

Ascorbic acid supplementation has a cytoprotective effect on secondary biliary cirrhosis: experimental study in young rats

Suplementação com ácido ascórbico tem efeito citoprotetor na cirrose biliar secundária: estudo experimental em ratos jovens

Cynthia R. Matos Silva Passoni¹, Cláudio Antônio Rabello Coelho²

Resumo

Objetivo: Testar se a suplementação com ácido ascórbico tem algum efeito citoprotetor em um modelo de cirrose biliar secundária em ratos jovens.

Métodos: Foram estudados 40 ratos Wistar desmamados no 21º dia pós-natal. Cada grupo de 10 foi submetido a um dos seguintes quatro tratamentos, até o 49º dia pós-natal, quando foram submetidos a eutanásia: 1) LC - ligadura dupla e ressecção do ducto biliar comum e administração diária de ácido ascórbico [100 mg/g de peso corporal (pc)]; 2) LA - ligadura dupla e ressecção do ducto biliar comum e administração diária de veículo aquoso (1 mL/g pc); 3) SC - operação simulada e administração diária de ácido ascórbico (100 mg/g pc); 4) SA - ligadura dupla e ressecção do ducto biliar comum e administração diária de veículo aquoso (1 mL/g pc). Os ratos eram pesados diariamente. No 27º dia pós-operatório, eles receberam injeção intraperitoneal de 1,5 mg/g pc de pentobarbital sódico, e o tempo de sono induzido pelo pentobarbital foi medido. Coletou-se sangue para determinação de atividade sérica de alanina aminotransferase e de aspartato aminotransferase, níveis de albumina e globulina séricas, e o fígado foi analisado quanto à conteúdo de água e gordura. Os dados foram submetidos à ANOVA *two-way*, e comparações pareadas entre grupos foram testadas com o método de SNK. O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

Resultados: A suplementação com ácido ascórbico atenuou os efeitos da colestase: reduziu o tempo de anestesia pelo pentobarbital, globulina sérica e o conteúdo de gordura no fígado.

Conclusões: Nossos resultados corroboram a hipótese de que a suplementação com ácido ascórbico tem um efeito citoprotetor na cirrose biliar secundária.

J Pediatr (Rio J). 2008;84(6):522-528: Cirrose hepática biliar, atresia biliar, ácido ascórbico, colestase extra-hepática.

Abstract

Objective: To test whether ascorbic acid supplementation has any cytoprotective effect on a model of secondary biliary cirrhosis in young rats.

Methods: We studied 40 Wistar rats weaned at the 21st postnatal day. Each group of 10 was subjected to one of the following four treatments, until 49th postnatal day, when they suffered euthanasia: 1) LC-double ligature and resection of the common bile duct and daily administration of ascorbic acid [100 mg/g of body weight (bw)]; 2) LA-double ligature and resection of the common bile duct and daily administration of aqueous vehicle (1 mL/g bw); 3) SC-sham operation and daily administration of ascorbic acid (100 mg/g bw); 4) SA-double ligature and resection of the common bile duct and daily administration of aqueous vehicle (1 mL/g bw). The rats were weighed daily. On the 27th day after the operation they received an intra-peritoneal injection of 1.5 mg/g bw of sodium pentobarbital, and the pentobarbital sleeping time was measured. Blood was collected for serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activity measurements, serum albumin and globulin concentrations, and the liver was assessed for liver water and fat content. Data were submitted to two-way ANOVA and paired comparisons between groups were tested using the SNK method. Significance level was set at 0.05.

Results: Ascorbic acid supplementation attenuated the effects of cholestasis: decreased the pentobarbital sleeping time, serum globulin, and the liver fat content.

Conclusions: Our results corroborate the hypothesis that ascorbic acid supplementation has a cytoprotective effect in secondary biliary cirrhosis.

J Pediatr (Rio J). 2008;84(6):522-528: Biliary liver cirrhosis, biliary atresia, ascorbic acid, extra-hepatic cholestasis.

