

Bruno Diaz Paredes

**MODELO EXPERIMENTAL PARA LESÃO HEPÁTICA
CRÔNICA INDUZIDA POR TETRACLORETO DE CARBONO
E ÁLCOOL: avaliação de parâmetros para diagnóstico
indireto de cirrose**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
VISANDO À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (FISIOLOGIA)



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Paredes, Bruno Diaz

Modelo experimental animal para lesão hepática crônica induzida por tetracloreto de carbono e álcool: Avaliação de parâmetros para diagnóstico indireto de cirrose.

x.150 f.: il.

Dissertação (Mestrado em ciências biológicas – Fisiologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – IBCCF, 2005.

Orientador: Goldenberg, Regina Coeli dos Santos

1. Modelo Experimental. 2. Cirrose. 3. Diagnóstico Indireto.

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. II. Título.

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Cardiologia Celular e Molecular (LCCM) e Eletrofisiologia Cardíaca Antônio Paes de Carvalho, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, sob orientação da Prof^a Dr^a Regina Coeli dos Santos Goldenberg e contou com o apoio financeiro das entidades: CNPq, IMBT, CAPES, FAPERJ, FUJB.

Contou ainda com a grande colaboração do Laboratório de Patologia Celular do Departamento de Histologia e Embriologia da UFRJ, chefiado pela Dr^a Christina Maeda Takyia, do Departamento de Clínica Médica e do Serviço de Hepatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, e do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Pró-Cardíaco.

Agradecimentos

Aos meus pais, pela dedicação, carinho e pela orientação para a vida.

Aos meus irmãos David, Alexandre e Bianca, pelo carinho e amizade.

À Patrícia, pela compreensão, pelo amor, carinho, amizade.

À Professora Regina Goldenberg e Professor Antônio Carlos Campos de Carvalho, pela compreensão, pela orientação, sugestões e pelo apoio a este lindo projeto.

Ao Professor Guilherme, pelas sugestões e envolvimento no desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Christina Takiya, pela imensa ajuda em todas as etapas do trabalho. Muito Obrigado!

A Dra. Célia Resende, pela imensa ajuda com a metodologia para os exames de ultra-som, e por mostrar um mundo novo.

Aos meus amigos hepáticos: Juliana Dias, Luiz Fernando Mesquita e Andréia Lessa, amigos guerreiros nesta árdua batalha, por toda a ajuda moral e técnica na execução deste trabalho. Cirrose neles, gente!

Aos demais hepáticos: Adriana, Luisa, Eduardo Alemão, Rafaela, Daniela, Helder e Vanderson que deram um suporte fundamental neste trabalho.

Aos amigos de bancada que vez por outra me aturaram com minhas brincadeiras e intromissões científicas: Daisy, João Pedro, Vanessa, Norminha, Vanessa, Carol, Patrícia Fidelis, Juliana Silva, Stephan, Bruno Esporcatte, Fabio, Felipe, Diogo e todos que passaram pelo laboratório.

À todos dos Laboratórios de Cardiologia Celular e Molecular e de Eletrofisiologia Cardíaca Antônio Paes de Carvalho.

Ao CNPq, FINEP, FAPERJ, CEPEG e PRONEX pelo suporte financeiro.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 – Introdução	p.1
1.1 – Hepatopatias Crônicas: Considerações Gerais	p.1
1.2 – O Fígado	p.5
1.2.1 – Função e Anatomia	p.5
1.2.2 – Unidades Estruturais e Funcionais do fígado	p.7
1.2.3 – Estruturas Intra-hepáticas	p.10
1.2.4 – Ecossistema Hepático	p.12
1.3 – Fisiopatologia Hepática	p.17
1.3.1 – Fibrose Hepática	p.17
1.3.2 – Estímulos de Indução	p.19
1.3.3 – Ativação das HSCs	p.23
1.3.4 – Síntese e Degradação de Colágeno	p.26
1.3.5 – Cirrose Hepática	p.27
1.4 – Modelos Experimentais para Indução de Lesão Hepática	p.29
1.4.1 – Indução por Tetracloreto de Carbono	p.30
1.4.2 – Mecanismos de Ação do CCl ₄	p.32
2 – OBJETIVOS	p.36
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	p.37
3.1 – Animais	p.37
3.2 – Preparação da Dieta Líquida Completa e Alcoólica	p.37
3.3 – Modelo Experimental de Hepatopatia Crônica	p.38
3.4 – Análises Histológicas	p.40
3.4.1 – Emblocamento em Parafina	p.40
3.4.2 – Coloração por Hematoxilina e Eosina	p.41
3.4.3 – Coloração por Picrosírius	p.42
3.5 – Análises Bioquímicas	p.43
3.5.1 – Coleta e Processamento de Amostra de Sangue	p.43
3.5.1 – Teste de Análises Clínicas	p.43
3.6 – Análises Ultra-sonográficas	p.44
3.6.1 – Exames de Ultra-som	p.44
3.6.2 – Estadiamento por Ultra-som	p.47
3.7 – Análises Ultra-sonográficas	p. 48
4 – RESULTADOS	p.49
4.1 – Peso dos Animais e Consumo das Dietas Líquidas	p.49
4.1.1 – Peso dos Animais durante o Experimento	p.49
4.1.2 – Consumo da Dieta Líquida e Ingestão de Etanol	p.53
4.2 – Análise Macroscópica do Fígado	p.57
4.3 – Análise Microscópica do Fígado	p.62
4.4 – Análises dos Parâmetros de Bioquímica	p.68
4.4.1 – Testes Bioquímicos para Enzimas Hepáticas	p.68
4.4.2 – Testes Bioquímicos para Função Hepática	p.74
4.5 – Análise dos Parâmetros Ultra-sonográficos	p.80
4.5.1 – Ecotextura Hepática	p.80
4.5.2 – Ecogenicidade Hepática versus Ecogenicidade Renal	p.85
4.5.3 – Diâmetro Transverso do Fígado	p.90
4.5.4 – Calibre e Tortuosidade da Veia Porta	p.94
4.5.5 – Presença de Ascite	p.102
4.5.6 – Estadiamento do Fígado por Ultra-som	p.103
5 – DISCUSSÃO	p.107
6 – CONCLUSÕES	p.118
7 – REFERÊNCIAS	p.119

RESUMO

O desenvolvimento de modelos experimentais *in vivo* para indução de lesão hepática crônica é necessário para compreender os mecanismos envolvidos na fisiopatologia de hepatopatias crônicas, tais como fibrose e cirrose, bem como suas complicações clínicas. Além disso, tais modelos são ferramentas muito úteis para avaliação do potencial de novas terapias, como o transplante de células tronco. Nossos estudos buscam estabelecer um modelo de cirrose hepática através da associação de tetracloreto de carbono (CCl_4) e etanol, e avaliar os métodos de diagnóstico indireto (parâmetros bioquímicos e ultra-sonográficos) que se correlacionam com as alterações histopatológicas dos fígados cirróticos.

