

Camila Oliveira de Souza

Efeitos da silibinina sobre modelo de pré-eclâmpsia induzida em ratas por tratamento com N^ω-Nitro-L-arginina metil ester

Orientador: José Carlos Peraçoli

Co-orientadora: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para obtenção do título de Mestre.

Botucatu - SP
2009

Trabalho desenvolvido no laboratório de Pesquisa Experimental do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e no laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu – UNESP, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - processos no. 2006/07095-3 e no. 2007/01662-6.

*“Desejos não resistem às dificuldades da vida, sonhos são
projetos de vida, sobrevivem ao caos”.
(Augusto Cury)*

Dedicatórias



Dedicatória

A Deus...

Por iluminar meus caminhos, minha vida, fazendo-me ver que para
Ele tudo é possível...

“Eu te amo, ó Senhor, força minha, tu és a minha rocha, a minha fortaleza e o meu libertador; o meu Deus, o meu rochedo, em quem me refugio; o meu escudo, a força da minha salvação...”
(Salmos 18)

Aos meus pais, Maria José e Manoel:

Razão do meu existir, devo a vocês tudo que sou hoje; modelos de dedicação e perseverança, sempre me apoiando incondicionalmente, com eles aprendi o verdadeiro significado da palavra ***Amor!***
A vocês, dedico esse trabalho e minha eterna gratidão. Amo vocês
Demais!

“O amor dos pais é o combustível que permite a um ser humano fazer o impossível...”

Agradecimentos Especiais



Agradecimentos Especiais

**Aos meus mestres, Professor Titular *José Carlos Peraçoli* e
Professora Titular *Maria Terezinha Serrão Peraçoli*:**

Dois grandes pesquisadores e seres humanos admiráveis, obrigada pelos ensinamentos, confiança e incansável dedicação. Muito mais que professores, foram amigos durante essa jornada. Serei eternamente grata.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.
([Charles Chaplin](#))

Agradecimientos



Agradecimentos

Aos meus queridos irmãos, Gustavo e Natália, que sempre acreditaram em mim.

Ao meu namorado André, pela sua paciência e amor, por estar sempre disposto a ajudar em qualquer situação, pelo incondicional apoio em todos os momentos: Obrigada por tudo, amo você!

Aos meus familiares, pelo carinho e compreensão.

Aos meus amigos Mariana, Ingrid e Leonardo que trabalharam comigo, acreditando e tornando possível a concretização desse trabalho.

A Professora Doutora Márcia Guimarães pela colaboração, apoio e a disponibilidade para ensinar e transmitir seus conhecimentos.

A Professora Débora Damasceno responsável por despertar meu interesse pela pesquisa experimental, obrigada pela colaboração e ensinamentos.

As amigas, Érica e a Camila, pelo constante auxílio, disponibilidade e acolhimento, muito obrigada.

A Seção de Pós-graduação que sempre estiveram prontos para colaborar e orientarem. Obrigada amigos.

A Secretaria de Pós-graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, pela paciência e auxílio, em especial Ana Cláudia.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia por me receberem e colaborarem durante o desenvolvimento do trabalho, em especial Lula.

Aos meus amigos especiais: Daniel, Lara, Ligia, Ieda, Mariana, Tainara, sem vocês essa caminhada não seria completa. Obrigada pelos momentos compartilhados, amo vocês.

A minha amiga Raquel, que mesmo distante sempre me apoiou e acreditou.

A Priscila, uma pessoa especial, que não me deixou desistir de meus sonhos... Obrigada por tudo!

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pelo apoio financeiro, tornando possível a realização desta dissertação. Portanto, deixo aqui meus sinceros agradecimentos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, fica expressa aqui meu carinho e minha gratidão.

Sumário



Sumário

Capítulo I - Efeito de diferentes concentrações de silibinina na performance reprodutiva e na prole de ratas Wistar.

Resumo.....	14
Abstract.....	15
Introdução.....	16
Material e Métodos.....	18
Resultados.....	21
Discussão e Conclusões.....	24
Referências Bibliográficas.....	25

Capítulo II – Efeito da silibinina sobre modelo de pré-eclâmpsia induzida em ratas por tratamento com Nw-Nitro-L-arginina metil ester.

Resumo.....	29
Abstract.....	31
Introdução.....	33
Material e Métodos.....	37
Resultados.....	43
Discussão.....	53
Referências Bibliográficas.....	61

A close-up photograph of a purple thistle flower with spiky green leaves, serving as the background for the text.

Artigo 1

Efeito de diferentes concentrações de silibinina na performance reprodutiva e na prole de ratas

Wistar

Souza CO, Damasceno DC, Dantas MF, Sinzato Y, Iessi EL, Peraçoli MTS, Peraçoli JC.

Trabalho a ser submetido a Natural Products Research

RESUMO

Introdução: Silibinina é um flavonóide quimicamente definido e o principal componente ativo da silimarina, um complexo polifenólico obtido de frutos e sementes de *Silybum marianum*, que possui propriedades anti-inflamatória, hepatoprotetora e anti-carcinogênica.

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da silibinina sobre a performance reprodutiva de ratas prenhes Wistar e as anomalias e/ou malformações de seus fetos.

Métodos: Foram utilizadas ratas Wistar prenhes estratificadas em quatro grupos experimentais: controle (n = 6), ratas tratadas com 50mg/kg/dia de silibinina (Grupo I, n = 6), ratas tratadas com 100mg/kg/dia de silibinina (Grupo II, n = 6) e ratas tratadas com 200mg/kg/dia de silibinina (Grupo III, n = 6). Os animais receberam tratamento por via oral (gavage). Durante toda a prenhez, o consumo de ração e a ingestão de água, bem como o ganho de peso corporal foram avaliados. No dia 21 de prenhez as ratas foram anestesiadas. A cesárea foi realizada no 21º dia, quando os recém-nascidos foram mortos e processados para análise das variações e/ou malformações.

Resultados: os grupos controle e tratados não apresentaram diferenças significativas em relação aos parâmetros fetais, não se observando sinais de toxicidade materna com as diferentes concentrações de silibinina empregadas.

Conclusão: O tratamento com silibinina não determinou efeitos deletérios na performance reprodutiva das ratas, mesmo quando utilizada em altas doses (200 mg/Kg/dia).

Palavras-chaves: Silibinina, prenhez, performance reprodutiva, malformações.

ABSTRACT

Introduction: Silibinin is a chemically defined flavonoid and the main active component of silymarin, a polyphenolic complex from fruits and seeds of *Silybum marianum*, which has anti-inflammatory, hepatoprotective and anticarcinogenic properties.

Objective: The aim of the present study was to evaluate the dose-dependent effect of silibinin treatment on maternal reproductive performance and on abnormalities and/or fetal malformations.

Methods: Pregnant Wistar rats were distributed in four experimental groups: control, not treated with silibinin (n=6), rats treated with silibinin 50mg/kg/day (Group I, n = 6), rats treated with silibinin 100mg/kg/day (Group II, n = 6) and rats treated with silibinin 200mg/kg/day (Group III, n = 6). Silibinin was administrated by gavage from day 0 to 20 of pregnancy. During the period of pregnancy food and water intake, as well as weight gain were evaluated. On day 21 of pregnancy, the rats were anesthetized and submitted to cesarean section to analyse maternal reproductive performance and fetal malformations.

Results: The control and silibinin-treated groups did not show significant differences in relation to the fetal parameters evaluated and no maternal toxicity effects of silibinin were detected in the concentrations employed.

Conclusion: Silibinin treatment did not determined deleterious effect on the maternal reproductive performance and fetal outcome even when employed in high dose (200 mg/Kg).

Keywords: Silibinin, pregnancy, reproductive performance, malformations.

INTRODUÇÃO

A silimarina é um flavonóide polifenólico extraído de frutos e sementes de *Silybum marianum* L (família Asteraceae), constituída por uma mistura de três isômeros estruturais: *silybin*, *silydianin* e *silychristin*, dos quais, a flavolignina *silybin* é o componente mais ativo (Yao-Cheng, 1991; Valenzuela & Garrido, 1994; Skottová et al; 2004). A silimarina possui efeitos citoprotetores, anti-inflamatórios e anti-carcinogênicos bem documentados, mas os mecanismos envolvidos nesses efeitos não estão esclarecidos e parecem estar relacionados com a supressão do fator de transcrição nuclear NF-kappaB, que regula a expressão de vários genes envolvidos na inflamação, citoproteção e carcinogênese (Manna et al., 1999; Kang et al., 2002).

Segundo Manna et al. (1999), a silimarina protege as membranas dos hepatócitos contra agentes tóxicos, melhorando sua função, tanto em animais como em seres humanos. Yao-Cheng (1991) descreveu a provável ação protetora da silimarina ao observar que a peroxidação lipídica, induzida pela ação de algumas toxinas hepáticas, determina o aparecimento de sintomas clínicos, relacionados à formação de prostaglandinas, e que os três componentes da silimarina podem suprimir a formação dessas prostaglandinas, juntamente com a decomposição dos lipídeos de membrana.

Estudos farmacológicos indicam que a silimarina não é tóxica, mesmo em altas doses, quando utilizada no tratamento de cirrose hepática alcoólica (Ferenci et al., 1989). Em ratos, a silimarina demonstrou potencial benéfico, atuando como agente protetor de diferentes agressões induzidas no parênquima hepático. Assim, é eficaz na recuperação da bomba de liberação do sal biliar (Crocenzi et al., 2005); tem efeito inibidor da glucoronidação, auxiliando no controle da mesma no tratamento de doenças hepáticas (D'Andrea et al., 2005); neutraliza o estresse oxidativo causado pela colestase hepática (Muriel & Moreno, 2004) e exerce efeito protetor hepático contra a intoxicação por chumbo (Shalan et al., 2005). É capaz de prevenir fibrose hepática (Mourelle et al., 1989, Muriel & Mourelle, 1990), porém não consegue reverter-la (Muriel et al., 2005).

Em ratas prenhes, poucos estudos foram realizados. La Grange et al. (1999) demonstraram que a silimarina atravessa a membrana placentária. Em ratas prenhes expostas ao etanol há evidências de seu efeito protetor em órgãos

como o cérebro e fígado fetais, após a administração de diferentes doses de silimarina. Esses efeitos, possivelmente decorrem da neutralização de radicais livres pelos bioflavonóides, que diminui a peroxidação lipídica e aumenta a síntese de proteínas, a qual promove a regeneração e estabilização das membranas celulares (La Grange et al., 1999; Moreland et al., 2002; Neese et al., 2004).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a performance reprodutiva das ratas e a incidência de anomalias fetais e efeitos adversos, após a ingestão materna de diferentes doses de silimarina durante o período de prenhez.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizadas ratas fêmeas Wistar, virgens, pesando em média 220g, e ratos machos da mesma espécie, adultos, pesando em torno de 250g, ambos provenientes do Biotério Central da Unesp – Campus de Botucatu.

2. Planta

Foi utilizado o princípio ativo da planta *Silybum marianum* – Silibinin - da empresa Sigma – Aldrich (Produzido na Argentina, lote no. S0417-10g, fórmula molecular $C_{25}H_{22}O_{10}$).

3. Seqüência experimental

A seqüência experimental foi dividida em quatro períodos: adaptação, acasalamento, prenhez e tratamento.

3.1. Período de adaptação

Os animais foram adaptados ao Laboratório de Pesquisa Experimental Animal do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP durante sete dias. Permaneceram em gaiolas de polietileno, forradas com maravalha, com capacidade máxima de cinco animais, sob condições controladas (temperatura $21\pm 4^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas). Água e ração foram oferecidos “ad libitum”.

3.2. Período de acasalamento

A fase do acasalamento teve duração máxima de 15 dias. As ratas foram distribuídas quatro a quatro em gaiolas de polietileno, com cama de maravalha e colocadas na presença de um rato macho no final da tarde. Na manhã seguinte os machos foram separados das fêmeas, sendo coletados os esfregaços vaginais das ratas. Os fatores indicativos de prenhez foram à presença de espermatozóides e o diagnóstico da fase estro do ciclo estral, sendo este considerado como o dia 0 de prenhez (Damasceno et al., 2002). Em seguida, as ratas prenhes foram identificadas e estratificadas nos diferentes grupos aleatoriamente. Este procedimento foi repetido até que o número desejado de réplicas fosse alcançado.

3.3. Período de prenhez

As ratas prenhes foram mantidas e acompanhadas em gaiolas individuais durante 21 dias. As ratas receberam diariamente (0 ao 20º dia de prenhez) silibinina (diferentes concentrações) ou solução fisiológica e foram pesadas para controle de peso. O consumo de água e de ração foi medido em dias alternados no período da manhã durante toda a prenhez. No 21º dia de prenhez as ratas foram anestesiadas com pentobarbital sódico (Hypnol® a 3%) para exposição dos cornos uterinos e contagem dos pontos de implantação, pontos de reabsorção (morte embrionária), números de fetos vivos e mortos.

Os ovários também foram observados para retirada e contagem de corpos lúteos com auxílio de estereomicroscópio (16/12.5 x 1.25).