1. PhD. Department of Clinical Medicine, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP.

2. PhD. Assistant professor and head, Infant Hepatology Discipline, Pediatrics Department, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, SP.

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Como citar este artigo: Passoni, CR, Coelho, CA. Ascorbic acid supplementation has a cytoprotective effect on secondary biliary cirrhosis: experimental study in young rats. *J Pediatr (Rio J)*. 2008;84(6):522-528.

Artigo submetido em 10.06.08, aceito em 01.10.08.

doi:10.2223/JPED.1848

Introdução

O grande interesse que a síndrome colestática tem despertado deve-se à freqüente incidência, tanto na prática clínica com crianças quanto na com adultos, e em razão da ampla variedade de causas identificadas até o presente momento¹⁻³. Em recém-nascidos e bebês, a incidência atinge 1 em 500 nascidos vivos⁴. Algumas doenças que causam colestase em recém-nascidos e bebês evoluem para doença hepática crônica com cirrose biliar, mais rapidamente do que as doenças colestáticas em adultos⁵. A atresia biliar é a causa mais importante de colestase nos primeiros 4 meses de vida, uma vez que sempre evolui para óbito se não tratada e é a principal indicação de transplante hepático na infância^{3,6}. A ligadura e ressecção do ducto biliar comum em ratos adultos foi usada como modelo para colestase obstrutiva e cirrose biliar secundária. A execução desses procedimentos em ratos jovens oferece um modelo mais próximo de atresia biliar; o modelo usando ratos adultos sofre interferência de infecções bacterianas secundárias⁷⁻⁹. O modelo de ratos jovens foi aplicado por poucos autores^{2,10}, além dos membros de nosso grupo (Grupo de Pesquisa em Hepatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu).

O estresse oxidativo é um mecanismo intermediário na produção de lesões hepáticas da colestase^{11,12}. Considerando que a colestase leva à má absorção de vitaminas lipossolúveis, duas das quais (vitamina A e E) apresentam ação antioxidante, essa má absorção agrava o estresse oxidativo e, portanto, aumenta as lesões hepáticas¹³. Também devemos considerar que o ácido ascórbico tem importantes funções fisiológicas, como a ação antioxidante e sobre o citocromo P450, e que o ácido ascórbico é hidrossolúvel^{14,15} e facilmente absorvível na colestase¹⁶. Propusemo-nos a estudar um possível efeito hepatoprotetor da suplementação de ácido ascórbico no modelo de cirrose biliar por ligadura e ressecção do ducto biliar comum (LRDBC) em ratos jovens.

Métodos

Delimitação experimental

Para testar a hipótese principal, formulamos hipóteses auxiliares:

- Primeira hipótese: a colestase influi sobre a lesão hepática, independentemente da administração de ácido ascórbico;
- Segunda hipótese: o ácido ascórbico influi sobre a lesão hepática, independentemente da presença de colestase;
- Terceira hipótese: o ácido ascórbico interfere nos efeitos da colestase sobre a lesão hepática.

Para testar essas hipóteses, as seguintes variáveis foram consideradas:

- Variáveis independentes: presença ou não de colestase obstrutiva (LRDBC ou operação simulada) e administração ou não-administração de ácido ascórbico (ácido ascórbico ou veículo aquoso).

- Variáveis dependentes: conseqüências mensuráveis de lesão hepática, a saber: atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST, UI/L); atividade de alanina aminotransferase (ALT, UI/L); concentração sérica de albumina (g/dL); concentração sérica de globulina (g/dL); teste do tempo de sono com pentobarbital - TSP (minutos); peso fresco do fígado (g); conteúdo de água no fígado (g/100 g); e conteúdo de gordura no fígado (g/100 g).