Ratos Wistar fêmeas foram divididos em dois grupos. Cada grupo recebeu uma dieta líquida baseada na preparação de Lieber-DeCarli, com ou sem adição de etanol (Grupo A e Grupo C, respectivamente). Os animais de cada grupo foram tratados com: injeções i.p de CCl_4 a 20% (dose = 0,05ml/kg de peso corporal) diluídos em veículo (grupos A3 e C3); injeções i.p. de veículo (grupos A2 e C2); ou não receberam injeções (grupos C1 e A1). As injeções foram administradas vezes em uma semana, ao longo de 12 semanas. Os diagnósticos histopatológicos, os testes sorológicos e exames ultra-sonográficos foram realizados nos períodos de 0, 4, 8 e 12 semanas de experimento. Ao final de 12 semanas, os ratos foram sacrificados.

Os animais dos grupos C1, C2, A1 e A2 apresentaram padrões normais em todos os parâmetros avaliados (histológico, bioquímico e ultra-sonográfico) quando comparado ao grupo RP (CVP- $0,16 \pm 0,02$ cm; AST- 97 ± 31 U/L; ALT- 51 ± 10 U/L; BilT- $0,45 \pm 0,24$ mg/dL; Alb- $3,2 \pm 0,2$ g/dL) ao final de 12 semanas de experimento. Já os animais dos grupos C3 e A3 demonstraram padrão de cirrose hepática através da análise histopatológica, apresentando septos fibrosos e nódulos de regeneração ao final de 12 semanas. Entretanto, somente o grupo A3 demonstrou diferenças significativas nas análises bioquímicas - AST (456 ± 58 ; $P < 0,001$), ALT (206 ± 115 ; $P < 0,01$), Tbil ($1,59 \pm 0,8$; $P < 0,001$), Alb ($2,3 \pm 0,5$; $P < 0,001$) e nos parâmetros ultra-sonográficos, tais como: aumento da ecogenicidade hepática, aumento da EcoH em relação a EcoR, aumento significativo do CVP ($0,23 \pm 0,03$; $P < 0,001$).

A associação de CCl_4 e etanol foi capaz de induzir cirrose hepática em ratos. As alterações ultra-sonográficas e bioquímicas observadas se correlacionam com as alterações histopatológicas relacionadas à cirrose hepática. O exame ultra-sonográfico, em conjunto com a análise bioquímica, pode ser muito útil para o diagnóstico indireto da cirrose hepática neste modelo experimental.

ABSTRACT

The development of *in vivo* experimental models of chronic hepatic injuries is necessary to understand the mechanisms involved in pathophysiology of chronic hepatic diseases (hepatic fibrosis and cirrhosis) and its clinic complications. Moreover, such models are a very useful tool to evaluate the therapeutic potential of stem cell transplantation therapy. Our studies pretend to establish an associated CCl₄–alcohol-induced cirrhosis model, correlating indirect diagnostic methods (clinical chemistry and ultrasonography) and histology of cirrhotic livers.

Female Wistar rat divided in two groups and were fed with a liquid diet based on Liber-DeCarli's formule: a liquid diet with alcohol (Group A) and a liquid diet without alcohol (Group C). Animals received three different treatments: Groups A3 and C3 received i.p. injections of CCl₄ 20% (dose = 0,05mL/kg body weight) diluted in vehicle. Groups A2 and C2 received i.p. injections of vehicle. Groups A1 and C1 received no injections. Injections were administered for twelve weeks, three times weekly. Histopathologic diagnosis, blood marker tests and ultrasonographic exams were performed at 0, 4, 8 and 12 weeks of experiment.

Rats of groups C1, C2, A1 and A2 demonstrated a normal liver pattern in all histologic, ultrasonographic and blood markers analysis when compared to standard group (PVC=0,16±0,02 cm; AST=97±31 U/L; ALT=51±10 U/L; TBil=0,45±0,24 mg/dL; Alb=3,2±0,2 g/dL) along the experiment period. In contrast, rats in groups C3 and A3 demonstrated cirrhosis pattern, with fibrous septa and regenerative nodules at histologic analysis at the end of 12 weeks. However, only group A3 showed significant differences at blood clinical chemistry - AST (456±58; P<0,001), ALT (206±115; P<0,01), TBil (1,59±0,8; P<0,001), Alb (2,3±0,5; P<0,001) and ultrasonographic parameters, such as increased hepatic echogenicity pattern, increased EcoH vs EcoR, and significant augment of PVC (0,23±0,03; P<0,001).

Association of CCl₄ and alcohol induced cirrhosis in rats. Altered ultrasonographic and clinical chemistry parameters are correlated to histological changes related to cirrhosis pattern. Ultrasonography in conjunction with liver clinical chemistry may be useful in the evaluation of experimentally induced liver cirrhosis.

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1	p.6
Figura 2	p.9
Figura 3	p.11
Figura 4	p.12
Figura 5	p.19
Figura 6	p.20
Figura 7	p.40
Figura 8	p.46
Figura 9	p.52
Figura 10	p.54
Figura 11	p.59
Figura 12	p.61
Figura 13	p.65
Figura 14	p.67
Figura 15	p.70
Figura 16	p.71
Figura 17	p.73
Figura 18	p.75
Figura 19	p.77
Figura 20	p.79
Figura 21	p.82
Figura 22	p.87
Figura 23	p.91
Figura 24	p.92
Figura 25	p.93
Figura 26	p.96
Figura 27	p.97
Figura 28	p.98
Figura 29	p.99
Figura 30	p.102

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1	p.2
Tabela 2	p.3
Tabela 3	p.8
Tabela 4	p.38
Tabela 5	p.39
Tabela 6	p.47
Tabela 7	p.49
Tabela 8	p.54
Tabela 9	p.55
Tabela 10	p.56
Tabela 11	p.68
Tabela 12	p.74
Tabela 13.1	p.83
Tabela 13.2	p.83
Tabela 13.3	p.84
Tabela 13.4	p.84
Tabela 14.1	p.88
Tabela 14.2	p.88
Tabela 14.3	p.89
Tabela 14.4	p.89
Tabela 15.1	p.100
Tabela 15.2	p.100
Tabela 15.3	p.101
Tabela 15.4	p.101
Tabela 16.1	p.105
Tabela 16.2	p.105
Tabela 16.3	p.106
Tabela 16.4	p.106