Após pesagem dos fetos e respectivas placentas, estes foram analisados quanto às anomalias externas. A seguir, metade do número de fetos de cada ninhada foi submetida à análise de anomalias esqueléticas e a outra metade reservada para análise de anomalias viscerais. Para avaliação de anomalias ósseas os fetos foram viscerados, diafanizados e corados com alizarina (Staples & Schenell, 1964). Para análise de anomalias viscerais os fetos foram colocados em solução de Bodian, para fixação das estruturas viscerais e descalcificação óssea, e posterior avaliação pelo método de secções seriadas de Wilson (1965).

3.4. Período de tratamento

Após o diagnóstico de prenhez as ratas foram distribuídas aleatoriamente em gaiolas individuais para compor os grupos experimentais. As doses escolhidas para o tratamento com silibinina dos grupos experimentais foram inferiores (50 mg/kg, 100mg/kg e 200mg/kg) as doses de referência dos trabalhos da literatura (La Grange et al., 1999; Moreland et al., 2002; Neese et al., 2004). O tratamento foi realizado por via intragástrica (gavage) durante toda a prenhez (0 ao 20ºdia) no período vespertino (17:00 horas).

Para avaliação indireta da toxicidade as ratas foram pesadas em dias alternados para controle de ganho de peso e observadas quanto ao comportamento, ingestão hídrica e de ração.

4. Grupos experimentais

As ratas prenhes foram estratificadas aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n = 6 animais / grupo) de acordo com a concentração de silibinina que receberam e assim denominados:

Grupo Controle: ratas prenhes que receberam solução fisiológica.

Grupo I: ratas prenhes que receberam 50 mg/kg de silibinina.

Grupo II: ratas prenhes que receberam 100 mg/kg de silibinina.

Grupo III: ratas prenhes que receberam 200 mg/kg de silibinina.

5. Análise estatística

Os valores obtidos foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para os resultados das análises esqueléticas e viscerais fetais, ganho de peso materno, peso médio dos fetos e peso da ninhada, a comparação entre os grupos foi feita pela análise de variância do delineamento inteiramente casualizado com aplicação do teste F. As comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Tukey. Para os dados de contagem (implantações e reabsorções) foi utilizado o modelo de Poisson e para as porcentagens de perdas pré e pós-implantações utilizou-se um modelo binomial.

As comparações múltiplas foram feitas utilizando a opção DIFF da PROC GENMOD do SAS, versão 9.1.

Em todos os testes considerou-se o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Durante o período de administração da silibinina não foram observados sinais clínicos de toxicidade ou alteração comportamental das ratas. O emprego de diferentes concentrações de silibinina não mostrou qualquer efeito negativo sobre a saúde do animal, sobre o consumo hídrico e de ração ou sobre o ganho de peso. Nenhuma morte foi registrada no decurso da prenhez. O princípio ativo não produziu alteração estatisticamente significativa em nenhuma das variáveis analisadas.

Na tabela 1 estão representadas as variáveis reprodutivas dos grupos tratados e controle. Os grupos tratados não apresentaram diferenças significativas no ganho de massa corporal materna em relação ao grupo controle, embora houvesse tendência de maior ganho nos grupos tratados do que no controle. O número de implantações por ninhada foi semelhante nos dois grupos, assim como o número total de reabsorções. O número de fetos de ratas tratadas com silibinina foi semelhante ao do grupo controle. O tratamento com silibinina não afetou os pesos fetais, observando-se pequeno aumento do peso nos grupos tratados, mas sem significado estatisticamente significativo. O peso das placentas também não mostrou diferença significativa entre os grupos estudados.

Tabela 1. Média e desvio padrão da performance reprodutiva de ratas não-tratadas (controle) e tratadas com diferentes concentrações de silibinina durante toda a prenhez.

Variáveis	Grupos			
	Controle	Grupo I	Grupo II	Grupo III
No. corpos lúteos	13,66 $\pm$ 2,73	12,00 $\pm$ 0,71	13,00 $\pm$ 1,55	12,75 $\pm$ 0,50
No. fetos vivos	11,50 $\pm$ 1,52	8,40 $\pm$ 4,16	10,00 $\pm$ 3,16	10,25 $\pm$ 4,19
No. fetos mortos	0	0	0	0
No. reabsorções	0,50 $\pm$ 1,22	0,60 $\pm$ 0,89	0,33 $\pm$ 0,82	0,50 $\pm$ 0,58
No. implantações	12,00 $\pm$ 2,10	9,00 $\pm$ 4,12	10,33 $\pm$ 2,73	10,75 $\pm$ 3,86
Peso médio fetos	4,93 $\pm$ 0,66	5,26 $\pm$ 0,95	5,32 $\pm$ 0,27	5,22 $\pm$ 0,34
Peso médio placenta	0,56 $\pm$ 0,11	0,58 $\pm$ 0,15	0,63 $\pm$ 0,26	0,54 $\pm$ 0,19
Peso médio ninhada	75,72 $\pm$ 11,67	63,65 $\pm$ 17,50	68,87 $\pm$ 33,59	61,41 $\pm$ 26,40
Ganho peso materno	89,66 $\pm$ 46,29	115,02 $\pm$ 19,76	110,87 $\pm$ 29,11	112,7 $\pm$ 25,25
% perda pré-implantação	11,66 $\pm$ 9,27	24,40 $\pm$ 33,68	12,23 $\pm$ 20,73	16,50 $\pm$ 28,12
% perda pós-implantação	3,33 $\pm$ 8,16	4,25 $\pm$ 8,50	5,56 $\pm$ 10,09	6,92 $\pm$ 9,44

Nas proles dos grupos tratados não se constataram alterações macroscópicas externas quando comparadas ao grupo controle. Comparando com o grupo controle, os grupos que receberam silibinina não apresentaram diferenças significativas em relação à frequência das malformações e anomalias, tanto viscerais quanto esqueléticas ou outros efeitos adversos nos fetos (Tabela 2).

Tabela 2. Média e desvio padrão da percentagem de anomalias esqueléticas e viscerais dos fetos não tratados (controle) e tratados com diferentes concentrações de silibinina durante toda a prenhez.

Variáveis	Grupos			
	Controle	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Exame esquelético	6,00 ± 0,89	4,40 ± 1,82	5,53 ± 1,50	5,75 ± 1,26
Exame visceral	5,50 ± 0,84	4,00 ± 2,34	4,66 ± 1,75	5,50 ± 1,00

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar se o tratamento com silibinina causa efeitos adversos em fetos de ratas, pois já foi demonstrado que esse flavonóide atravessa a membrana placentária em ratos e, está presente em tecidos fetais (La Grange et al 1999). Também se analisou a performance reprodutiva materna utilizando-se concentrações de silibinina semelhantes às relatadas pela literatura (La Grange et al., 1999; Moreland et al., 2002; Neese et al., 2004).

Nenhuma das concentrações de silibinina administradas durante a prenhez das ratas causou alteração significativa na performance reprodutiva materna e, malformações ou anomalias nos fetos, quando comparadas ao grupo controle. Esses resultados confirmam os dados da literatura, que mostram a não toxicidade da silibinina (Ferenci et al 1989; Manna et al., 1999), mesmo em ratas prenhes e em seus fetos (La Grange et al., 1999; Moreland et al., 2002; Neese et al., 2004).

Como não houve diferença significativa, tanto na performance materna como no índice de anomalias ou malformações fetais nas diferentes concentrações de silibinina, os resultados sugerem que o uso desse flavonóide na prenhez é seguro, podendo ser utilizado experimentalmente no tratamento de patologias obstétricas. Apesar de, em humanos, ser amplamente usada no tratamento de doenças hepáticas, em gestantes o grupo da silimarina não foi ainda testado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Crocenzi FA, Basiglio CL, Pérez LM, Portesio MS, Pozzi EJ, Roma MG. Silibinin prevents cholestasis-associated retrieval of the bile salt export pump, Bsep, in isolated rat hepatocyte couplets: possible involvement of cAMP. *Biochem Pharmacol.* 2005; 69:1113-20.

Damasceno DC, Volpato GT, Person OC, Toshida A, Calderon IMP, Rudge MVC. Efeito do ácido acetilsalicílico na performance reprodutiva e na prole de ratas Wistar. *Rev Assoc Med Bras.* 2002; 48:312-6.

D'Andrea V, Perez LM, Sanchez Pozzi EJ. Inhibition of rat liver UDP-glucuronosyltransferase by silymarin and the metabolite silibinin-glucuronide. *Life Sci.* 2005; 77:683-92.

Ferenci P, Dragosics B, Dittrich H, Frank H, Benda L, Lochs H et al. Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. *J Hepatol.* 1989; 9:105-13.

Kang JS, Jeon YJ, Kim HM, Han SH, Yang KH. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 302:138-44.

La Grange L, Wang M, Watkins R, Ortiz D, Sanchez ME, Konst J et al. Protective effects of the flavonoid mixture, silymarin, on fetal rat brain and liver. *J Ethnopharmacol.* 1999; 65:53-61.

Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, Aggarwal BB. Silymarin suppress TNF-induced activation of NF-kB, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J Immunol.* 1999; 163:6800-9.

Moreland N, La Grange L, Montoya R. Impact of in utero exposure to EtOH on corpus callosum development and paw preference in rats: protective effects of silymarin. *BMC Complement Altern Med.* 2002; 2:10-5.

Mourelle M, Muriel P, Favari L, Franco T. Prevention of CCL4-induced liver cirrhosis by silymarin. *Fundam Clin Pharmacol*. 1989; 3:183-91.

Muriel P, Moreno MG, Hernandez Mdel C, Chavez E, Alcantar LK. Resolution of liver fibrosis in chronic CCl4 administration in the rat after discontinuation of treatment: effect of silymarin, silibinin, colchicine and trimethylcolchicinic acid. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005; 96:375-80.

Muriel P, Moreno MG. Effects of silymarin and vitamins E and C on liver damage induced by prolonged biliary obstruction in the rat. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004; 94:99-104.

Muriel P, Mourelle M. Prevention by silymarin of membrane alterations in acute CCl4 liver damage. *J Appl Toxicol*. 1990; 10:275-9.

Neese S, La Grange L, Trujillo E, Romero D. The effects of ethanol and silymarin treatment during gestation on spatial working memory. *BMC Complement Altern Med*. 2004; 4:4-11.

Shalan MG, Mostafa MS, Hassouna MM, El-Nabi SE, El-Refaie A. Amelioration of lead toxicity on rat liver with Vitamin C and silymarin supplements. *Toxicology*. 2005; 206:1-15.

Skottová N, Kazdová L, Oliyarnyk O, Vecera R, Sobová L, Ulrichová J. Phenolics-rich extracts from *Silybum marianum* and *Prunella vulgaris* reduce a high-sucrose diet induced oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rats. *Pharmacol Res*. 2004; 50:123-30.

Staples RE., Schenell VL. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. *Stain Technology*. 1964; 39:61-3.

Valenzuela A, Garrido A. Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. *Biol Res*. 1994; 27:105-12.

Wilson, J.C. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animal. In: Wilson JC, Warkani J. Teratology: Principles and Techniques: University of Chicago Press, Chicago, 1965, p.262-327.

Yao-Cheng R. Advances in pharmacological studies of silymarin. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1991; 86:79-85.

A background image of a purple thistle flower with green leaves, slightly blurred.

Artigo 2

**Efeitos da silibinina sobre modelo de pré-eclâmpsia
induzida em ratas por tratamento com N^ω-Nitro-L-
arginina metil ester**

Souza CO, Peraçoli MTS, Silva MG, Damasceno DC, Weel, IC, Romão M, Medeiros LTP,
Peraçoli JC

Trabalho a ser submetido a Reproductive Biomedicine

RESUMO

Introdução: A inibição da enzima óxido nítrico sintase com N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) é considerada um modelo experimental de pré-eclâmpsia em ratas. Silibinina é um flavonóide quimicamente definido e o principal componente ativo da silimarina, um complexo polifenólico extraído de frutos e sementes de *Silybum marianum*, que possui propriedades anti-inflamatória, hepatoprotetora e anti-oxidante.

Objetivo: Avaliar o efeito protetor da silibinina, o isômero mais ativo da silimarina, em modelo experimental de pré-eclâmpsia induzida em ratas.

Métodos: Ratas da linhagem Wistar foram tratadas durante o período de 10 a 20 dias de prenhez com L-NAME (70-80mg/Kg/dia) – grupo L-NAME e com L-NAME associado à silibinina (100mg/dia) desde o dia 0 (grupo L-NAME+ S0), dia 7 (grupo L-NAME+S7) e dia 14 (grupo L-NAME+S14) de prenhez. No 21º dia de prenhez as ratas foram eutanasiadas, sendo determinados a proteinúria, variáveis bioquímicas (uréia, creatinina, ácido úrico, desidrogenase láctica (DHL), aspartato amino transferase (AST) e aspartato alanina aminotransferase (ALT) contagem de plaquetas, determinação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no plasma, homogenato de fígado e placenta, determinação de malondialdeído (MDA) e superóxido dismutase (SOD), avaliação histopatológica do fígado e rins e a performance reprodutiva materna. Todos os parâmetros foram submetidos à análise de variância com nível de significância de 5%.