Grupos experimentais

Foram estudados 40 ratos machos Wistar, criados no Laboratório Experimental do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu. No 21º dia pós-natal (P21), foram selecionados os ratos com peso entre 45 e 48 g e aleatoriamente alocados em um dos quatro grupos de 10 animais, cada grupo sendo submetido a um dos tratamentos descritos abaixo:

Grupo LC: LRDBC no P21 e eutanásia no 49º dia pós-natal (P49). Administração diária por gavagem de 1 mL/g de peso corporal de solução aquosa de ácido ascórbico em uma concentração de 200 mg/mL (Roche®).

Grupo LA: LRDBC no P21 e eutanásia no P49. Administração diária de veículo aquoso, por gavagem, a um volume de 1 mL/g de peso corporal.

Grupo SC: operação simulada no P21 e eutanásia no P49. Administração diária por gavagem de uma solução aquosa de ácido ascórbico (Roche®), no mesmo volume estipulado para os grupos anteriores.

Grupo SA: operação simulada no P21 e eutanásia no P49. Administração diária de uma solução aquosa de veículo aquoso, por gavagem, no mesmo volume estipulado para os grupos anteriores.

Execução do experimento

O procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA), Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, número de protocolo 148, de acordo com os Princípios Éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os procedimentos de manutenção, anestesia, cirurgia e eutanásia dos animais foram 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*¹⁷.

Os procedimentos de LRDBC foram realizados de acordo com a técnica descrita anteriormente por Cameron & Oakley⁷, adaptada por Battochio et al.¹⁸. Na operação simulada, foram realizadas incisão abdominal, exposição e dissecação do ducto biliar. O fio de sutura foi passado em torno do ducto biliar sem proceder com a ligadura. O fechamento cirúrgico foi realizado da mesma forma que a operação de ligadura.

Testes laboratoriais prévios confirmaram que este procedimento causa fibrose hepática e proliferação ductal no mesmo padrão descrito por Cameron & Oakley⁷.

Eutanásia

A eutanásia foi realizada no P49, ou seja, 28 dias após os procedimentos de LRDBC e operação simulada. Os ratos foram anestesiados com pentobarbital na dose de 0,0017 mg/g de peso corporal e, após incisão abdominal, coletou-se sangue por punção cardíaca para teste sérico bioquímico. Após a eutanásia, o fígado foi pesado para cálculo posterior de conteúdo hídrico e lipídico.

Observações durante o experimento

No 48º dia pós-natal (P48), todos os ratos foram submetidos a TSP. Eles receberam injeção intraperitoneal com 0,0015 mg de pentobarbital por grama de peso corporal, e o tempo durante o qual o reflexo de colocação permaneceu abolido foi medido. O TSP depende da função de desintoxicação do fígado.

Estudos realizados após a eutanásia

A atividade sérica de AST e ALT foi determinada pelo método otimizado de absorção de raios ultravioletas (UV) e expressa em unidades internacionais (UI). As dosagens séricas de albumina e globulina total foram determinadas pelo método colorimétrico e expressas em gramas/decilitros (g/dL). O peso fresco do fígado foi aferido em uma balança analítica Mettler (modelo H35, peso máximo = 160 g), e os valores foram expressos em gramas.

O conteúdo de água no fígado foi determinado pelo método gravimétrico. Um fragmento do fígado foi pesado em uma balança analítica Mettler, desidratado em um aquecedor a 100 °C por 72 horas e novamente pesado; o conteúdo de água foi calculado em g/100 g de fígado fresco. Para determinar o conteúdo de gordura no fígado, após a secagem, o fígado foi macerado em graal, enrolado em papel-toalha, e a gordura foi extraída por éter etílico, por um período de 12 horas, em um extrator Soxhlet. O éter etílico foi evaporado a temperatura ambiente por 24 horas, seco em um aquecedor a 100 °C por 12 horas e pesado novamente. A partir da diferença de peso, o conteúdo de gordura no fígado foi calculado em g/100 g de fígado úmido.

Análise estatística

Os cálculos foram realizados com os programas Microsoft Excel® e Sigma Stat versão 2.0®.

Estatística descritiva: foram calculadas medidas de tendência central (médias e medianas) e medidas de dispersão (desvio padrão, coeficiente de variação, variação de amplitude, valores mínimos e máximos) das variáveis de cada grupo experimental.