LISTA DE ABREVIATURAS:

●CCl ₃ : Radical livre triclorometil	IL-1 : Interleucina-1
ALB : Albumina	IL-10 : Interleucina-10
ALT : Alanina aminotransferase	KCs : Células de Kupffer
APR : Resposta inflamatória de fase aguda	L-TGF- β_1 : Fator de Crescimento Transformante β_1 Latente
AST : Aspartato aminotransferase	MEOS : Sistema oxidativo enzimático microsomal
BiT : Bilirrubina Total	MMPs: Metaloproteinases de Matriz Extracelular
CCl ₃ O ₂ ● : Triclorometilperoxi	NO : Óxido nítrico
CCl ₄ : Tetracloreto de carbono	OSM : Oncostatina M
CFCs : Cloro-Flúor-Carbonos	PDGF : Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
CSF : Fator de Estimulação de Colônia	RNA : Ácido Ribonucléico
CYP2E1 : Citocromo P450 2E1	SECs : Células endoteliais sinusoidais
DDR : Receptor de domínio discoidina	TGF- β_1 : Fator de Crescimento Transformante Tipo β_1
DNA : Ácido Desoxirribonucléico	TIMPs : Inibidores Teciduais de Metaloproteinases
EGF : Fator de Crescimento de Epiderme	TNF- α : Fator de Necrose Tumoral – α
ET-1 : Endotelina-1	UPa : Plasminogênio tipo Uroquinase
FGF : Fator de Crescimento de Fibroblasto	VEGF : Fator de Crescimento de Endotélio Vascular
HGF : Fatores de Crescimento de Hepatócitos	VLDL : Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade
HSCs : Células Estreladas Hhepáticas	α -SMA : Actina- α de Músculo Liso
IGF-II : Fator de Crescimento de Insulina Tipo 2	

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Hepatopatias Crônicas

1.1.1 – Considerações Gerais

As hepatopatias crônicas são consideradas graves problemas de saúde pública, já que atingem uma grande parcela da população mundial e causam a morte de mais de 1,5 milhões de pessoas por ano, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2004).

Dentre as doenças hepáticas crônicas, as hepatites, em decorrência da infecção pelos vírus da hepatite B e da hepatite C, e as doenças hepáticas relacionadas ao consumo excessivo de álcool (etanol) são as doenças de maior relevância (Tabela 1). Estas doenças possuem alta incidência na população e há associação dos respectivos agentes etiológicos com o estabelecimento da cirrose hepática, doença hepática crônica avançada, cujo prognóstico é pouco favorável ao paciente.

Em relação as hepatites virais, estima-se que dos dois bilhões de pessoas infectadas pelo vírus da hepatite B, mais de 350 milhões poderão desenvolver hepatite crônica com alto risco de evolução para cirrose hepática e câncer de fígado (OMS, 2000). A infecção pelo vírus da hepatite C tem menor incidência mundial (170 milhões), porém, entre 70% a 80% dos pacientes infectados desenvolvem hepatopatias crônicas, e destes, cerca de 10% a 20% podem evoluir para a cirrose hepática (OMS, 2000).

Em se tratando do etanol, estima-se que de dois bilhões de pessoas que consomem bebidas alcoólicas, cerca de 76 milhões têm diagnóstico de desordem de consumo de álcool (OMS, 2004). No entanto, não são apenas estes que desenvolvem algum tipo de doença hepática. Os demais consumidores que fazem uso do álcool de forma moderada têm a chance de desenvolver esteatose e hepatite alcoólica, que se não tratadas devidamente, podem se estabelecer e evoluir para a cirrose hepática. Segundo dados da OMS, cerca de 32% dos casos de cirrose hepática tem relação com o consumo de etanol (ROOM *et al.*, 2005).

Tabela 1 – Principais Causas de Cirrose Hepática (SHERLOCK & DOOLEY, 2002).

Etiologia da Cirrose Hepática
Hepatite Viral (B, C e D)
Etanol
Metabólica
Colestática
Bloqueio de Fluxo Venoso Hepático
Hepatite Auto-Imune
Toxinas e drogas
Criptogênica

Independente do agente etiológico, quando a doença crônica do fígado não é tratada a tempo ou de forma correta, pode progredir e evoluir para a cirrose hepática (SHERLOCK & DOOLEY, 2002).

Dentre as doenças relacionadas ao fígado, a cirrose hepática está classificada entre as vinte principais causas de morte no mundo (Tabela 2), levando ao óbito cerca de 790 mil pessoas, segundo dados do ano de 2001 da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2004).

Tabela 2 – Valores estimados das principais causas de morte no mundo, dados de 2001 (OMS, 2004).

Principais causas de morte (em milhares)					
1	Doença Isquêmica do Coração	6.880	11	Malaria	1.080
2	Doença Cerebrovascular	5.069	12	Hipertensão	939
3	Infecção do Trato Respiratório	3.863	13	Suicídio	814
4	HIV/AIDS	2.943	14	Diabete Mellitus	808
5	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica	2.520	15	Cirrose Hepática	796
6	Condições Perinatais	2.438	16	Rubéola	777
7	Diarréia	2.124	17	Câncer do Estômago	744
8	Tuberculose	1.660	18	Anomalias Congênitas	656
9	Acidentes de Trânsito	1.259	19	Câncer de Fígado	626
10	Câncer de Pulmão, Brônquios e Traquéia	1.210	20	Nefrites e Nefrose	619

No Brasil, os dados de mortalidade provenientes do Sistema de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) indicam as doenças do aparelho digestivo como a oitava maior causa de mortalidade no Brasil no ano de 2000, sendo que aproximadamente 30% dos óbitos que se enquadram nessa categoria tem como causa a cirrose hepática (SVS/MS, 2004).

Os indicadores de mortalidade do Departamento de Informação e Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS/MS), referentes ao período de 1990 a 2001, demonstram que a taxa de mortalidade específica por cirrose hepática se mantêm entre a faixa de 7,44 a 8,06 óbitos para cada 100.000 habitantes e que o número de óbitos por essa doença tende a crescer em proporção ao aumento da população do país (DATASUS/MS, 2003).

1.2 – O Fígado

1.2.1 – Função e Anatomia

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo humano, pesando entre 1,2 - 1,6kg, constituindo entre 2% a 5% do peso corporal em adultos. Situa-se no quadrante superior direito da cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma, sendo protegido pelo gradil costal. É recoberto por uma fina camada de tecido fibro-conjuntivo, chamado de cápsula de Glisson (SHERLOCK & DOOLEY, 2002).

