Publishing, Inc., 1994.

BERNHARDT, R. Cytochrome P450: structure, function and generation of reactive oxygen species. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v.127, p.138-221, 1995.

BLACK, S. D. Membrane topology of mamalian P450 cytochromes. **FASEB Journal**, v.6, p.680-685, 1992.

COON, M. J. et al. Cytochrome P450: progress and prediction. **FASEB Journal**, v.6, p.669-673, 1992.

DE PIERRE, J. W.; ERNSTER, L. Enzyme topology of intracellular membranes. **Annual Review of Biochemistry**, v.46, p.201-262, 1977.

FALLON, M.B. et al. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary

syndrome. **American Journal of Physiology**, v.272, p.G779-G784, 1997.

FAROMBI, E. O. Influence of amodiaquine treatment on microsomal lipid peroxidation and antioxidant defenses systems of rats. **Pharmacology and Toxicology**, v.87, p.249-254, 2000.

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, p.1061-1080. 1995

GARDA, H. A.; BRENNER, R. R. Short-chain aliphatic alcohols increase rat-liver microsomal membrane fluidity and affect the activities of some microsomal membrane bound enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.769, p.160-170, 1984.

GOLDIN, J.R.; RAYMUNDO, M.M. **Pesquisa em saúde e direito dos animais**. 2. ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.

GONZALEZ-GALLEGO, J.; ESTELLER, A. El hígado. Fisiopatología de las hepatopatias. In: ESTELLER, A.; CORDERO, M. **Fundamentos de fisiopatología**. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana, 1998.

GUENGERICH, F. P.; BELL, L. C.; OKAZAKI, O. Interpretation of cytochrome P450 mechanisms from kinetics studies. **Biochimie**, v.77, p.573-580, 1995.

GUENGERICH, F.P. et al. Twenty years of biochemistry of human P450. Purification, expression, mechanism and relevance to drug. **Drug Metabolism and Disposition**, v.26, p.1175-1178, 1998.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.

Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.50, p.63-71, 1996.

HIRD, H. J.; MCLEAN, E. J. T.; MUNRO, H. N. Incorporation of amino acids by the protein of the post-microsomal fraction of rat liver. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.87, p.219-231, 1964.

IYER, K. R.; SINZ, M. W. Characterization of phase I and phase II hepatic drug metabolism activities in a panel of human liver preparation. **Chemico-Biological Interactions**, v.118, p.151-169, 1999.

KAMINSKY, L.S.; GUENGERICH, F.P. Cytochrome P450 isozyme functional interactions and NADPH- cytochrome P450 reductase concentrations as factors in microsomal metabolism of warfarin. **European Journal of Biochemistry**, v.149, p.479-478, 1985.

KOBYLAKOV, V. A. Inducers of the cytochrome P450 superfamily as promoters of carcinogenesis. **Biochemistry**, v.63, p.885-898, 1998.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

MANSUY, D. The great diversity of reaction catalysed by cytochrome P450. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.121, p.C5-14, 1998.

MATOS, S. M. H. Efecto de los flavonoides rutina y quercitina sobre las alteraciones del metabolismo oxidativo hepático inducidas por la obstrucción biliar. 1999.

Tese (Doutorado) - Departamento de Fisiologia, Universidade de León, León, 1999.

MILTERSTAINER, A. et al. Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, p.232-237, 2003.

NEBERT, D. W.; GONZALEZ, F. J. P450 genes, structure, evolution and regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v.56, p.945-993, 1987.

OMURA, T. Forty years of cytochrome P450. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.266, p.690-698, 1999.

OMURA, T.; SATO, R. The Carbon Monoxide-binding pigment of liver microsomes. I - Evidence for its heme protein nature. **Journal of Biological Chemistry**, v.239, p.2370-2378, 1964.

OMURA, T.; SATO, R. The carbon Monoxide-binding pigment of liver microsomes. II - Solubilization, purification and properties. **Journal of Biological Chemistry**, v.239, p.2379-2385, 1964.

PAVANATO, A. et al. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. **Digestive and Diseases and Sciences**, v.48, p.824-829, 2003.

PERES, W. et al. Protective effect quercetin on liver of biliary-obstructed rats. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.34, p.197, 1998.

PETERSON, J. A.; PROUGH, R. A. Cytochrome P450 reductase and Cytochrome b5 in Cytochrome P450 catalysis. In: MONTILLANO, Paul R. Ortiz de (Ed.).

**Cytochrome P450, structure, mechanism and biochemistry.** New York/London: Plenum Press,1986. p.86-109.

RHODEN, E.L. et al. O Estresse Oxidativo na Cirrose Hepática Induzida por Tetracloreto de Carbono em Ratos. **GED**, v.16, n.2, 1998.

SILVA, A.O.; D'ALBUQUERQUE, L.C. **Hepatologia clínica e cirúrgica.** São Paulo: Sarvier, 1986.

TASI, L. Y. et al. Change of lipid level in blood and liver tissue of patients with obstructive jaundice. **Clinica Chimica Acta**, v.215, p.41-50, 1993.

TIEPPO, J. et el. Ligadura de ducto biliar como modelo de estudo da Síndrome Hepatopulmonar e Estresse Oxidativo. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.42, p.244-247, 2005.

TIMBRELL, J. **Principles of biochemical toxicology.** 3.ed. London: Taylor & Francis, 2000. 394p.

VROLIJK, N.H. et al. Toxicological and ecological implication of biotransformation enzymes in tropical teleost *Chaetodon capistratus*. **Marine Biology**, v.119, p.151-158, 1994.

YAARI, A. et al. Bromosulfophthalein disposition in chronically bile duct obstructed rats. **Journal of Hepatology**, v.15, p.67-72, 1992.