Estatística comparativa: 1) Os resultados de cada variável para cada grupo experimental foram submetidos a teste de amostras para normalidade e igualdade de variâncias. 2) Se essas condições eram satisfeitas, aplicava-se a análise de variância para dois fatores: o primeiro fator, administração ou não-administração de ácido ascórbico, analisado para dois níveis: administração de ácido ascórbico e administração de veículo aquoso; o segundo fator, presença ou ausência de

colestase, analisada para dois níveis: LRDBC (colestase) e operação simulada (ausência de colestase). Este teste analisou os efeitos associados a cada fator nas variáveis dependentes, independentemente do efeito da outra, bem como a interação dos dois fatores. 3) Quando havia interação significativa entre esses fatores ($p \leq 0,05$), realizavam-se comparações múltiplas entre pares através do método de Student-Newman-Keuls (SNK), identificando os grupos que apresentavam diferenças significativas entre si (p de $\alpha \leq 0,05$). 4) Quando as amostras atendiam aos critérios do item 1, seus valores eram substituídos pela ordem de classificação desses valores - para satisfazer aos critérios de normalidade e igualdade de variâncias.

Resultados

A colestase significativamente aumentou o TSP ($p \leq 0,001$), e o ácido ascórbico interferiu atenuando este efeito ($p \leq 0,001$).

A colestase significativamente aumentou o nível sérico de AST, independentemente do efeito do ácido ascórbico ($p \leq 0,001$), e o ácido ascórbico não interferiu no efeito da colestase ($p \geq 0,873$).

A colestase significativamente aumentou o nível sérico de ALT, independentemente do efeito do ácido ascórbico ($p \leq 0,001$), e o ácido ascórbico não interferiu no efeito da colestase ($p \geq 0,126$).

Em relação ao peso fresco do fígado, não houve diferença significativa entre os grupos LRDBC e operação simulada ($p \geq 0,355$), nem no efeito do ácido ascórbico ($p \geq 0,001$).

A colestase significativamente aumentou o conteúdo de água no fígado, independentemente do efeito do ácido ascórbico ($p \leq 0,001$), e o ácido ascórbico não interferiu no efeito da colestase ($p \geq 0,517$).

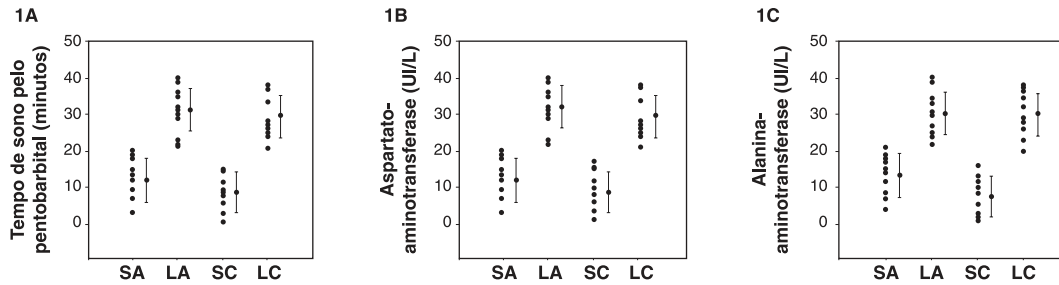
A colestase significativamente aumentou o conteúdo de gordura no fígado, independentemente do efeito do ácido ascórbico ($p \leq 0,001$), e o ácido ascórbico interferiu no efeito da colestase ($p = 0,006$).

A colestase significativamente reduziu os níveis séricos de albumina, independentemente do efeito do ácido ascórbico ($p \leq 0,001$), e o ácido ascórbico não interferiu no efeito da colestase ($p \geq 0,476$).

A colestase significativamente aumentou os níveis séricos de globulina, independentemente do efeito do ácido ascórbico ($p \leq 0,001$), e o ácido ascórbico interferiu atenuando este efeito ($p \leq 0,012$).