O fígado é um órgão de grande importância, pois desempenha funções endócrinas e exócrinas além de outras funções, vitais ao organismo, as quais podemos destacar: a captação, metabolismo e armazenamento de aminoácidos, carboidratos, vitaminas e lipídeos, a síntese de proteínas plasmáticas, a secreção da bile, a regulação do volume sanguíneo, a filtração mecânica de macromoléculas, a proteção e detoxificação de agentes agressores (DESMET, 2001). Além disso, o fígado possui uma grande capacidade de regeneração tecidual. HIGGINS & ANDERSON, em 1931, (citado por MICHALOPOULOS & DeFRANCES, 1997) demonstraram o fígado é capaz de restituir o volume e tamanho anterior mesmo após a remoção de 70% do órgão.

A anatomia clássica divide o fígado em quatro lobos: o lobo direito e lobo esquerdo, situados na face ântero-superior e separados pelo ligamento falciforme (Figura 1A); lobo caudado, situado na face posterior; e o lobo

quadrado, situado na face inferior. O lobo caudado e lobo quadrado são delimitados pelo hilo hepático. A vesícula biliar fica situada sob a face ínfero-anterior do lobo direito e tem a função de armazenar a bile produzida pelo fígado. É através do hilo hepático que os ramos da veia porta, da artéria hepática e os ductos biliares hepáticos, além do plexo nervoso hepático e vasos linfáticos, penetram no parênquima hepático (Figura 1B) (SHERLOCK & DOOLEY, 2002).

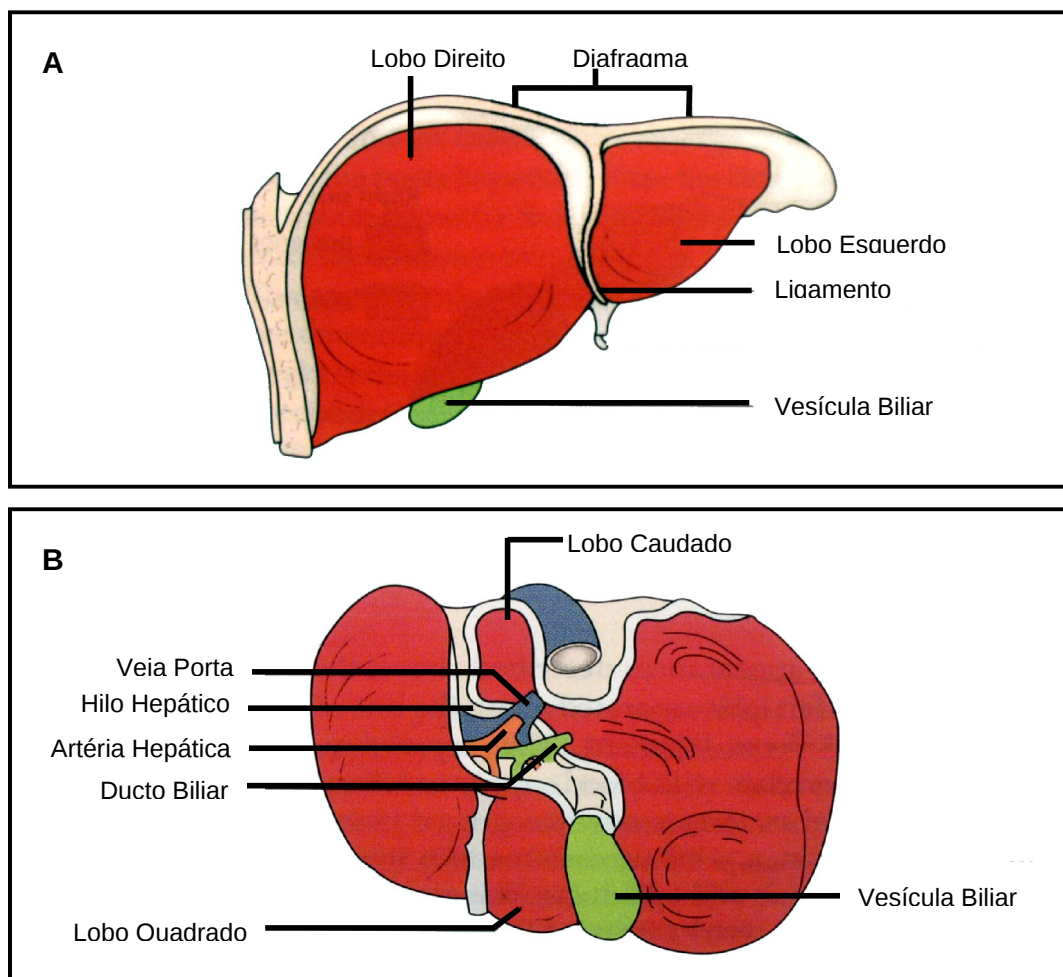


FIGURA 1 – Esquema representativo da visão anterior (A) e inferior (B) do fígado humano (adaptado de SHERLOCK & DOOLEY, 2002).

O fígado recebe suprimento sanguíneo duplo, através dos ramos da veia porta (80% do suprimento) e da artéria hepática (ARIAS *et al.*, 2002). O sangue proveniente da artéria hepática é rico em oxigênio e tem a função de nutrir aos componentes dos lóbulos hepáticos, principalmente às células epiteliais dos ductulos biliares, devido à formação de um plexo vascular peri-biliar (TAKASAKI *et al.* 2001). A veia porta tem a função de coletar o enorme volume sanguíneo transportado pelas veias mesentérica superior, mesentérica inferior e veia esplênica e distribuí-lo para o parênquima hepático. O sangue transportado pela veia porta é rico em substâncias endobióticas e xenobióticas provenientes da absorção feita pelo sistema digestório, que são utilizados, metabolizados ou filtrados no fígado (DESMET, 2001).

A drenagem venosa do fígado é feita pelas veias hepáticas direita, medial e esquerda. Estas desembocam na veia cava inferior, que leva o sangue venoso até o átrio direito do coração (DESMET, 2001).

1.2.2 – Unidades Estruturais e Funcionais do fígado

Existem dois conceitos predominantes quanto à unidade estrutural e funcional do fígado: o lóbulo hepático clássico e o ácino hepático.

O conceito do lóbulo hepático clássico baseia-se na organização espacial das estruturas vasculares intra-hepáticas. O lóbulo hepático tem forma cilíndrica de comprimento de 1 a 2 milímetros e diâmetro de 0,6 a 0,8 milímetros. É constituído por tratos portais, arrançados em conformação aproximadamente poligonal ou

hexagonal em torno de uma vênula hepática central (ou veia centro-lobular) na qual desembocam os sinusóides hepáticos (Figura 2) (DESMET, 2001).