Resultados: A silibinina reduziu significativamente o valor da proteinúria, os níveis de TNF- α no plasma e nos homogenatos de fígado e placenta, normalizou as concentrações de AST, ALT e MDA e aumentou o número de plaquetas e de SOD, quando comparados com o grupo L-NAME. A histopatologia das lesões mostrou alterações hepáticas com perda da forma poliédrica do hepatócito e da arquitetura acinar, focos de infiltrado inflamatório mononuclear e espessamento da túnica muscular da artéria hepática no grupo tratado com L-NAME. No grupo tratado com silibinina as lesões hepáticas foram mais discretas e nos rins não houve diferença entre os grupos tratados com L-NAME e os tratados com silibinina. Na performance reprodutiva, os grupos tratados com silibinina

apresentaram maior número de fetos vivos, menor número de reabsorções e da percentagem de perda pós-implantação, independente do momento de administração da mesma durante a prenhez.

Conclusão: A silibinina, administrada em diferentes períodos de prenhez, apresentou efeito anti-oxidante e anti-inflamatório em modelo de pré-eclâmpsia induzido por L-NAME em ratas.

Palavras-chaves: Silibinina, prenhez, L-NAME, pré-eclâmpsia, performance reprodutiva, TNF- α .

ABSTRACT

Introduction: Inhibition of nitric oxide synthase with Nw-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) has been employed as a useful model of human preeclampsia. Silibinin is a chemically defined flavonoid and the main active component of silymarin, a polyphenolic complex from fruits and seeds of *Silybum marianum*, which has anti-inflammatory, hepatoprotective and antioxidant properties.

Objective: To investigate the protective role of silibinin against the deleterious effect observed in experimental preeclampsia induced by L-NAME in rats.

Methods: Pregnant Wistar rats were treated during gestation (days 10-20) with L-NAME (70-80mg/Kg/day) in drinking water (L-NAME group) or with L-NAME plus silibinin (100mg/Kg/day) by gavage since day 0 (S0 group), day 7 (S7 group) or day 14 (S14 group) of pregnancy. On day 21 of pregnancy the rats were euthanized and several parameters were evaluated: proteinuria, biochemical parameters in serum such as urea, creatinine, uric acid, lactic dehydrogenase, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), platelets counts, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in plasma, liver and placenta homogenate, malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) activity in erythrocyte lysate, histopathology of the liver and kidneys and the maternal reproductive performance. All parameters were submitted to analysis of variance, and *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results: In comparison with the L-NAME group silibinin treatment reduced the values of proteinuria, TNF- α in plasma, and in liver and placenta homogenates, normalized platelet number and biochemical parameters such as AST, ALT e MDA activity, and enhanced SOD activity. Histopathologic lesions in the liver of the L-NAME group showed loss of polyedric shape of hepatocyte and acinar architecture. Mononuclear inflammatory infiltrate and thickening of muscle tunica of arterial vessel were observed mainly in periportal area. These hepatic lesions were more discreet in the groups treated with silibinin showing attenuation of the periportal inflammatory infiltrate. Kidney lesions did not show differences between L-NAME and silimarín groups. In the reproductive performance the groups treated with silibinin presented higher number of alive fetus, reduced number of resorption sites, and reduced post-implantation loss, independent of the time of silibinin administration during the pregnancy.

Conclusion: The silibinin treatment in different periods of pregnancy showed anti-oxidant and anti-inflammatory effects in the experimental model of preeclampsia induced by L-NAME in rats.

Keywords: Silibinin, pregnancy, L-NAME, preeclampsia, reproductive performance, TNF- α .

INTRODUÇÃO

Estudos com animais de experimentação são ferramentas úteis para a compreensão da fisiopatologia de doenças, bem como para testar substâncias que possam ser aplicadas na terapêutica das mesmas.

Apesar de não existir um modelo que espontaneamente reproduza a pré-eclâmpsia, é possível induzi-la, pelo menos em parte, por mecanismos artificiais. Assim, a literatura demonstra, em estudos experimentais, o envolvimento do óxido nítrico sobre essa patologia. A inibição crônica da enzima óxido nítrico sintase, pelo tratamento de ratas prenhes com Nw-nitro-L-argininina metil ester (L-NAME), é aceita como método experimental para induzir hipertensão arterial, resultando em condição semelhante à pré-eclâmpsia (Yallampalli & Garfield., 1993; Salas, 1998; Kanashiro et al., 2000). Ratas submetidas à inibição crônica dessa enzima durante a gestação desenvolvem as principais condições patológicas associadas à pré-eclâmpsia, tais como hipertensão arterial, proteinúria, lesão renal e restrição de crescimento intra-uterino (Buhimschi et al., 1995; Molnar et al., 1994; Helmbrecht et al., 1996).

Considerando o modelo experimental de indução de pré-eclâmpsia pela administração de N^w-Nitro-L-argininina metil ester, a literatura tem procurado reverter ou atenuar os efeitos induzidos pela administração crônica de L-NAME na prenhez, simulando modelos de tratamento da pré-eclâmpsia. Assim, em ratas prenhes, o tratamento com fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) associado à administração de L-NAME reduz a pressão arterial e a proteinúria, e atenua as manifestações *pre-eclampsia-like* nos animais tratados com VEGF em comparação aos que receberam apenas L-NAME (Chen et al., 2008). A administração de sulfato de magnésio reduz a pressão arterial e aumenta o peso dos fetos no grupo tratado (Standley et al., 2006).

O emprego de ervas medicinais, utilizadas no tratamento de edema e proteinúria em pacientes com pré-eclâmpsia (Ushihoyama, 2003), mostrou efeitos benéficos sobre a pressão arterial de ratas submetidas ao modelo experimental de pré-eclâmpsia induzida por L-NAME (Takei et al., 2007). Utilizando esse modelo, Moura et al. (2007) demonstraram efeito protetor do extrato obtido de uvas vermelhas *Vitis labrusca*. Comparando com animais não tratados, ratas que receberam esse extrato, a partir do 13º. dia de prenhez, apresentaram redução da

pressão arterial e da resistência à insulina e, aumento do número de fetos vivos.

A silimarina é um flavonóide polifenólico, extraído de frutos e sementes de *Silybum marianum* (Família Asteraceae/ Compositae) e constituída por uma mistura de três isômeros estruturais: silibinina (60-70%), considerada o componente mais ativo, silicristina (20%) e silidianina (10%) (Yao-Cheng, 1991; Pradhan & Girish, 2006).

Silibinina e silimarina são amplamente utilizadas como hepatoprotetores, demonstrando ainda outras atividades como citoproteção, antiinflamatória, antifibrótica e anticarcinogênica (Yao-Cheng, 1991; Valenzuela & Garrido, 1994; Kren & Walterová, 2005). Entretanto, os mecanismos relacionados a esses efeitos ainda não estão totalmente esclarecidos. Acredita-se que estão relacionados com a supressão do fator de transcrição nuclear NF-kappaB, o qual regula a expressão de vários genes envolvidos na inflamação, citoproteção e carcinogênese (Manna et al., 1999; Kang et al., 2002; Agarwal et al., 2006).

Estudos indicam que a silimarina apresenta forte atividade anti-oxidante (Muzes et al., 1991; Dehmlow et al., 1996; Kvasnicka et al., 2003). Em pacientes com doença hepática esse bioflavonóide aumenta a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e, em linfócitos e eritrócitos o conteúdo celular e o nível sérico de glutathione (Valenzuela et al., 1989; Muzes et al., 1991; Wellington & Jarvis, 2001). A silimarina protege as membranas das células hepáticas contra agentes tóxicos, melhorando sua função, tanto em animais como em humanos (Manna et al., 1999). É aceito que a silimarina exerce ação estabilizadora na membrana celular, prevenindo ou inibindo a via da 5-lipoxigenase (Yao-Cheng, 1991; Dehmlow et al., 1996).

A peroxidação lipídica, induzida pela ação de algumas toxinas hepáticas, determina o aparecimento de sintomas clínicos e está ligada à formação de prostaglandinas. Está demonstrado que os três componentes da silimarina podem suprimir a formação de prostaglandinas, juntamente com a decomposição dos lipídeos de membrana, sendo provavelmente esta a ação hepatoprotetora desse flavonóide (Yao-Cheng, 1991).

Em ratos, a silimarina é usada como agente protetor de diferentes agressões induzidas do parênquima hepático. Assim, é eficaz na recuperação da bomba de liberação do sal biliar (Crocenzi et al., 2005); tem efeito inibidor da glucoronidação, auxiliando o controle da mesma no tratamento de doenças

hepáticas (D'Andrea et al., 2005); neutraliza o estresse oxidativo causado pela colestase hepática (Muriel & Moreno, 2004) e exerce efeito protetor hepático contra a intoxicação por chumbo (Shalan et al., 2005). Tem ainda capacidade de prevenir fibrose hepática (Mourelle et al., 1989, Muriel & Mourelle, 1990), porém não consegue reverter a mesma (Muriel et al., 2005).

O efeito da silimarina sobre a lesão hepática induzida por lipopolissacárides e, sobre a produção e atividade do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foram estudados por Zhang et al. (1996). O tratamento de camundongos com silimarina inibiu a produção de TNF- α biologicamente ativo por macrófagos peritoneais. Os autores sugerem que a inibição da produção dessa citocina, bem como seus efeitos tóxicos podem estar envolvidos no mecanismo protetor da silimarina sobre a lesão hepática. Assim, pela sua atividade anti-oxidante, a silimarina inibiria a produção de citocinas como o TNF- α , bem como seus efeitos tóxicos sobre as células (Johnson et al., 2003).

Em ratas prenhes, alguns estudos também mostram efeito protetor da silimarina. Assim, a literatura relata proteção do cérebro e fígado fetais após a ingestão materna de etanol (La Grange et al., 1999; Moreland et al., 2002; Neese et al., 2004).

A silimarina/silibinina também exerce importante ação anti-inflamatória *in vivo*, sendo utilizada no tratamento clínico de doenças hepáticas inflamatórias e alcoólicas (Johnson et al., 2003; Falasca et al., 2008). Estudos farmacológicos indicam que, no tratamento de cirrose hepática alcoólica, a silimarina não é tóxica, mesmo em altas concentrações (Fehér et al., 1987; Ferenci et al., 1989; Johnson et al., 2003).

Trabalho desenvolvido em nosso laboratório, avaliando o efeito da silimarina sobre o metabolismo oxidativo de monócitos humanos, mostrou que esse flavonóide exerce efeito anti-oxidante, inibindo, de maneira dose-dependente, a produção de TNF- α e de peróxido de hidrogênio por monócitos estimulados por éster de forbol (PMA) (Bannwart et al., 2009).

O TNF- α e citocinas inflamatórias como as interleucinas 1 e 6 estão envolvidos na patogênese de diferentes doenças humanas como cancer (Ikemoto et al., 2000; Lelli et al., 2003), processos infecciosos (Rook et al., 1987; Dooley et al., 1994; Peraçoli et al., 2003) e patologias da gestação como a pré-eclâmpsia (Vince et al., 1995; Faas & Schuiling, 2001; Peraçoli et al., 2007).

As complicações graves da pré-eclâmpsia ainda necessitam de melhor compreensão e tratamento eficaz. Nos casos de síndrome HELLP, um agente que interfira com o estresse oxidativo e atue como protetor hepático seria uma solução para o controle da doença, enquanto não ocorresse a resolução da gestação, considerado o único tratamento que determina a cura da pré-eclâmpsia, principalmente dos seus casos graves. A administração da silibinina como protetor hepático pode ser uma opção.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito protetor da silibinina, considerado o isômero mais ativo da silimarina, em modelo experimental de pré-eclâmpsia induzida em ratas.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido para apreciação e aprovado em 19 de abril de 2007, pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, tendo recebido o protocolo no. 590 (anexo 1).

Animais

Foram utilizadas ratas virgens da linhagem Wistar com idade entre três e quatro meses, procedentes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – International Council for Laboratory Animal Science (UNICAMP). Após a transferência para o Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu – UNESP, os animais foram mantidos durante uma semana em adaptação e a seguir estratificados por sorteio em cinco grupos:

- RP: ratas prenhes que não receberam L-NAME 06
- RP-LN: ratas prenhes que receberam L-NAME 06
- RP-LN + S0: ratas prenhes que receberam L-NAME + silibinina
(desde o dia zero de prenhez)..... 06
- RP-LN + S7: ratas prenhes que receberam L-NAME + silibinina
(desde o dia sete de prenhez)..... 07
- RP- LN + S14: ratas prenhes que receberam L-NAME + silibinina
(desde o dia 14 de prenhez)..... 09

Seqüência experimental

A seqüência experimental foi dividida em cinco fases: de adaptação, de acasalamento, de prenhez, de indução de pré-eclâmpsia e de tratamento com silibinina.

Fase de adaptação

A fase de adaptação no biotério teve duração de sete dias. Nesse período os animais permaneceram em caixas de polietileno. A temperatura média do ambiente foi mantida em torno de 24°C com fotoperíodo de doze horas/dia. Os animais receberam ração e água “ad libitum”.