Discussão

A colestase prolongou o TSP, o ácido ascórbico atenuou em parte este efeito da colestase (Figura 1 e Tabela 1). O TSP tem sido usado para avaliar a eficiência funcional das células hepáticas em muitos modelos experimentais, incluindo doença colestatática do fígado e lesões hepáticas por outros mecanismos¹⁹⁻²¹. Uma deficiência em ácido ascórbico pode



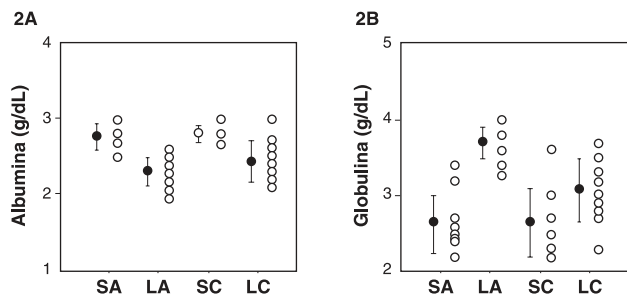
LA = ligadura e ressecção do ducto biliar comum com veículo aquoso; LC = ligadura e ressecção do ducto biliar comum com ácido ascórbico; SA = operação simulada com veículo aquoso; SC = operação simulada com ácido ascórbico.

Figura 1 - Médias, desvios padrão e valores individuais: tempo de sono pelo pentobarbital (1A), aspartato aminotransferase (1B) e alanina aminotransferase (1C)

Tabela 1 - Médias, medianas e desvios padrão das variáveis de cada grupo experimental

Variável	SA	SC	LA	LC
Tempo de anestesia pelo pentobarbital (minutos) - ordem de classificação				
Média (DP)	87 (17,55)	93,8 (14,42)	221,7 (30,77)	137,33 (28,05)
Mediana	88	95	212,5	137,66
Nível sérico de aspartato aminotransferase (UI/L)				
Média (DP)	50,7 (10,14)	45,6 (4,69)	250,26 (54,44)	231,44 (41,40)
Mediana	47,5	45,5	246	226,22
Nível sérico de alanina aminotransferase (UI/L)				
Média (DP)	53,6 (10,42)	42,6 (8,27)	120,2 (28,03)	116,11 (25,75)
Mediana	53	42	119,5	121,55
Peso do fígado (g) - ordem de classificação				
Média (DP)	8,25 (1,19)	8,69 (1,25)	8,93 (2,13)	9,19 (2,88)
Mediana	8,29	8,67	8,31	9,89
Conteúdo hídrico hepático (g/100 g) - ordem de classificação				
Média (DP)	71,44 (1,27)	71,73 (0,84)	76,47 (2,83)	75,476 (3,57)
Mediana	71,61	71,64	76,23	76,442
Conteúdo lipídico hepático (g/100 g) - ordem de classificação				
Média (DP)	1,05 (0,54)	1,09 (0,28)	6,61 (5,74)	1,01 (0,59)
Mediana	0,98	1,04	3,78	1,02
Nível sérico de albumina (g/dL)				
Média (DP)	2,76 (0,17)	2,8 (0,115)	2,3 (0,19)	2,43 (0,27)
Mediana	2,8	2,8	2,25	2,36
Nível sérico de globulina (g/dL)				
Média (DP)	2,510	2,350	3,550	3,156
Mediana	2,400	2,200	3,700	3,178

DP = desvio padrão; LA = ligadura e ressecção do ducto biliar comum com veículo; LC = ligadura e ressecção do ducto biliar comum com ácido ascórbico; SA = operação simulada com veículo aquoso; SC = operação simulada com ácido ascórbico.



LA = ligadura e ressecção do ducto biliar comum com veículo aquoso; LC = ligadura e ressecção do ducto biliar comum com ácido ascórbico; SA = operação simulada com veículo aquoso; SC = operação simulada com ácido ascórbico.