O conceito do ácino hepático baseia-se no fluxo sangüíneo a partir de vasos terminais da artéria hepática e da veia porta em direção a veia centro-lobular. O ácino hepático localiza-se entre dois lóbulos hepáticos adjacentes. Tem forma elipsóide, com o eixo menor delimitado pelos vasos terminais aferentes e o eixo maior delimitado por uma veia centro lobular em suas extremidades. A população de hepatócitos que circundam os vasos terminais aferentes constituem a zona acinar 1, seguidos dos hepatócitos da zona intermediária ou zona acinar 2, enquanto os mais distantes aos vasos terminais e mais próximos da veia central constituem a zona acinar 3 (FIGURA 3). Cada zona possui características funcionais distintas que caracterizam a heterogeneidade do parênquima hepático (TABELA 3) (SHERLOCK & DOOLEY, 2002).

TABELA 3 – Metabolismo dos hepatócitos relacionado à zona acinar (adaptado de SHERLOCK & DOOLEY, 2002).

	Zona 1	Zona 3
Carboidratos	Gliconeogênese	Glicólise
Proteínas	Albumina Fibrinogênio	Albumina Fibrinogênio
Citrocromo P450	+	++
após fenobarbital	+	++++++
Suprimento de oxigênio	+++	+
Formação de bile		
dependente de sais biliares	++	-
não dependente de sais biliares	-	++
Sinusóides	Estreito e anastomótico	Direto e radial

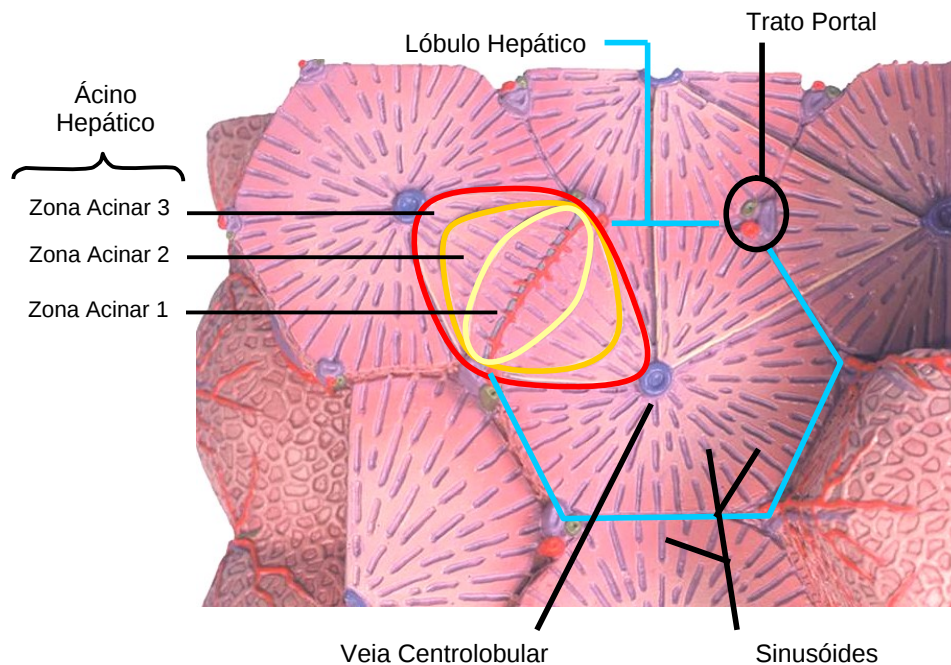


FIGURA 2 – Esquema representativo do parênquima hepático e as unidades estruturais e funcionais do fígado: Lóbulo Hepático (bordas azuis), com uma veia centro-lobular ao centro e delimitado por tratos portais na sua periferia; a zona acinar 1 (borda amarela), zona acinar 2 (borda laranja) e zona acinar 3 (borda vermelha) do ácino hepático. (adaptado de 3B Scientific microanatomy TM, 2002).

1.2.3 – Estruturas Intra-hepáticas

As estruturas intra-hepáticas são as peças que compõem as unidades estruturais do fígado. Basicamente, cada unidade contém a veia centro-lobular, o trato portal, o parênquima hepático e os sinusóides.

A veia centro-lobular é um vaso eferente das veias hepáticas sublobulares que drena o sangue proveniente dos sinusóides que o circundam. Possui paredes finas e é sustentada por fibras colágenas esparsas.

O trato portal é formado por uma radícula da veia porta e da artéria hepática, e duto biliar, além de vasos linfáticos e nervos. Os vasos terminais aferentes da veia porta e da artéria hepática levam o sangue para os sinusóides. Feixes de tecido conjuntivo provenientes da cápsula de Glisson sustentam o trato portal. Os limites do trato portal são delineados por placas de hepatócitos modificados, chamada de placa limitante. Há o espaço de Möll, no qual se supõe que ocorra a formação de linfa no fígado e que separa a placa limitante do tecido conjuntivo do trato portal (SHERLOCK & DOOLEY, 2002).

O trato portal e a veia centro-lobular estão separados pelo parênquima hepático e os sinusóides. O parênquima hepático é composto de hepatócitos dispostos lado a lado, formando traves hepatocelulares simples. Essas traves irradiam da veia centro-lobular e se distribuem até os tratos portais, acompanhando os sinusóides hepáticos. Os sinusóides hepáticos formam um sistema microvascular que distribui o sangue proveniente dos vasos aferentes

para as traves hepatocelulares. Entre os sinusóides e as traves de hepatócitos encontra-se o espaço perisinusoidal de Disse (Figura 3) (DESMET, 2001).