Fase de acasalamento

Após a fase de adaptação, grupos de quatro ratas foram colocados no final da tarde na companhia de um rato macho normotenso. Na manhã seguinte, após a retirada do macho, foi colhido esfregaço vaginal pela introdução de cotonete embebido em solução fisiológica a 0,9%. Os fatores indicativos de prenhez foram a presença de espermatozóides e o diagnóstico da fase estro do ciclo estral, sendo esse dia considerado o dia zero de prenhez (Damasceno et al., 2002). Após a confirmação da prenhez as ratas foram pesadas e colocadas em caixas individuais.

Fase de prenhez

As ratas prenhes foram mantidas em gaiolas individuais durante 21 dias. Foi feito controle semanal de evolução do peso (balança com precisão de 0,001g). O controle da ingestão alimentar foi feito em dias alternados e o de ingestão de água diariamente.

Fase de indução de pré-eclâmpsia

Foi feita pela administração do metil éster de N^W-nitro-L-Arginina (L-NAME), na dose de 50 a 80 mg/Kg, por via oral, diluído água de beber, a partir do 10º dia até o final da prenhez.

Fase de tratamento com silibinina

Durante os períodos correspondentes ao tratamento com silibinina, esta foi administrada, por gavagem, na dose de 100mg/kg, diluída em carboximetil celulose 0,4%, conforme padronizado por Souza et al. (2008).

Variáveis

Variáveis independentes

- Ratas prenhes que não receberam L-NAME
- Ratas prenhes que receberam apenas L-NAME
- Ratas prenhes que receberam L-NAME + silibinina desde o dia zero de prenhez
- Ratas prenhes que receberam L-NAME + silibinina desde o dia sete de prenhez

- Ratas prenhes que receberam L-NAME + silibinina desde o dia 14 de prenhez

Variáveis dependentes – Foram avaliadas variáveis das matrizes, das ninhadas e da placenta.

Variáveis das matrizes

- Peso corpóreo durante a prenhez (D_0 e D_{21}) e cálculo do ganho de peso materno (peso final menos peso inicial).
- Dosagem sérica de transaminases hepáticas, desidrogenase láctica, uréia, creatinina e ácido úrico no sangue colhido no 21º. dia de prenhez.
- Dosagem de hemoglobina e contagem de plaquetas no sangue colhido no 21º. dia de prenhez.
- Dosagem da proteinúria de 24 horas no 21º. dia de prenhez.
- Dosagem de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no plasma e em homogenato de fígado e placenta obtidos no 21º. dia de prenhez.
- Determinação de biomarcadores do estresse oxidativo (MDA e SOD) no sangue obtido no 21º. dia de prenhez.

Variáveis da ninhada

- Número de corpos lúteos
- Número de implantações
- Número de reabsorções
- Número de fetos/recém-nascidos por ninhada
- Peso dos fetos

Variáveis placentárias

- Peso placentário
- Índice placentário (peso placenta/peso feto)

Variáveis histológicas

- Vísceras (rins e fígado)

Técnicas

Resolução da prenhez e avaliação dos recém-nascidos

Na manhã do 21º dia de prenhez as ratas foram submetidas à anestesia com pentobarbital sódico (Hypnol® a 3%) e colocadas em posição supina para a realização da operação cesariana, com abertura da cavidade abdominal por incisão mediana da pele, musculatura abdominal e peritônio, expondo-se os cornos uterinos para contagem dos pontos de implantação e de reabsorção, e do número de fetos vivos.

Os fetos foram retirados após histerotomia, juntamente com as respectivas placentas e membranas. Em seguida as ratas foram desangradas para colheita de sangue. As amostras de sangue foram colocadas em tubos de ensaio, livres de anticoagulante e mantidas à baixa temperatura por 30 minutos. A seguir foram centrifugadas a 3.500 rpm, por 10 minutos, à temperatura ambiente. O soro foi coletado e estocado a -80°C para determinação de parâmetros bioquímicos.

Os fetos vivos e suas placentas foram pesados em balança analítica.

O índice placentário (IP) foi determinado em cada ninhada pela relação entre a soma dos pesos das placentas e a soma dos pesos dos fetos.

Estudo histopatológico

Cortes de rins e fígado foram fixados em formol a 10% por 48 horas, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e a seguir incluídos em parafina. Os cortes histológicos de 5µm de espessura foram colocados sobre lâmina histológica para coloração pelo método de Hematoxilina - Eosina (HE) para avaliação histopatológica dos referidos órgãos.

Dosagens sanguíneas

As dosagens sanguíneas (hemoglobina, transaminases hepáticas, desidrogenase láctica, uréia, creatinina e ácido úrico), a contagem de plaquetas e a determinação da proteinúria foram realizadas por método de automação no

Laboratório Clínico Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia do Campus de Botucatu – UNESP.

Determinação do fator de necrose tumoral alfa

Segmento do fígado de cada rata e segmentos das placentas de cada ninhada (*pool*), obtidos no 21º. dia de prenhez, foram pesados e homogeneizados com tampão de extração: 150 mM/L NaCl e 20 mM/L Tris pH 7,5, 5 mM/L EDTA em homogeneizador de tecidos, em banho de gelo. A seguir, os homogenatos obtidos foram centrifugados a 3.500 rpm por 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram filtrados em pré-filtro (Millipore) e armazenados em alíquotas a –80°C para determinação de TNF- α .

A concentração de TNF- α foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA) empregando-se kit comercial (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O valor da concentração de TNF- α obtido em pg/mL foi dividido pelo peso da amostra de tecido, ajustado para g/mL e a concentração final expressa em pg/g de tecido.

Determinação de biomarcadores do estresse oxidativo no sangue materno

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de ensaio com anticoagulante e centrifugadas a 1.200 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Após este procedimento foram retirados, por aspiração, o plasma, os glóbulos brancos e as plaquetas para obtenção das hemácias. O concentrado de hemácias foi lavado com tampão-salina-fosfato (PBS) a 4°C e centrifugado a 2.000 rpm durante 15 minutos por três vezes. Às hemácias lavadas (50 μ L) foram adicionados 950 μ L de água deionizada e agitados por inversão para obtenção do hemolisado. O hemolisado foi empregado para as determinações de hemoglobina e dos biomarcadores do estresse oxidativo: atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA). Essas técnicas seguiram a metodologia descrita por Ferreira et al. (1999).

Dosagem de hemoglobina no hemolisado de hemáceas

A concentração de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina (Mahoney et al., 1993). No momento da dosagem, 20 μ L do hemolisado obtido foram diluídos e agitados em 2 mL de solução de Drabkin. Após 10 minutos de repouso realizou-se a leitura da densidade óptica (DO) da

solução em espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech Cambridge, England, UK) a 546 nm. Como *blank* utilizou-se solução de Drabkin.

Determinação da peroxidação lipídica

Foi adicionado 1,0 mL de ácido sulfossalicílico (3,0%) a 1,0 mL de hemolisado, agitado por 10 segundos, centrifugado a 11.000 rpm por 3 minutos e deixado em repouso durante 15 minutos. Em seguida foram adicionados 500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA a 0,67%) a 500 µL de hemolisado. A mistura foi aquecida a 80°C por 30 minutos e a absorbância determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535 nm. Os resultados foram expressos em nM de malonaldeído (MDA) por grama de hemoglobina (nM/gHb).

Determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD)

A atividade total da SOD foi determinada pela sua capacidade de inibir a auto-oxidação do pirogalol[®] pelo ânion superóxido. A mistura consistiu da adição de 100 µL de tampão Tris/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5 mM), 20 µL de pirogalol[®] 10mM e 860 µL de água deionizada a 20 µL de hemolisado. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 420 nm (25°C) por 5 minutos. A quantidade de SOD capaz de produzir 50% de inibição da oxidação do pirogalol[®], por miligrama de hemoglobina, foi definida como uma unidade de atividade enzimática expressa em UI/mgHb.

Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância para amostras independentes (ANOVA), seguida de comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer, empregando-se o programa estatístico INSTAT, Graph-Pad, San Diego, CA, USA. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

Ingestão de L-NAME

Ratas prenhes foram estratificadas em cinco grupos, que com exceção do grupo controle, todos receberam metil éster de N^W-nitro-L-Arginina (L-NAME) como indutor de pré-eclâmpsia e entre estes, três receberam silibinina em diferentes momentos de prenhez (G3: desde o dia zero de prenhez, G4: a partir do dia sete de prenhez e G5: a partir do dia 14 de prenhez).

A ingestão média diária de L-NAME foi de $78,61 \pm 1,80$ mg/Kg no grupo L-NAME, de $77,88 \pm 2,25$ mg/Kg no grupo Silibinina-0, de $79,83 \pm 1,97$ mg/Kg no grupo Silibinina-7 e de $74,67 \pm 2,07$ mg/Kg no grupo Silibinina-14, não havendo diferença significativa entre os grupos.

O efeito protetor da silibinina, administrada em diferentes momentos da prenhez, foi avaliado em ratas Wistar expostas ao indutor de pré-eclâmpsia L-NAME.

Determinação da proteinúria

A concentração de proteína urinária apresentou valor significativamente maior no grupo L-NAME que nos grupos controle e tratados com silibinina ($p < 0,05$) (Figura 1).

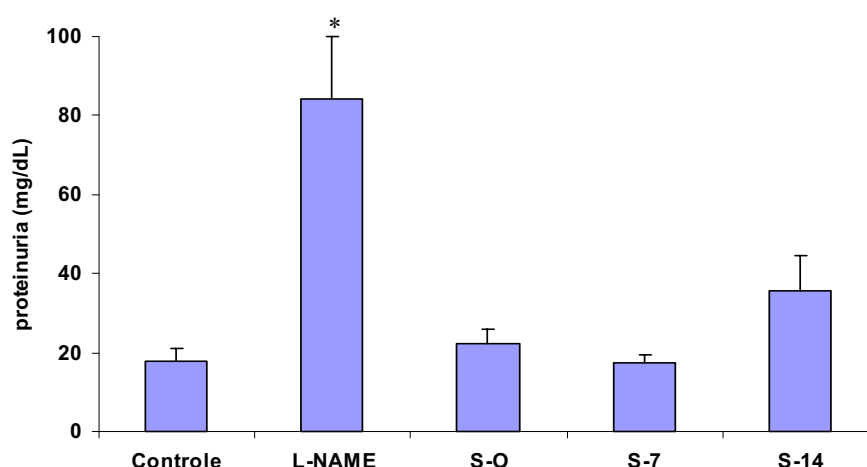


Figura 1. Média e desvio padrão dos valores de proteinúria nos grupos estudados.

* ($p < 0,05$) vs controle, S-0, S-7, S-14

Determinação de variáveis bioquímicas

A análise dos parâmetros bioquímicos mostrou que as concentrações de uréia, creatinina, ácido úrico e desidrogenase láctica (DHL) foram semelhantes nos grupos estudados ($p>0,05$), enquanto as concentrações de aspartato aminotransferase (AST) ($p<0,01$) e de alanina aminotransferase (ALT) ($p<0,05$) foram significativamente maiores no grupo L-NAME (Tabela 1).

Tabela 1. Média e erro padrão das variáveis bioquímicas determinadas no sangue periférico dos grupos estudados.

Variáveis bioquímicas	Grupos				
	Controle	L-NAME n: 6	S – 0 n: 6	S – 7 n: 7	S – 14 n: 9
Uréia (mg%)	44,3 $\pm$ 4,7	42,0 $\pm$ 2,7	41,5 $\pm$ 1,8	41,4 $\pm$ 2,9	45,1 $\pm$ 4,9
Creatinina (mg%)	0,70 $\pm$ 0,04	0,69 $\pm$ 0,03	0,73 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,03	0,71 $\pm$ 0,03
Ácido úrico (mg%)	1,22 $\pm$ 0,15	1,58 $\pm$ 0,29	1,60 $\pm$ 0,27	1,51 $\pm$ 0,18	1,79 $\pm$ 0,27
DHL (UI/L)	1923,3 $\pm$ 644,6	1961,0 $\pm$ 509,3	1960,2 $\pm$ 302,7	2065,4 $\pm$ 474,2	2079,1 $\pm$ 524,2
AST (UI/L)	130,3 $\pm$ 5,6	266,8 $\pm$ 41,5 *	123,3 $\pm$ 15,0	118,0 $\pm$ 10,0	141,6 $\pm$ 18,0
ALT (UI/L)	26,2 $\pm$ 3,7	44,3 $\pm$ 2,9 #	29,0 $\pm$ 2,8	31,1 $\pm$ 2,9	33,0 $\pm$ 2,5

* $p<0,01$ vs controle, S-0, S-7, S-14

Contagem de plaquetas

A Figura 2 apresenta a contagem de plaquetas dos grupos estudados, mostrando diminuição significativa da mesma no grupo L-NAME, quando comparado com os demais grupos tratados com silibinina. Os resultados mostram que a silibinina, administrada em diferentes períodos de prenhez, foi eficiente para reverter a diminuição do número de plaquetas observado no grupo de ratas tratadas com L-NAME.