Figura 2 - Médias, desvio padrão e valores individuais: albumina (2A) e globulina (2B)

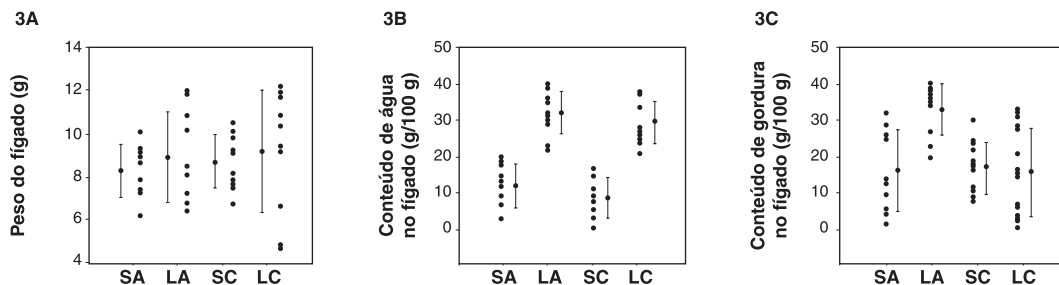


Figura 3 - Médias, desvios padrão e valores individuais: peso do fígado (3A), conteúdo de água no fígado (3B) e conteúdo de gordura no fígado (3C)

levar a uma redução hepática do citocromo P450 e, portanto, afetar a atividade hepática da metabolização enzimática de drogas¹⁴. A lesão hepatocítica na colestase induzida pela ligadura do ducto biliar pode levar a uma redução das isoenzimas do citocromo P450²². Os resultados mostrados aqui sugerem que a suplementação com ácido ascórbico estimula o citocromo P450 ou mantém sua função por proteção dos hepatócitos.

A colestase aumentou os níveis séricos de AST e ALT, independentemente do efeito do ácido ascórbico, e o ácido ascórbico não interferiu neste efeito da colestase. Portanto, provavelmente não houve efeito sobre a velocidade de necrose hepatocítica (Figura 1 e Tabela 1).

A colestase significativamente reduziu os níveis séricos de albumina, independentemente do efeito do ácido ascórbico, e o ácido ascórbico não interferiu neste efeito da colestase (Figura 2 e Tabela 1). Logo, o ácido ascórbico não parece interferir nos mecanismos de hipoalbuminemia na colestase: aumento de permeabilidade capilar; aumento de volume plasmático; falta de síntese de albumina compensatória; redução de massa hepática ou falta de elementos para síntese de albumina, resultante de desnutrição secundária devido à má absorção presente na colestase¹⁹.

A colestase aumentou os níveis séricos de globulina (independentemente do efeito do ácido ascórbico), e o ácido ascórbico atenuou este efeito (Figura 2 e Tabela 1). É provável que esse efeito ocorra sobre as imunoglobulinas, que são parte das globulinas. Keraan et al.²³ demonstraram que, em ratos com anastomose porto-cava, ocorre um aumento de globulinas às custas de imunoglobulinas. É provável que esse aumento seja causado pela passagem de endotoxinas diretamente à circulação sistêmica devido a um aumento da resistência de circulação portal intra-hepática, desviando-as do fígado e, portanto, reduzindo a depuração de antígenos e imunocomplexos pelo fígado. Este aumento em antígenos na circulação hepática aumentaria a produção de imunoglobulinas pelos linfócitos B do sistema imunológico periférico²⁴. Outros antígenos possíveis são liberados pela destruição de hepatócitos^{25,26}. O ácido ascórbico poderia interferir com um ou mais desses fatores que causam hiperglobulinemia.

Não foi possível demonstrar o efeito da colestase nem do ácido ascórbico no peso fresco do fígado (Figura 3 e Tabela 1); a hiperplasia ductal e a fibrose podem compensar a redução de hepatócitos na fase na qual esses ratos foram estudados.