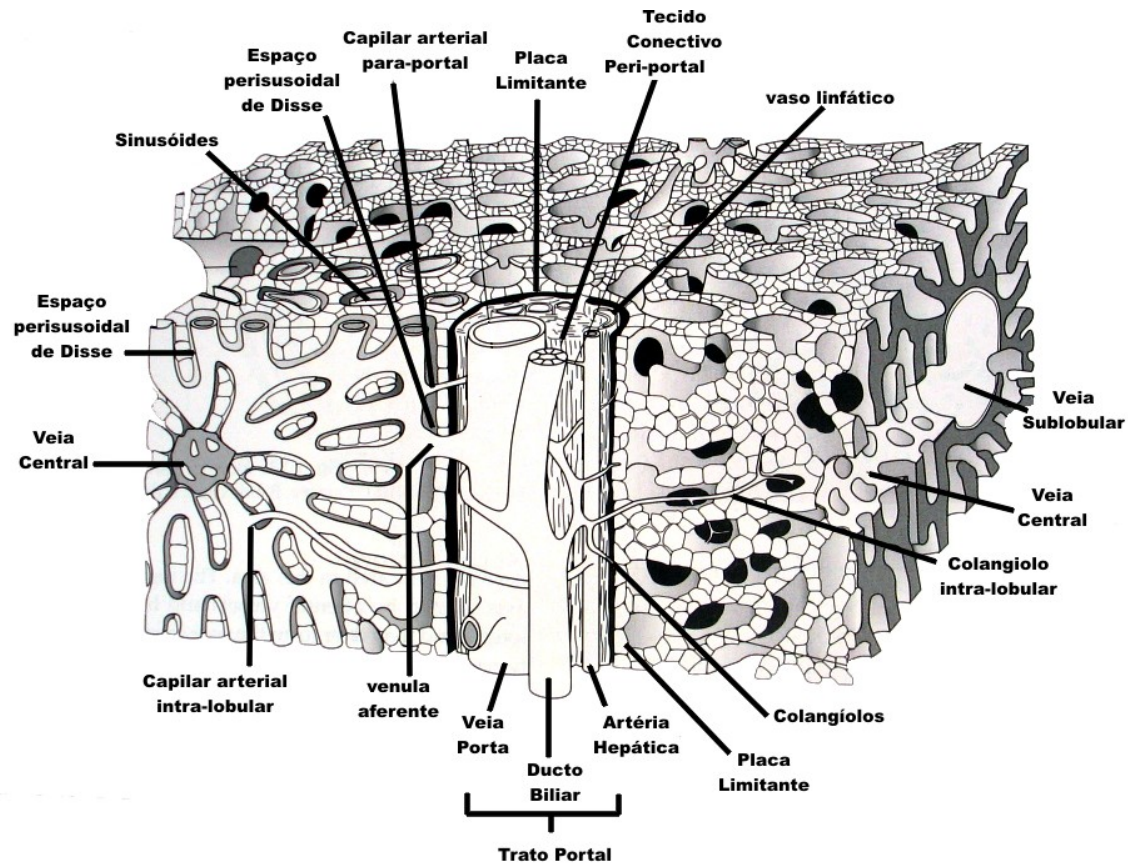


FIGURA 3 – Esquema representativo das estruturas que compõem o lóbulo hepático (adaptado de SHERLOCK & DOOLEY, 2002).

1.2.4 – Ecossistema Hepático

As funções hepáticas estão relacionadas à interação entre os sinusóides, traves hepatocelulares e o espaço de Disse. Essa interação ocorre pela intercomunicação entre os componentes celulares e de matriz extracelular que compõem essas estruturas, que visa à manutenção da homeostase do ecossistema hepático (FIGURA 4).

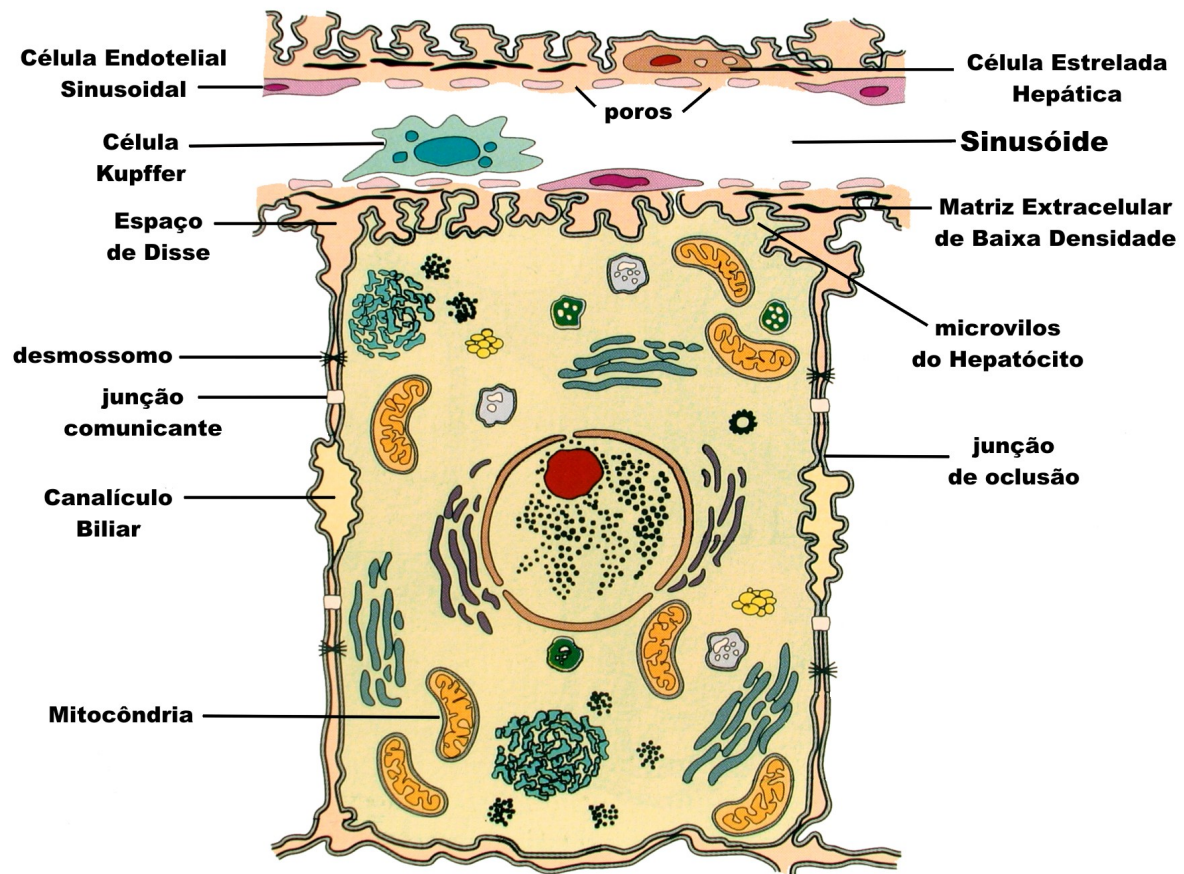


FIGURA 4 – Esquema representativo dos tipos celulares que compõem o ecossistema hepático (adaptado de SHERLOCK & DOOLEY, 2001).