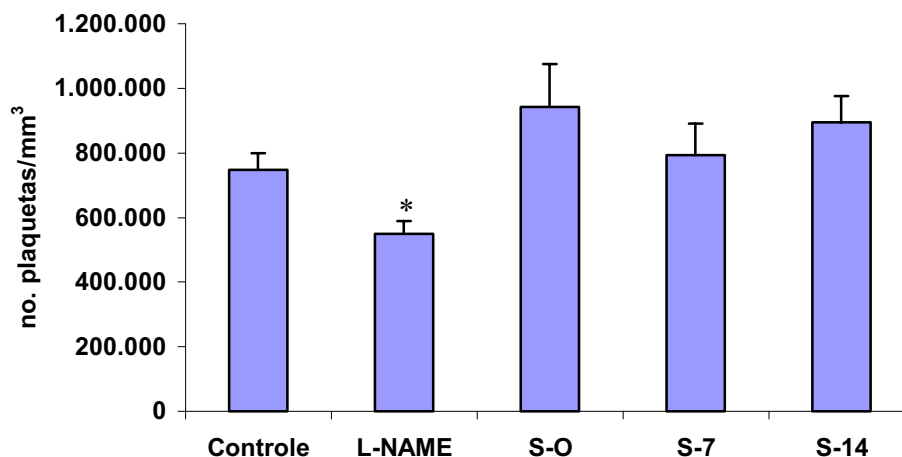


Figura 2. Número de plaquetas no sangue periférico de ratas tratadas com L-NAME e ratas tratadas com L-NAME + silibinina em diferentes períodos de prenhez.

* ($p < 0,05$) vs controle, SB-0, SB-7, SB-14.

Determinação do fator de necrose tumoral-alfa

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foi avaliado no plasma e no homogenato de fígado e de placenta dos grupos estudados (Tabela 2). A concentração de TNF- α , determinada no plasma do grupo L-NAME, foi significativamente maior que no grupo controle e que nos grupos que receberam silibinina. Entre os grupos que receberam silibinina, a concentração dessa citocina foi significativamente maior no grupo que recebeu silibinina a partir do 14º dia de prenhez, quando comparado com o grupo controle e o grupo que recebeu silibinina a partir do 7º. dia de prenhez. Nos homogenatos de fígado e de placenta, a concentração de TNF- α foi significativamente maior no grupo L-NAME, quando comparado com os outros grupos. No grupo que recebeu silibinina a partir do 14º. dia de prenhez a concentração de TNF- α foi significativamente maior que no grupo controle.

Tabela 2. Média e erro padrão dos níveis de TNF- α no soro e nos homogenatos de fígado e placenta dos grupos estudados.

TNF- α (pg/g tecido)	Grupos				
	Controle n: 6	L-NAME n: 6	S – 0 n: 6	S – 7 n: 7	S – 14 n: 9
Plasma	5,2 $\pm$ 1,4	22,8 $\pm$ 1,6 *	7,6 $\pm$ 2,1	6,3 $\pm$ 0,9	11,2 $\pm$ 1,3
Fígado	17,0 $\pm$ 2,3	91,3 $\pm$ 13,3 *	31,1 $\pm$ 2,3	27,7 $\pm$ 4,2	44,1 $\pm$ 5,9 #
Placenta	14,5 $\pm$ 1,9	39,8 $\pm$ 8,5 *	16,4 $\pm$ 1,9	17,6 $\pm$ 2,2	23,8 $\pm$ 2,6 @

*(p< 0,05) vs (controle, So, S7, S14)

(p<0,05) vs (controle, S7)

@ (p<0,05) vs controle

Determinação de malondialdeído (MDA) e superóxido dismutase (SOD)

Os níveis de MDA foram significativamente maiores no grupo L-NAME quando comparado com os demais grupos, que não apresentaram diferenças entre si. Os níveis de SOD foram significativamente maiores nos grupos S-O e S-7, quando comparados com os grupos controle e L-NAME. O grupo S-14 não apresentou diferença significativa quando comparado com os demais grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da silibinina sobre a peroxidação lipídica (MDA) e a produção da superóxido dismutase (SOD) nos grupos estudados.

Parâmetros	Grupos				
	Controle n: 6	L-NAME n: 6	S – 0 n: 6	S – 7 n: 7	S – 14 n: 9
MDA (nM/gHB)	0,73 ± 0,03	1,20 ± 0,11 ⁺	0,79 ± 0,08	0,78 ± 0,13	0,90 ± 0,07
SOD (UI/mgHb)	9,14 ± 1,25	10,06 ± 2,22	17,84 ± 3,68 ⁺	16,36 ± 3,24 ⁺	12,83 ± 1,86

*($p < 0,05$) vs controle, S-0, S-7, S-14

+($p < 0,05$) vs controle, L-NAME

Avaliação histopatológica do fígado e rins

A análise histopatológica do fígado das ratas prenhes (controle) mostrou morfologia normal, com hipertrofia discreta de hepatócitos, apresentando núcleos proeminentes e discreta dilatação sinusoidal periférica à veia centrolobular. No grupo tratado com L-NAME observou-se perda da forma poliédrica do hepatócito e da arquitetura acinar, hipertrofia moderada dos hepatócitos, sendo alguns em necrose, e dilatação sinusoidal moderada (Figuras 3 e 4). Além disso, verificaram-se focos de infiltrado mononuclear dispersos pelo parênquima, com maior frequência no espaço periportal (Figura 5). Em comparação com as ratas controle, o tratamento com L-NAME induziu espessamento da túnica muscular da artéria hepática e discreta a moderada esteatose microgoticular (Figuras 4 e 6).

Nos grupos tratados com silibinina em diferentes períodos observaram-se lesões mais discretas e arquitetura celular hepática mais preservada do que no grupo L-NAME. Houve redução do infiltrado inflamatório, agora restrito ao espaço periportal, mais acentuada nos animais dos grupos S-0 e S-7. Observou-se também menor espessamento da túnica muscular da artéria hepática e discreta esteatose microgoticular.

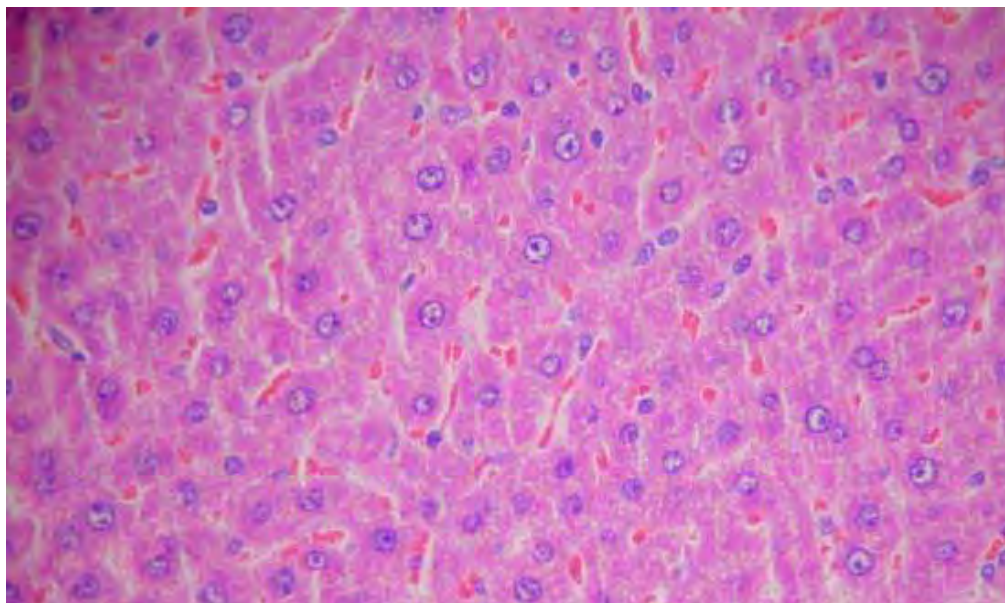


Figura 3. Fotomicrografia do fígado de rata prenhe com pré-eclâmpsia induzida por L-NAME, apresentando dilatação sinusoidal moderada e hepatócitos em necrose. HE. 400X.

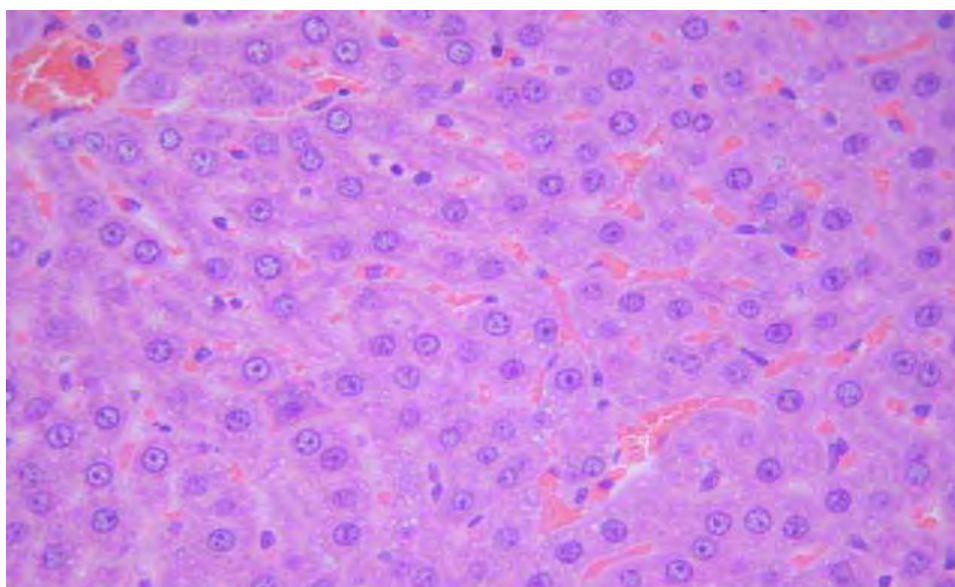


Figura 4. Fotomicrografia do fígado de rata prenhe com pré-eclâmpsia induzida por L-NAME, apresentando dilatação sinusoidal na região centro-lobular, dilatação da veia centro-lobular com discreta congestão e esteatose microgoticular difusa. HE.400X.

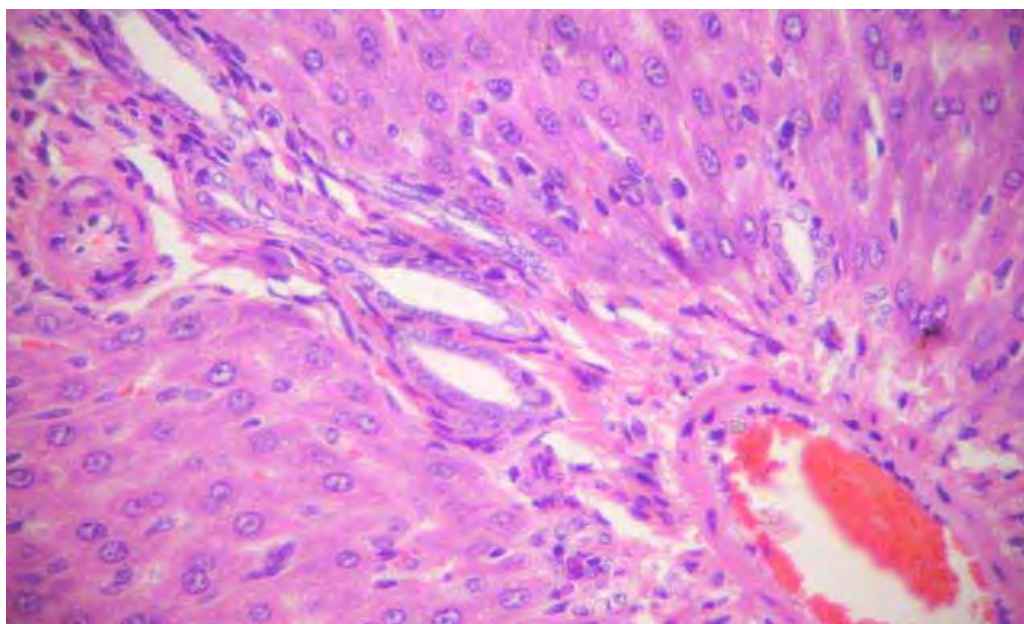


Figura 5. Fotomicrografia do fígado de rata prenhe com pré-eclâmpsia induzida por L-NAME, apresentando infiltrado periportal moderado. HE. 400X.