A colestase aumentou o conteúdo de água no fígado, independentemente do efeito do ácido ascórbico, um fato que

poderia refletir um aumento hídrico intracelular (Figura 3 e Tabela 1). De acordo com Takahashi²⁷, a colestase experimental em ratos causa: disfunção da mitocôndria; capacidade reduzida de fosforilação; produção reduzida de ATP; danos funcionais de ATPase dependente de Na⁺ and K⁺, e aumento de conteúdo hídrico de hepatócitos. O ácido ascórbico não interferiu neste efeito da colestase.

A colestase aumentou o conteúdo de gordura no fígado (Figura 3 e Tabela 1), possivelmente devido à deficiência no transporte de lipídeos. Com a redução de apolipoproteína A1, em função da presença de colestase, podem ocorrer catabolismo anormal e redução de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL)²⁸. A liberação de triglicérides VLDL através da atividade de lipase lipoprotéica é afetada de tal forma que os ácidos graxos dos triglicérides não são transportados adequadamente para as células adiposas², portanto ocorre acúmulo de gordura no fígado.

O ácido ascórbico atenuou este efeito colestático. Alguns estudos relacionam o ácido ascórbico com os níveis séricos de apolipoproteína A1²⁹. 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 lipoprotéica, normalizando o transporte de triglicérides para os tecidos e reduzindo a porcentagem de gordura no fígado.

Conclusões

Estudando o modelo experimental de cirrose biliar secundária em ratos jovens, observamos que o ácido ascórbico parece apresentar os seguintes efeitos benéficos na cirrose biliar secundária: efeito hepatoprotetor, uma vez que estimula a função de desintoxicação do fígado, conforme mostrado por seu efeito sobre o teste de tempo de sono induzido pelo pentobarbital; atenua a hiperglobulinemia resultante da colestase e atenua o depósito de gordura hepática causado pela colestase. O efeito hepatoprotetor não foi corroborado pelo estudo de aminotransferases.

A suplementação com ácido ascórbico pode ter uso significativo no tratamento de crianças com doença hepática crônica colestática.