As traves hepatocitárias são formadas de hepatócitos. O hepatócito é a célula que desempenha a grande maioria das funções relacionadas ao órgão. Para desempenhar tais funções, possui uma membrana plasmática polarizada que apresenta três superfícies com funções distintas: a superfície canalicular, a superfície intra-hepática e a superfície sinusoidal (EVANS, 1980).

O hepatócito exerce sua função exócrina pela superfície canalicular, local por onde secreta a bile para os canalículos biliares (ARIAS *et al.*, 2001). A adesão e a comunicação entre hepatócitos são feitas pela superfície inter-hepatocitária. A adesão é feita através de junções de oclusão e desmossomos, que funcionam como barreiras que impedem o vazamento de solutos, plasma e bile entre o canalículo biliar e os sinusóides (GOODENOUGH & REVEL, 1970).

A comunicação inter-hepatocitária é feita por junções comunicantes predominantemente compostas por conexina32 e conexina26 (TRAUB *et al.*, 1985). As junções comunicantes permitem a sinalização intercelular e controle de crescimento celular (KOJIMA *et al.*, 2003). Na superfície sinusoidal, o hepatócito desempenha sua função endócrina secretando proteínas plasmáticas como a albumina, fatores de coagulação e do sistema complemento, globulinas, enzimas e lipoproteínas para o sangue. Também desempenha sua função de captação e transporte de aminoácidos, glicose, vitaminas, e lipídeos, substâncias endógenas e exógenas provenientes do plasma sanguíneo. Essa superfície apresenta microvilos, que aumentam a área de contato, ajudando na absorção por pinocitose. Além disso, estão presentes

receptores que aumentam a velocidade de captação de substâncias, através de endocitose mediada por receptor (SCOTT *et al.*, 2001).

As células presentes nos sinusóides são chamadas de células sinusoidais. Foram identificados quatro tipos celulares: as células endoteliais sinusoidais, o macrófago do fígado (célula de Kupffer), *pit cells* e células estreladas hepáticas (WISSE & KNOOK, 1979).

As células endoteliais sinusoidais (SECs) constituem as paredes dos sinusóides hepáticos. A principal característica dessas células é a presença de poros organizados como fenestras. Esses poros funcionam como filtros e controlam a troca bidirecional de substâncias entre o sangue e hepatócitos (WISSE *et al.*, 1985). Sugere-se que estas células participam da regulação do fluxo sanguíneo através dos sinusóides (ODA *et al.*, 1990). As SECs também participam na captação de moléculas modificadas ou desnaturadas através de receptores “scavenger” em conjunto com as células de Kupffer (KCs) (SMEDSRØD, 1990).

As KCs podem ser encontradas no lúmen dos sinusóides, aderidas as SECs, principalmente nas regiões peri-portais. Estas células desempenham a limpeza mecânica do sangue através de alta atividade endocítica mediada por receptores, removendo endotoxinas, complexos imunes e componentes bacterianos, hemácias envelhecidas, exercendo um importante papel na resposta imune do organismo. Quando as KCs são ativadas produzem fatores pró-inflamatórios e citotóxicos, tais como interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral – α (TNF- α), radicais livres e proteases (revisto por ARII & IMAMURA, 1999).

As células estreladas hepáticas (HSCs), conhecidas também por células de Ito, situam-se no espaço de Disse. As HSCs em estado quiescente armazenam aproximadamente 80% do conteúdo total de retinóides (ex.: vitamina A), regulam a sua concentração e sua liberação no sangue. Os retinóides regulam atividades celulares tais como proliferação, diferenciação, morfogênese (BLOMHOFF *et al.*, 1994).

As HSCs participam na regulação entre síntese e degradação de matriz extracelular. Em estado quiescente, as HSCs sintetizam principalmente colágeno tipo I, colágeno tipo III, colágeno tipo IV e laminina (GEERTS *et al.*, 1993). Também sintetizam metaloproteinases de matriz extracelular tipo 2 (MMP-2), MMP-3, MMP-10, MMP-13, e MMP-14, além de inibidores teciduais de metaloproteinases tipo 1 (TIMP-1) e TIMP-2 (ARTHUR *et al.*, 1989; IREDALE *et al.*, 1992; KRISTENSEN *et al.*, 2000). Quando ativadas modulam seu fenótipo, passando de uma célula armazenadora de lipídeo para um tipo celular semelhante ao miofibroblasto (WANG *et al.*, 2004). Neste caso passam a sintetizar grande quantidade de proteínas da MEC.

Há evidências de que as HSCs participam na regulação do fluxo sanguíneo pelos sinusóides. Estudos realizados em cultura de HSCs demonstraram que estas contraem em resposta a trombina e angiotensina II (PINZANI *et al.*, 1992), eicosanóides e endotelina I (ROCKEY *et al.*, 1993) e relaxam sob influência de prostaglandina E, prostaciclina, doadores de óxido nítrico, adrenomedulina e somatostatina (PINZANI & GENTILINI, 1999).

As HSCs estão envolvidas também na liberação de mediadores quimio-atratores e mecanismos autócrinos e parácrinos. Em estado quiescente,

liberam fatores de crescimento de hepatócitos (HGF) (RAMADORI *et al.*, 1992), fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) (ISHIKAWA *et al.* 1999), fator de crescimento de insulina tipo 2 (IGF-II) (ZINDY *et al.*, 1992), e fator de crescimento transformante tipo β_1 (TGF- β_1) (DE BLESSER *et al.*, 1997), entre outros, que controlam a proliferação e diferenciação das HSCs e demais tipos celulares no fígado.

Outro importante componente do ecossistema hepático é a matriz extracelular que compõe o espaço de Disse. Embora se apresente em pequenas proporções, sua composição é de grande importância para a manutenção da homeostase e função do fígado.

Esta matriz extracelular é composta por colágenos fibrilares do tipo I, III, V, colágenos microfibrilares do tipo VI, colágenos de membrana basal do tipo IV e XVIII, glicoproteínas estruturais (laminina, fibronectina) e pequenas proteoglicanas (decorina, tenascina-C, entactina, heparan sulfato, condroitinas e outros) (revisto por SCHUPPAN *et al.*, 2001).

Em condições normais, as HSC sintetizam principalmente o colágeno do tipo III e do tipo IV, e laminina, as SECs expressam colágeno do tipo IV (GEERTS *et al.* 1993), e os hepatócitos expressam fibronectina (RAMADORI *et al.*, 1987) . Estes três tipos celulares expressam pequenas quantidades de colágeno do tipo I.