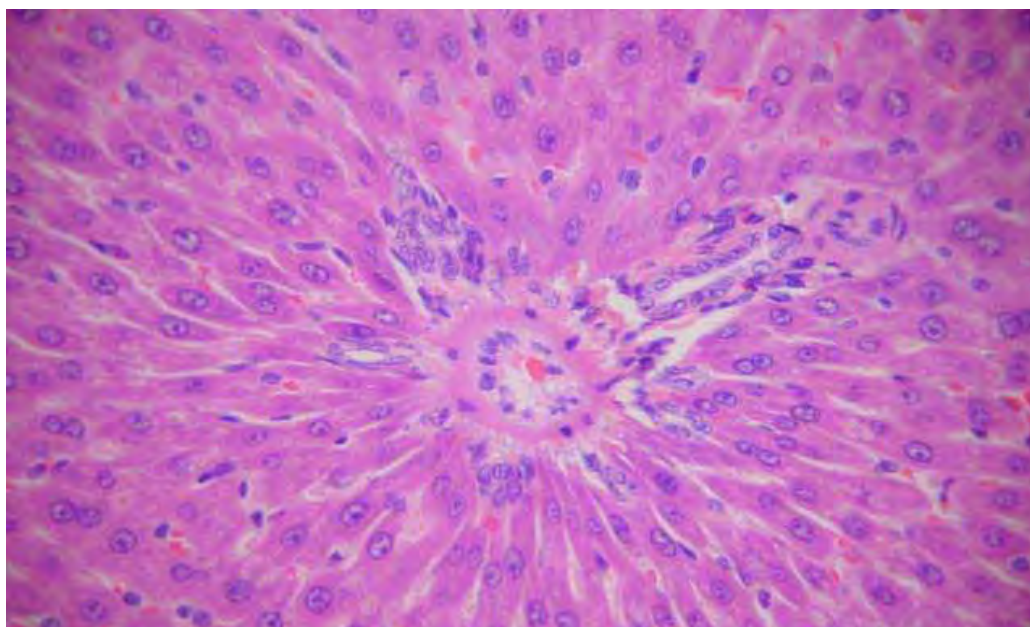


Figura 6. Fotomicrografia do fígado de rata prenhe com pré-eclâmpsia induzida por L-NAME, apresentando hipertrofia da camada média da artéria hepática. HE. 400X.

Os rins das ratas do grupo controle apresentaram, à microscopia, padrões morfológicos dentro dos limites de normalidade. Nos grupos que receberam L-NAME, associado ou não com silibinina por diferentes períodos, os achados morfológicos foram necrose tubular aguda, degeneração hialina goticular, nefroesclerose arterial e arteriolar, e nefrocalcinose, não havendo diferença entre os grupos (Figuras 7 a 9).

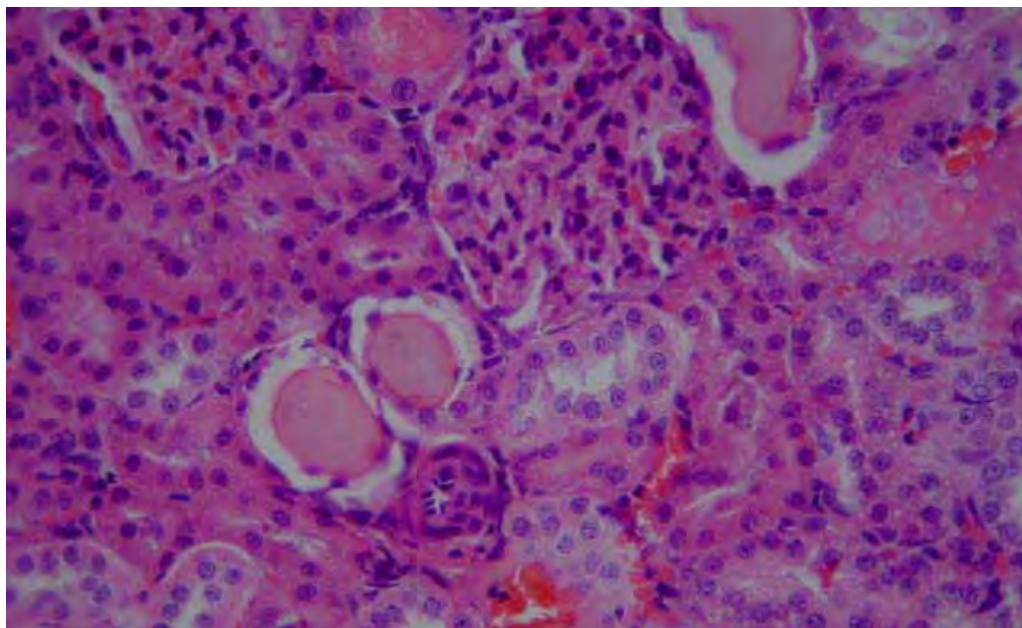


Figura 7. Fotomicrografia do rim de rata prenhe com pré-eclâmpsia induzida por L-NAME, apresentando necrose tubular aguda na região cortical com focos de “tireoidização” tubular e nefroesclerose arterial. HE. 400X.

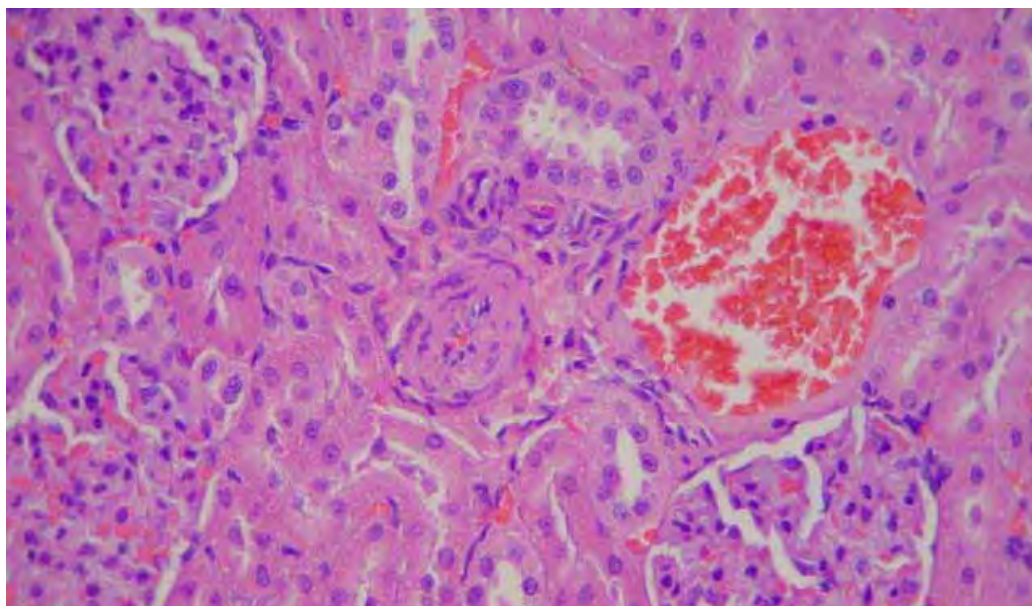


Figura 8. Fotomicrografia do rim de rata prenhe com pré-eclâmpsia induzida por L-NAME, apresentando nefrosclerose arterial e arteriolar. HE. 400X.

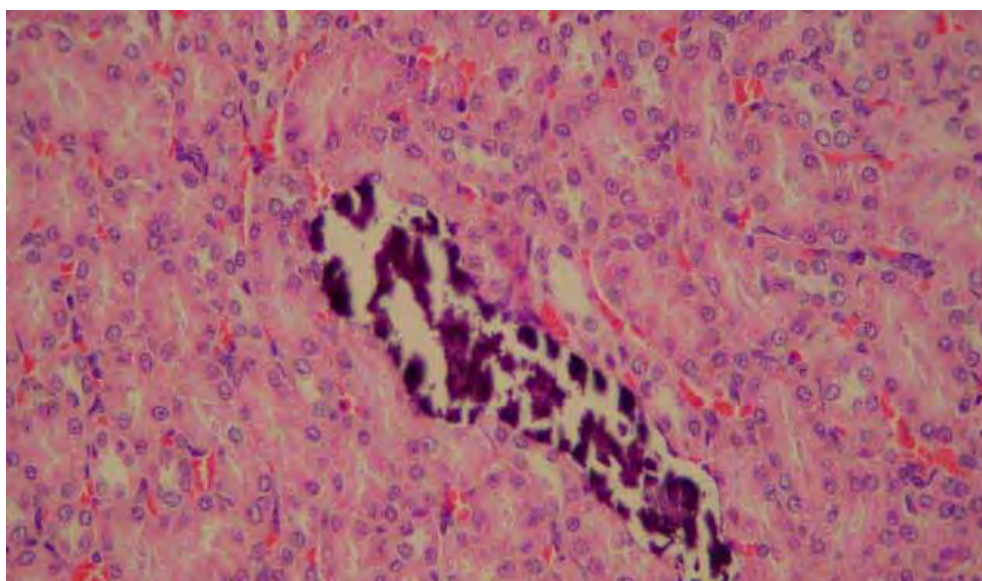


Figura 9. Fotomicrografia do rim de rata prenhe com pré-eclâmpsia induzida por L-NAME, apresentando nefrocalcinose. HE. 400X.

Avaliação da performance reprodutiva

A Tabela 4 apresenta os dados da performance reprodutiva dos grupos estudados. Comparando o grupo L-NAME com os grupos que receberam silibinina verifica-se que, o grupo que recebeu silibinina desde o dia zero apresentou número significativamente maior de fetos vivos que o grupo que recebeu apenas L-NAME. O número de reabsorções foi significativamente menor no grupo tratado com silibinina desde o dia zero, quando comparado com o grupo tratado apenas com L-NAME. O peso dos recém-nascidos do grupo L-NAME e dos grupos tratados com silibinina foi significativamente menor do que o peso do grupo controle. A percentagem de perda pós-implantação foi significativamente maior no grupo L-NAME em comparação aos demais grupos.

Tabela 4. Média e erro padrão da performance reprodutiva de ratas controle, tratadas com L-NAME e tratadas com L-NAME + silibinina em diferentes períodos da prenhez.

Variáveis	Grupos				
	Controle n: 6	L-NAME n: 6	S – 0 n: 6	S – 7 n: 7	S – 14 n: 9
No. corpos lúteos	12,17 ± 0,98	13,14 ± 1,03	12,67 ± 0,76	13,0 ± 0,49	12,33 ± 0,71
No. fetos vivos	8,67 ± 0,92	4,88 ± 1,73	9,00 ± 1,39 *	8,00 ± 1,72	8,11 ± 1,23
No. reabsorções	0,50 ± 0,34	4,17 ± 1,82	0,67 ± 0,21 *	1,71 ± 0,52	1,44 ± 0,67
No. implantações	9,17 ± 0,87	10,67 ± 1,76	9,67 ± 1,49	10,71 ± 1,39	9,56 ± 1,07
Peso médio fetos	4,71 ± 0,05 +	3,99 ± 0,07	4,18 ± 0,33	4,10 ± 0,22	4,08 ± 0,09
Peso médio placenta	0,46 ± 0,01	0,43 ± 0,05	0,42 ± 0,02	0,45 ± 0,01	0,44 ± 0,02
Índice placentário	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Ganho peso materno	66,23 ± 6,33	41,05 ± 5,77	47,22 ± 9,02	50,33 ± 10,45	42,87 ± 5,95
% perda pós-implantação	5,00 ± 4,80	46,33 ± 12,87 **	6,21 ± 2,03	17,89 ± 6,88	15,59 ± 7,86

* (p<0,05) vs L-NAME;

+ (p<0,05) vs L-NAME, S-0, S-7, S-14;

** (p<0,05) vs controle, S-0, S-7, S-14

DISCUSSÃO

Encontrar uma substância que impeça o desenvolvimento da pré-eclâmpsia tem sido objetivo constante da literatura obstétrica, com resultados desanimadores. Enquanto a doença não pode ser prevenida, suas complicações continuam mantendo altas as taxas de morbimortalidade materna e perinatal.

Entre as complicações dessa doença, as mais graves são a eclâmpsia e a síndrome HELLP. A primeira tem tratamento clínico (sulfato de magnésio) eficaz, enquanto para a segunda não existe tratamento clínico, sendo a melhor terapêutica a resolução da gestação, independente da idade gestacional.

O modelo de inibição crônica da enzima óxido nítrico sintase, pelo tratamento de ratas prenhes com Nw-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), é aceito como método experimental para induzir hipertensão arterial, resultando em condição semelhante à pré-eclâmpsia (Yallampalli & Garfield, 1993; Salas, 1998; Kanashiro et al., 2000).

Utilizando esse modelo experimental, vários estudos documentam aspectos como aumento da resposta vascular in vivo (Buhimschi et al., 1995) e in vitro (Khalil et al., 1998; Kublickrene et al., 2000), diminuição ou bloqueio do relaxamento do endotélio dos vasos (Maeso et al., 1999; Takiuti et al., 1999), hiperativação de enzimas sensíveis ao cálcio, como a proteinquinase C (Carter et al., 2002) e alteração da remodelação das artérias uterinas (Osol et al., 2009).

A literatura mostra que, em ratos, a silimarina é benéfica, atuando como agente protetor de diferentes agressões induzidas no parênquima hepático. Assim, é eficaz na recuperação da bomba de liberação do sal biliar (Crocenzi et al., 2005); tem efeito inibidor da glucoronidação, auxiliando no controle da mesma

no tratamento de doenças hepáticas (D'Andrea et al., 2005); neutraliza o estresse oxidativo causado pela colestase hepática (Muriel & Moreno, 2004) e exerce efeito protetor hepático contra a intoxicação por chumbo (Shalan et al., 2005). É capaz de prevenir fibrose hepática (Mourelle et al., 1989, Muriel & Mourelle, 1990), porém não consegue revertê-la (Muriel et al., 2005).