Referências

- Schneider AC, Pinto RB, Silveira TR. [Nutritional risk and malnutrition determination by anthropometry in cirrhotic children and adolescents](#). Arq Gastroenterol. 2007;44:345-9.
- Jaundice due to bacterial infection. Gastroenterology. 1979; 77:362-74.
- de Carvalho E, Ivantes CA, Bezerra JA. [Extrahepatic biliary atresia: current concepts and future directions](#). J Pediatr (Rio J). 2007;83:105-20.
- Mowat AP. Anormalias inatas do metabolismo que cursam com disfunção hepática ou com hepatomegalia. In: Mowat AP. Doenças hepáticas em pediatria. Rio de Janeiro: Revinter; 1991. p.186-234.
- Burdelski M. [Current concepts in diagnosis and therapy of pediatric liver diseases](#). J Hepatol. 1995;23 Suppl 1:45-8.
- Cauduro SM. Atresia biliar extra-hepática: métodos diagnósticos. J Pediatr (Rio J). 2003;79:107-14.
- Cameron GR, Oakley CL. Ligation of the common bile duct. J Pathol Bacteriol. 1932;35:769-99.
- Parola M, Leonarduzzi G, Robino G, Albano E, Poli G, Dianzani MU. [On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis](#). Free Radic Biol Med. 1996;20:351-9.
- Lechner AJ, Velasquez A, Knudsen KR, Johanns CA, Tracy TF Jr, Matuschak GM. [Cholestatic liver injury increases circulating TNF-alpha and IL-6 and mortality after Escherichia coli endotoxemia](#). Am J Respir Crit Care Med. 1998;157 (5 Pt 1):1550-8.
- Weisdorf SA, Hamel N, Pierpont ME, Bowers LD, Cerra FB. Increased dietary branched-chain amino acids do not improve growth in developing rats with chronic biliary obstruction. J Nutr. 1991;121:1447-53.
- Krähenbühl S, Talos C, Lauterburg BH, Reichen J. [Reduced antioxidative capacity in liver mitochondria from bile duct ligated rats](#). Hepatology. 1995;22:607-12.
- Sokol RJ, Devereaux M, Khandwala R, O'Brein K. [Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes](#). Hepatology. 1993;17:869-81.
- Adachi Y, Arii S, Sasaoki T, Funaki N, Higashitsuji H, Fujita S, et al. [Hepatic macrophage malfunction in rats with obstructive jaundice and its biological significance](#). J Hepatol. 1992; 16:171-6.
- Zannoni VG, Holsztyńska EJ, Lau SS. Biochemical functions of ascorbic acid in drug metabolism. In: Seib PA, Tolbert B, editors. Ascorbic acid: chemistry, metabolism and uses. Washington, DC: American Chemical Society; 1982. p. 349-68.
- Gropper SA, Smith JL, Groff JL. The water-soluble vitamins. In: Gropper SA, Smith JL, Groff JL, editors. Advanced nutrition and human metabolism. 4th ed. Belmont, CA: Thomson Wadsworth; 2004. p. 263-71.
- Mahan LK, Arlin MT. Vitaminas. In: Mahan LK, Arlin MT, editores. Alimentos, nutrição e dietoterapia. São Paulo: Roca; 2002. p. 71-103.
- Canadian Council on Animal Care. Guide do the care and use of experimental animals. Ottawa, ON: CCAC; 1980-1984.
- Battochio AP, Santos AG, Silva CR, Rocha AS, Coelho CA. Adaptation of experimental model of extra-hepatic cholestasis in young rats. Acta Cir Bras. 2004;19:70-3.
- Krähenbühl S, Marti U, Grant I, Garlick PJ, Ballmer PE. [Characterization of mechanisms causing hypoalbuminemia in rats with long-term bile duct ligation](#). J Hepatol. 1995;23:79-86.
- Gilani AH, Janbaz KH, Shah BH. [Esculetin prevents liver damage induced by paracetamol and CCL4](#). Pharmacol Res. 1998; 37:31-5.
- Montalto de Mecca M, Bernacchi AS, Castro JA. [Prevention of benznidazole-induced prolonging effect on the pentobarbital sleeping time of rats using different thiol containing compounds](#). Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 2001;108:39-48.
- Tateishi T, Watanabe M, Nakura H, Tanaka M, Kumai T, Kobayashi S. [Liver damage induced by bile duct ligation affects CYP isoenzymes differently in rats](#). Pharmacol Toxicol. 1998; 82:89-92.

23. Keraan M, Meyers OL, Engelbrecht GH, Hickman R, Saunders SJ, Terblanche J. [Increased serum immunoglobulin levels following portacaval shunt in the normal rat.](#) *Gut.* 1974; 15:468-72.
24. Triger DR, Wright R. [Hyperglobulinaemia in liver disease.](#) *Lancet.* 1973;1:1494-6.
25. Batres LA, Maller ES. Laboratory assessment of liver function and injury in children. In: Suchy FJ, Sokol RJ, Balistreri WF, editors. *Liver disease in children.* Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p.155-69.
26. Stolz A. Liver physiology and metabolic function. In: Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH, editors. *Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management.* 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2002. p. 1202-26.

27. Takahashi T. [The effects of thromboxane A2 synthetase inhibitor \(OKY-046\) on complete hepatic ischemia in rats with obstructive jaundice.](#) *Surg Today.* 1996;26:15-20.
28. Iglesias A, Arranz M, Alvarez JJ, Perales J, Villar J, Herrera E, et al. [Cholesteryl ester transfer activity in liver disease and cholestasis, and its relation with fatty acid composition of lipoprotein lipids.](#) *Clin Chim Acta.* 1996;248:157-74.
29. Okamoto K. [Vitamin C intake and apolipoproteins in a healthy elderly Japanese population.](#) *Prev Med.* 2002;34:364-9.

Correspondência:

Cynthia R. Matos Silva Passoni
Rua Desembargador Otávio do Amaral, 1958, casa 10
CEP 80710-620 – Curitiba, PR
E-mail: cypassoni@uol.com.br