O presente estudo mostrou que, em ratas prenhes a silibinina modificou alguns dos efeitos produzidos pelo L-NAME, administrado cronicamente (do 10º. ao 20º.dia), em diferentes órgãos.

A administração de L-NAME determinou alterações histopatológicas nos rins, caracterizadas por necrose tubular aguda, degeneração hialina goticular, nefrosclerose arterial e arteriolar e, nefrocalcinose, que se mantiveram mesmo com o tratamento com silibinina. Apesar do estudo histopatológico não mostrar diferenças significativas entre os grupos que receberam L-NAME, houve recuperação da função renal, representada pela redução da proteinúria causada pelo L-NAME, em todos os grupos que receberam silibinina. Gaedeke et al. (1996) mostraram que, a silibinina protegeu o rim ao reverter, parcial ou totalmente, as lesões causadas pela cisplatina, sugerindo seu papel nefroprotetor. Helmbrecht et al. (1996) também encontraram lesão renal (aumento da proporção de glomérulos anormais), que foi restaurada pela administração de L-arginina no final da prenhez (16º. dia). Nestas ratas houve queda no valor da proteinúria e na proporção de lesão glomerular.

O fígado das ratas que receberam L-NAME apresentou alterações histopatológicas caracterizadas por alteração da arquitetura acinar, hipertrofia dos hepatócitos, dilatação sinusoidal e infiltrado inflamatório. A silibinina teve efeito reconstrutor, pois as alterações citadas se mantiveram, porém em intensidade

menor. As concentrações de aspartato aminotransferase e de alanina aminotransferase, que se alteraram pela ação do L-NAME, nos grupos que receberam silibinina retornaram aos valores de normalidade. A concentração de TNF-alfa em homogenato de fígado também foi significativamente maior no grupo L-NAME, mostrando redução significativa nos grupos que receberam silibinina.

O comprometimento hepático provocado pelo L-NAME é referido pela literatura. Assim, Tarsitano et al. (2007), administrando esquema crônico de L-NAME a ratas, causaram alterações morfológicas caracterizadas por hipertrofia vascular nas artérias hepáticas, com fibrose perivascular e intersticial, incluindo deposição de colágeno. Também verificaram aumento do glicogênio hepático, porém sem alterações nas concentrações de colesterol e triglicérides.

A contagem de plaquetas, que associada a avaliação da função hepática, são marcadores da síndrome HELLP, também mostrou queda significativa no grupo L-NAME, com recuperação nos grupos tratados com silibinina. Segundo Fürstenau et al. (2008), a administração de L-NAME em ratas reduziu a hidrólise de ATP, ADP e AMP nas plaquetas em cerca de 27%, 24% e 36% respectivamente.

Esse conjunto de dados caracterizam o papel de agente protetor hepático da silibinina, já bem documentado em portadores de insuficiência hepática, porém ainda não relatado em gestantes.

A expressão do TNF- α , tanto no plasma, como nos homogenatos de fígado e placenta, foi significativamente maior no grupo tratado com L-NAME, quando comparado com os demais grupos (controle e tratados com silibinina). Entre os grupos que receberam silibinina, a concentração de TNF- α foi significativamente

maior no grupo que recebeu silibinina a partir do 14º. dia de prenhez. Entretanto, esses resultados foram significativamente menores do que os obtidos em animais apenas tratados com L-NAME. Tsukimori et al. (2008) encontraram níveis elevados de TNF- α no soro de animais tratados com L-NAME, no período de 8 a 14 dias de prenhez. Segundo os autores, a fonte celular de TNF- α nos animais tratados com L-NAME é ainda desconhecida. Estudos *in vitro* demonstraram que a placenta, submetida à hipóxia seguida de reoxigenação determina aumento da síntese de TNF- α , sugerindo que o trofoblasto placentário pode ser o sítio potencial de síntese dessa citocina (Benyo et al., 1997). Além disso, células do estroma, provavelmente macrófagos, parecem ser produtoras de TNF- α na placenta (Hung et al., 2004). A isquemia placentária e a hipóxia induzida leva à redução crônica na pressão de perfusão uterina nas ratas prenhes, aumentando a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6 (Giardina et al., 2002; LaMarca et al., 2005). Assim, os níveis elevados de TNF- α em homogenato de placenta, obtidos no presente trabalho, corroboram a hipótese de que essa citocina pode ser sintetizada por células da placenta.

Os níveis de TNF- α , detectados no homogenato de fígado de animais tratados com L-NAME, foram significativamente mais elevados em relação aos grupos tratados com L-NAME e que receberam silibinina em diferentes períodos de prenhez. A alta concentração de TNF- α no fígado dos animais do grupo L-NAME se associou com infiltrado inflamatório intenso, distribuído em focos dispersos pelo parênquima hepático e principalmente no espaço periportal. Esses resultados sugerem a participação do TNF- α na patogênese das alterações hepáticas, induzidas por L-NAME. Dhanasekaran et al. (2009) detectaram níveis significativamente elevados de TNF- α em homogenato de fígado de ratos

submetidos à indução de hepatotoxicidade por tratamento com tetracloreto de carbono (CCl_4). É descrito que CCl_4 ativa células de Kupffer, resultando na liberação de mediadores pró-inflamatórios como IL-1, IL-6, $\text{TNF-}\alpha$ e prostaglandinas por essas células, facilitando a infiltração de células inflamatórias, vacuolização e necrose das células hepáticas (Basu, 2003; Wang et al., 2005). $\text{TNF-}\alpha$ induz expressão de COX-2, levando à síntese de prostaglandinas, que tem papel quimiotático e participam nas alterações vasculares associadas à inflamação (Feng et al., 1995; Padhy et al., 2007). Em conjunto, os níveis elevados de $\text{TNF-}\alpha$, detectados no homogenato de placenta e fígado, podem ter contribuído para os valores obtidos no plasma dos animais tratados com L-NAME e sugerem a produção sistêmica dessa citocina. Altas concentrações de $\text{TNF-}\alpha$ foram obtidas tanto no soro (Benyo et al., 2001; Peraçoli et al., 2007) como na placenta de pacientes com pré-eclâmpsia (Peraçoli et al., 2008). Em gestantes com pré-eclâmpsia, avaliadas no terceiro trimestre da gestação, observou-se que monócitos são importantes fontes de $\text{TNF-}\alpha$, responsáveis, em parte, pelos níveis elevados da citocina detectados no soro das pacientes (Peraçoli et al., 2007).

O tratamento com silibinina causou redução dos níveis de $\text{TNF-}\alpha$ no fígado, placenta e plasma dos animais tratados com L-NAME, mostrando o efeito anti-inflamatório desse flavonóide. A diminuição da concentração de $\text{TNF-}\alpha$ no fígado se associou à redução do infiltrado inflamatório, que se restringiu a pequenos focos no espaço periportal. Além do efeito anti-inflamatório, a silibinina apresentou propriedades anti-oxidantes, aumentando os níveis de SOD e diminuindo os de MDA, considerado um índice de peroxidação lipídica e, também efeito hepatoprotetor, diminuindo os níveis de enzimas hepáticas. O estresse oxidativo,

avaliado pelas concentrações de MDA e de SOD, sofreu inibição pela ação da silibinina, em todos os períodos da prenhez em que foi administrada.

É bem conhecido o efeito anti-oxidante e hepatoprotetor da silibinina no tratamento de lesão hepática em ratos, induzida por ingestão de etanol ou CCl_4 (Muriel et al., 2005; Das & Vasudevan, 2006; Dhanasekaran et al., 2009). Entretanto, este é o primeiro estudo empregando silibinina com o objetivo de atenuar os efeitos da indução de pré-eclâmpsia com L-NAME em ratas. Os efeitos da silibinina, prevenindo o estresse oxidativo e a liberação de $\text{TNF-}\alpha$, além do efeito hepatoprotetor no modelo experimental de pré-eclâmpsia induzido por L-NAME podem sugerir o seu emprego no tratamento de pacientes com pré-eclâmpsia.

A silibinina melhorou a performance reprodutiva das ratas que receberam L-NAME, uma vez que aumentou o número de fetos vivos, reduziu o número de reabsorções e a % de perda pós-implantação. Esses dados corroboram a literatura que também verifica resultado perinatal ruim em ratas tratadas com L-NAME (Yallampalli et al., 1993; Helmbrecht et al., 1996; Richer et al., 1996; Mayr et al., 2005; Moura et al., 2006; Vanderlelie & Perkins, 2006). O L-NAME determina alterações da vascularização útero-placentária (Mayr et al., 2005; Vanderlelie & Perkins, 2006), prejudicando o desenvolvimento adequado dos fetos. Richer et al. (1996), administraram um doador de óxido nítrico (molsidomine) e verificaram maior redução do número e do peso dos fetos, acreditando os autores que o efeito hipotensor dessa substância contribuiu para esses achados. A administração de L-arginina aumentou significativamente o peso fetal, mas não alterou o tamanho da ninhada (Helmbrecht et al., 1996).

Moura et al. (2007) conseguiram corrigir a morbidade perinatal tratando as ratas prenhes com extrato hidroalcoólico de casca de uva.

A silibinina ainda não foi empregada em gestantes e, em animais prenhes, também não há relatos do seu uso para tratamento dos efeitos do L-NAME.

Segundo Kren & Walterová (2005), ainda se desconhecem as bases moleculares da ação anti-inflamatória e anticarcinogênica da silibinina. Podem estar relacionadas com a inibição da transcrição do fator NF-KB, que regula e coordena a expressão de vários genes envolvidos no processo inflamatório, na citoproteção e na carcinogênese. Especificamente, o NF-KB contribui para a produção de interleucinas IL-1 e IL-6, TNF- α , do fator estimulador de colônias de granulócito-macrófagos (GM-CSF) e de interferon. Mais ainda, algumas dessas substâncias como a IL-1 e o TNF- α ativam o NF-KB proporcionando um feedback positivo (Saliou et al., 1998; Bremmer & Heinrich, 2002). Do mesmo modo que a silibinina, drogas de ação anti-inflamatória como salicilato sódico e aspirina, também bloqueiam a ativação de NF-KB prevenindo a degradação do I κ B-alfa. Entretanto, o efeito da silibinina se obtém com concentração cem vezes menor que a do salicilato, sugerindo ser essa substância um potente inibidor sem toxicidade importante (Manna et al., 1999).

Em conclusão, os resultados do presente trabalho demonstraram o efeito protetor da silibinina em modelo experimental de pré-eclâmpsia induzido por L-NAME em ratas e representado por efeito nefroprotetor, reduzindo a proteinúria, hepatoprotetor, normalizando os valores das enzimas hepáticas e melhorando a performance reprodutiva das ratas. Além disso, apresentou propriedades antioxidante e anti-inflamatória, reduzindo o estresse oxidativo e a produção de altas

concentrações de $\text{TNF-}\alpha$ respectivamente, considerados importantes fatores na patogênese da pré-eclâmpsia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal R, Agarwal C, Ichikawa H, Singh RP, Agarwal BB. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer Res.* 2006; 26:4457-98.

Akyol D, Mungan T, Gökemli H, Nuhoglu G. Maternal levels of vitamin E in normal and preeclamptic pregnancy. *Arch Gynecol Obstet.* 2000; 263:151-5.

Bannwart CF, Peraçoli JC, Nakaira-Takahagi E, Peraçoli MTS. Inhibitory effect of silibinin on tumor necrosis factor- α and hydrogen peroxide production by human monocytes. *Natural Prod Res* 2009 (no prelo).

Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology* 2003;189:113-27.

Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:2505-12.

Bremmer P, Heinrich M. Natural products as targeted modulators of nuclear factor κ B pathway. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54:453-72.

Buhimschi I, Yallampalli C, Chwalisz K, Garfield RE. Pre-eclampsia-like conditions produced by nitric oxide inhibition: effects of L-arginine, D-arginine and steroid hormones. *Hum Reprod.* 1995; 10:2723-30.

Calderon IMP; Rudge MVC; Brasil MAM; Henry MACA. Diabetes e gravidez experimental em ratas. I - Indução do diabetes, obtenção e evolução da prenhez. *Acta Cirur Bras* 1992; 7:142-6.

Carter RW, Begaye M, Kanagy NL. Acute and chronic NOS inhibition enhances $\alpha(2)$ -adrenoreceptor-stimulated RhoA and Rho kinase in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283:H1361-9.

Chen D, Wang H, Huang H, Dong M. Vascular endothelial growth factor attenuates Nomega-nitro-L-arginine methyl ester-induced preeclampsia-like manifestations in rats. *Clin Exp Hypertens*. 2008; 30:606-15.

Crocenzi FA, Basiglio CL, Pérez LM, Portesio MS, Pozzi EJ, Roma MG. Silibinin prevents cholestasis-associated retrieval of the bile salt export pump, Bsep, in isolated rat hepatocyte couplets: possible involvement of cAMP. *Biochem Pharmacol*. 2005; 69:1113-20.

Damasceno DC, Volpato GT, Person OC, Toshida A, Calderon IMP, Rudge MVC. Efeito do ácido acetilsalicílico na performance reprodutiva e na prole de ratas Wistar. *Rev Assoc Med Bras*. 2002; 48:312-6.

Das SK, Vasudevan DM. Protective effects of silymarin, a milk thistle (*Silybum marianum*) derivative on ethanol-induced oxidative stress in liver. *Indian J Biochem Biophys*. 2006; 43:306-11.

Dhanasekaran M, Ignacimuthu S, Agastian P. Potential hepatoprotective activity of ononitol monohydrate isolated from *Cassia tora* L. on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in wistar rats. *Phytomedicine*. 2009; 16:891-5.

D'Andrea V, Perez LM, Sanchez Pozzi EJ. Inhibition of rat liver UDP-glucuronosyltransferase by silymarin and the metabolite silibinin-glucuronide. *Life Sci*. 2005; 77:683-92.

Dehmlow C, Murawski N, Groot H. Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of arachidonic acid metabolism by silibinin in human cells. *Life Sci*. 1996; 58:1591-600.

Dooley DP, Cox RA, Hestilow KL, Dolan MJ, Magee DM. Cytokine induction in human coccidioidomycosis. *Infect Immun*. 1994; 62:3980-3.

Faas MM, Schuiling GA. Pre-eclampsia and the inflammatory response. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001; 95:213-7.

Falasca K, Ucciferri C, Mancino P, Vitacolonna E, De Tullio D, Pizzigallo E, Conti P, Vecchiet J. Treatment with silybin-vitamin E-phospholipid complex in patients with hepatitis C infection. *J Med Virol.* 2008; 80:1900-6.

Fehér J, Láng I, Nékám K, Csomós G, Müzes G, Deák G. Effect of silibinin on the activity and expression of superoxide dismutase in lymphocytes from patients with chronic alcoholic liver disease. *Free Radic Res Commun.* 1987; 3:373-7.

Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J Clin Invest.* 1995; 95:1669-75.

Ferenci P, Dragosics B, Dittrich H, Frank H, Benda L, Lochs H, Meryn S, Base W, Schneider B. Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. *J Hepatol.* 1989; 9:105-13.

Ferreira AL, Machado PE, Matsubara LS. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes and glutathione levels in human erythrocytes exposed to colloidal iron hydroxide in vitro. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32:689-94.

Fürstenau CR, Trentin Dda S, Gossenheimer AN, Ramos DB, Casali EA, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ. Ectonucleotidase activities are altered in serum and platelets of L-NAME-treated rats. *Blood Cells Mol Dis.* 2008; 41:223-9.

Gaedeke J, Fels LM, Bokemeyer C, Mengs U, Stolte H, Lentzen H. Cisplatin nephrotoxicity and protection by silibinin. *Nephrol Dial Transplant.* 1996; 11:55-62.

Giardina JB, Green GM, Cockrell KL, Granger JP, Khalil RA. TNF-alpha enhances contraction and inhibits endothelial NO-cGMP relaxation in systemic vessels of pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 283:R130-43.

Helmbrecht GD, Farhat MY, Lochbaum L, Brown HE, Yadgarova KT, Eglinton GS, Ramwell PW. L-arginine reverses the adverse pregnancy changes induced by nitric oxide synthase inhibition in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175:800-5.

Hung TH, Charnock-Jones DS, Skepper JN, Burton GJ. Secretion of tumor necrosis factor- α from human placental tissues induced by hypoxia-reoxygenation causes endothelial cell activation in vitro: a potential mediator of the inflammatory response in preeclampsia. *Am J Pathol*. 2004; 164:1049-61.

Ikemoto S, Sugimura K, Yoshida N, Wada S, Yamamoto K, Kishimoto T. TNF α , IL-1 β and IL-6 production by peripheral blood monocytes in patients with renal cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2000; 20:317-21.

Johnson VJ, He Q, Osuchowski MF, Sharma RP. Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in Balb/c mice: Silymarin inhibits T-lymphocyte function at low doses but stimulates inflammatory processes at high doses. *Planta Med*. 2003; 69:44-9.

Kanashiro CA, Cockrell KL, Alexander BT, Granger JP, Khalil RA.. Pregnancy-associated reduction in vascular protein kinase C activity rebounds during inhibition of NO synthesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000; 278:R295-303.

Kang JS, Jeon YJ, Kim HM, Han SH, Yang KH. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; 302:138-44.

Khalil RA, Crews JK, Novak J, Kassab S, Granger JP. Enhanced vascular reactivity during inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats. *Hypertension*. 1998; 31:1065-9.

Kren V, Walterova D. Silybin and silymarin: new effects and applications. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2005; 149:29-41.

Kublickiene KR, Nisell H, Poston L, Krüger K, Lindblom B. Modulation of vascular tone by nitric oxide and endothelin 1 in myometrial resistance arteries from pregnant women at term. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 182:87-93.

Kvasnicka F, Biba B, Sevcik R, Voldrich M, Kratka J. Analysis of the active components of silymarin. *J Chromatogr A*. 2003; 990:239-45.

La Grange L, Wang M, Watkins R, Ortiz D, Sanchez ME, Konst J et al. Protective effects of the flavonoid mixture, silymarin, on fetal rat brain and liver. *J Ethnopharmacol*. 1999; 65:53-61.

LaMarca BB, Bennett WA, Alexander BT, Cockrell K, Granger JP. Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of tumor necrosis factor- α . *Hypertension*. 2005; 46:1022-5.

Lelli G, Montanari M, Gilli G, Scapoli D, Antonietti C, Scapoli D. Treatment of the cancer anorexia-cachexia syndrome: a critical reappraisal. *J Chemother*. 2003; 15:220-5.

Maeso R, Navarro-Cid J, Rodrigo E, Ruilope LM, Cachofeiro V, Lahera V. Effects of antihypertensive therapy on factors mediating endothelium-dependent relaxation in rats treated chronically with L-NAME. *J Hypertens*. 1999; 17:221-7.

Mahoney JJ, Vreman HJ, Stevenson DK, Van Kessel AL. Measurement of carboxyhemoglobin and total hemoglobin by five specialized spectrophotometers (CO-oximeters) in comparison with reference methods. *Clin Chem*. 1993; 39:1693-700.

Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, Aggarwal BB. Silymarin suppress TNF-induced activation of NF- κ B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J Immunol*. 1999; 163:6800-9.

Mayr AJ, Lederer W, Wolf HJ, Dünser M, Pfaller K, Mörtl MG. Morphologic changes of the uteroplacental unit in preeclampsia-like syndrome in rats. *Hypertens Pregnancy*. 2005; 24:29-37.

Molnár M, Sütö T, Tóth T, Hertelendy F. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;170:1458-66.

Moreland N, La Grange L, Montoya R. Impact of in utero exposure to EtOH on corpus callosum development and paw preference in rats: protective effects of silymarin. *BMC Complement Altern Med*. 2002; 2:10-5.

Moura RS, Resende AC, Moura AS, Maradei MF. Protective action of a hydroalcoholic extract of a vinifera grape skin on experimental preeclampsia in rats. *Hypertens Pregnancy*. 2007; 26:89-100.

Mourelle M, Muriel P, Favari L, Franco T. Prevention of CCL4-induced liver cirrhosis by silymarin. *Fundam Clin Pharmacol*. 1989; 3:183-91.

Muriel P, Mourelle M. Prevention by silymarin of membrane alterations in acute CCl₄ liver damage. *J Appl Toxicol*. 1990; 10:275-9.

Muriel P, Moreno MG. Effects of silymarin and vitamins E and C on liver damage induced by prolonged biliary obstruction in the rat. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004; 94:99-104.

Muriel P, Moreno MG, Hernandez Mdel C, Chavez E, Alcantar LK. Resolution of liver fibrosis in chronic CCl₄ administration in the rat after discontinuation of treatment: effect of silymarin, silibinin, colchicine and trimethylcolchicinic acid. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005; 96:375-80.

Muzes G, Deak G, Lang L, Nekam K, Gergely P, Feher J. Effect of the bioflavonoid silymarin on the in vitro activity and expression of superoxide dismutase (SOD) enzyme. *Acta Physiol Hung*. 1991; 78:3-9.

Neese S, La Grange L, Trujillo E, Romero D. The effects of ethanol and silymarin treatment during gestation on spatial working memory. *BMC Complement Altern Med*. 2004; 4:4-11.

Osol G, Barron C, Gokina N, Mandala M. Inhibition of Nitric Oxide Synthases Abrogates Pregnancy-Induced Uterine Vascular Expansive Remodeling. *J Vasc Res*. 2009; 46:478-86.

Padhy BM, Srivastava A, Kumar VL. Calotropis procera latex affords protection against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *J Ethnopharmacol*. 2007; 113:498-502.

Peraçoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PC, Marques SA, Soares AM. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*. 2003; 5:413-8.

Peraçoli JC, Rudge MV, Peraçoli MT. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2007; 57:177-85.

Peraçoli MTS, Lourenço NCV, Cristofalo R, Nakaira-Takahagi E, Bannwart CF, Peraçoli JC. Cytokines and pro- and anti-angiogenic factors in the placenta of pregnant women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2008; 27:430.

Pradhan SC, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res*. 2006; 124:491-504

Richer C, Boulanger H, Es-Slami S, Giudicelli JF. Lack of beneficial effects on the NO-donor, molsidomine, in the L-NAME-induced pre-eclamptic syndrome in pregnant rats. *Br J Pharmacol*. 1996; 119:1642-8

Rook GA, Taverne J, Leveton C, Steele J. The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumour necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology*. 1987; 62:229-34.

Salas SP. Role of nitric oxide in maternal hemodynamics and hormonal changes in pregnant rats. *Biol Res*. 1998; 31:243-50.

Saliou C, Rihn B, Cillard J, Okamoto T, Packer L. Selective inhibition of NF-kappaB activation by the flavonoid hepatoprotector silymarin in HepG2. Evidence for different activating pathways. *FEBS Lett*. 1998; 440:8-12.

Shalan MG, Mostafa MS, Hassouna MM, El-Nabi SE, El-Refaie A. Amelioration of lead toxicity on rat liver with Vitamin C and silymarin supplements. *Toxicology*. 2005; 206:1-15.

Souza CO, Damasceno DC, Dantas MF, Sinzato Y, Iessi EL, Peraçoli MTS, Peraçoli JC. Absence of toxic effects of silybin on rats reproductive outcome. In: III Encontro de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Botucatu – SP, 2007.

Standley CA, Batia L, Yueh G. Magnesium sulfate effectively reduces blood pressure in an animal model of preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2006;19:171-6.

Takagi Y, Nikaido T, Toki T, Kita N, Kanai M, Ashida T, Okira S, Konishi I. Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. *Virchows Arch*. 2004; 444: 49-55.

Takei H, Nakai Y, Hattori N, Yamamoto M, Takeda S, Yamamoto M, Arishima K. The herbal medicines Saireito and Boiogito improve the hypertension of pre-eclamptic rats induced by Nomega-Nitro-L-arginine methyl ester. *Phytomedicine*. 2007; 14:591-600.

Takiuti NH, Carvalho MH, Kahhale S, Nigro D, Barbeiro HV, Zugaib M. The effect of chronic nitric oxide inhibition on vascular reactivity and blood pressure in pregnant rats. *Sao Paulo Med J.* 1999; 117:197-204.

Tarsitano CA, Paffaro VA Jr, Pauli JR, da Silva GH, Saad MJ, Salgado I, da Cruz-Höfling MA, Hyslop S. Hepatic morphological alterations, glycogen content and cytochrome P450 activities in rats treated chronically with N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). *Cell Tissue Res.* 2007; 329:45-58.

Tsukimori K, Komatsu H, Fukushima K, Kaku T, Nakano H, Wake N. Inhibition of nitric oxide synthetase at mid-gestation in rats is associated with increases in arterial pressure, serum tumor necrosis factor-alpha, and placental apoptosis. *Am J Hypertens.* 2008; 21:477-81.

Vanderlelie JJ, Perkins AV. Chronic nitric oxide synthase inhibition in pregnant rats does not result in placental oxidative stress. *Hypertens Pregnancy.* 2006;25:103-14.

Valenzuela A, Aspillaga M, Vial S, Guerra R. Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. *Planta Med.* 1989; 55:420-2.

Valenzuela A, Garrido A. Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. *Biol Res.* 1994; 27:105-12.

Vince GS, Starkey PM, Austgulen R, Kwiatkowski D, Redman CW. Interleukin-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1995; 102:20-5.

Wang H, Wei W, Wang NP, Gui SY, Wu L, Sun WY, Xu SY. Melatonin ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stress. *Life Sci.* 2005; 77:1902-15.

Wellington K, Jarvis B. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *Bio Drugs*. 2001; 15:465-89.

Yallampalli C, Garfield RE. Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1993; 169:1316-20.

Yao-Cheng R. Advances in pharmacological studies of silymarin. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86:79-85

Zhang JP, Hu ZL, Feng ZH, Lin W, Yu XB, Qian DH. Effect of silymarin on mouse liver damage, production and activity of tumor necrosis factor. *Yao Xue Xue Bao*. 1996; 31:577-80.