A matriz extracelular do espaço de Disse exerce funções relacionadas à adesão celular, migração, proliferação e diferenciação. Muitas dessas funções são sinalizadas por adesões célula-matriz mediadas por integrinas, proteoglicanas transmembrana ou receptores de matriz (BISSEL *et al.*, 1998). Essas moléculas de

adesão podem atuar como receptores de citocinas e fatores de crescimento (GRESSNER, 1995), agindo em conjunto com as demais moléculas de adesão.

1.3 – Fisiopatologia Hepática

1.3.1 - Fibrose Hepática

A fibrose hepática é uma alteração que ocorre previamente ao estabelecimento da cirrose hepática. É um processo dinâmico que se inicia como resposta às lesões crônicas ao fígado e resulta no excesso de deposição de matriz extracelular devido ao desequilíbrio entre síntese e degradação de seus componentes (ROJKIND & GREENWEL, 2001). Essa deposição é feita gradualmente e em estágios mais avançados, como no caso da cirrose hepática, o conteúdo de componentes da matriz extracelular, principalmente o colágeno tipo I e tipo III, podem estar aumentados em até seis vezes em relação ao fígado normal (ROJKIND *et al.*, 1979; GRESSNER *et al.*, 1990).

A distribuição da fibrose dentro do lóbulo hepático varia de acordo com o local e o agente etiológico. No caso da hepatite viral, há predominância de fibrose peri-portal. Já em casos de doença relacionada ao álcool, a fibrose é geralmente pericentral. Com a contínua lesão dessas regiões, ocorre a formação de septos fibrosos porta-porta, porta-centro e centro-centro (FRIEDMAN, 1993).

Com a suspensão da agressão, é possível restabelecer o ecossistema hepático e até mesmo reverter o processo fibrótico. Porém, a contínua

deposição de colágeno por um longo período acarreta no amadurecimento das fibras de colágeno, através de *cross-linkings* de proteínas, tornando-as mais estáveis e resistentes à degradação. Este é, portanto, um fator que está associado à reversibilidade da fibrose (RICARD-BLUM *et al.*, 1996).

A fibrose provoca alterações importantes na arquitetura normal do tecido hepático, tais como: ativação das células estreladas hepáticas e células de Kupffer; a capilarização dos sinusóides; perda das microvilosidades na superfície dos hepatócitos; aumento da deposição de fibras de colágeno na matriz extracelular intersticial do lóbulo hepático (Figura 5) (FRIEDMAN, 2000).

Um ponto crítico na formação da fibrose é o fenômeno da capilarização dos sinusóides. As células endoteliais sinusoidais perdem os poros e há o aumento de deposição de colágeno no espaço de Disse, formando uma membrana basal de alta densidade (SCHAFFNER & POPPER, 1963). Portanto, ocorre o aumento a resistência do fluxo sanguíneo e a redução da troca bidirecional de substâncias entre o sangue e hepatócitos. Sob essas condições, há redução de suprimento de oxigênio, causando isquemia, e redução na captação de nutrientes, que provocam ainda mais lesões e morte celular (WISSE *et al.*, 1985).

Tais lesões desencadeiam uma cascata de reações que induzem a ativação das células de Kupffer e células estreladas hepáticas, que desempenham papéis importantes na fibrogênese, como a síntese de colágeno, inibição da degradação de colágeno, proliferação celular e liberação de citocinas (ROJKIND & GREENWEL, 2001).

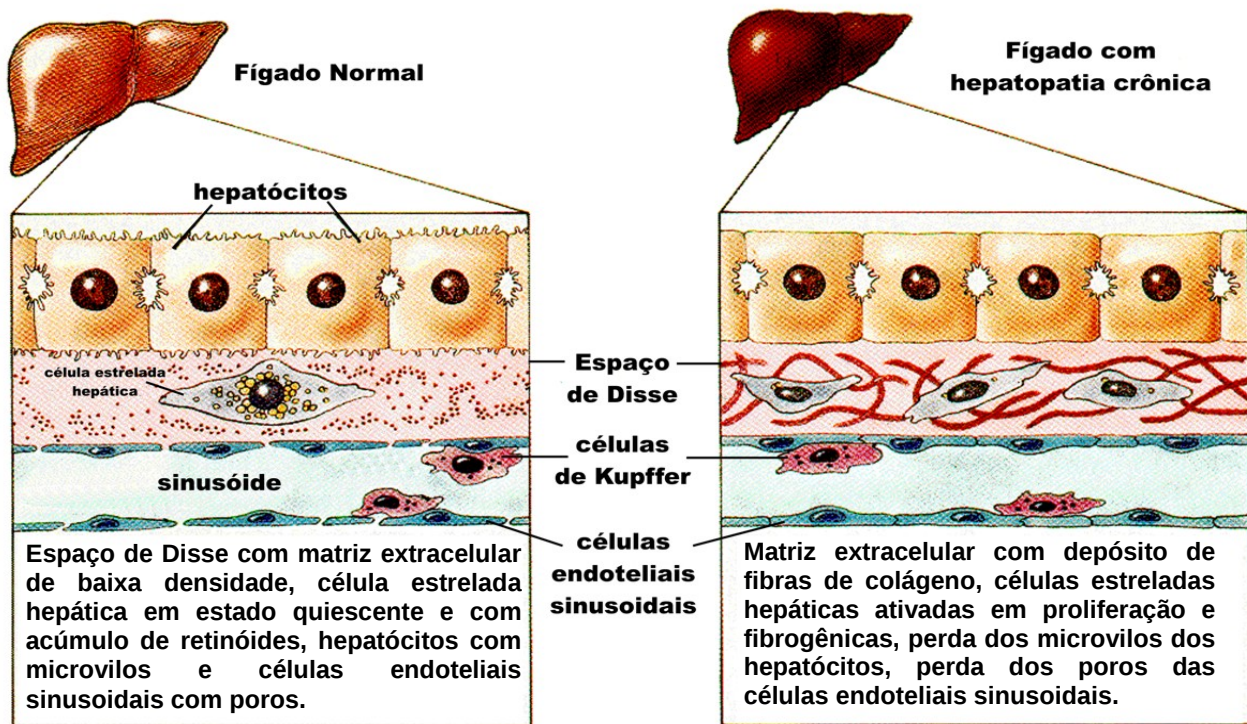


FIGURA 5 – Esquema representativo da arquitetura normal do fígado (quadro à esquerda) e as alterações causadas por lesão hepática crônica (quadro à direita) (adaptado de FRIEDMAN, 2000).

1.3.1 – Estímulos de indução

A fibrogênese hepática é a resposta celular a algum tipo de lesão que cause o desequilíbrio dos fatores que regulam a homeostase do ecossistema hepático. Tais alterações disparam uma cascata de eventos que tem a deposição de colágeno como resultado final (FIGURA 6).

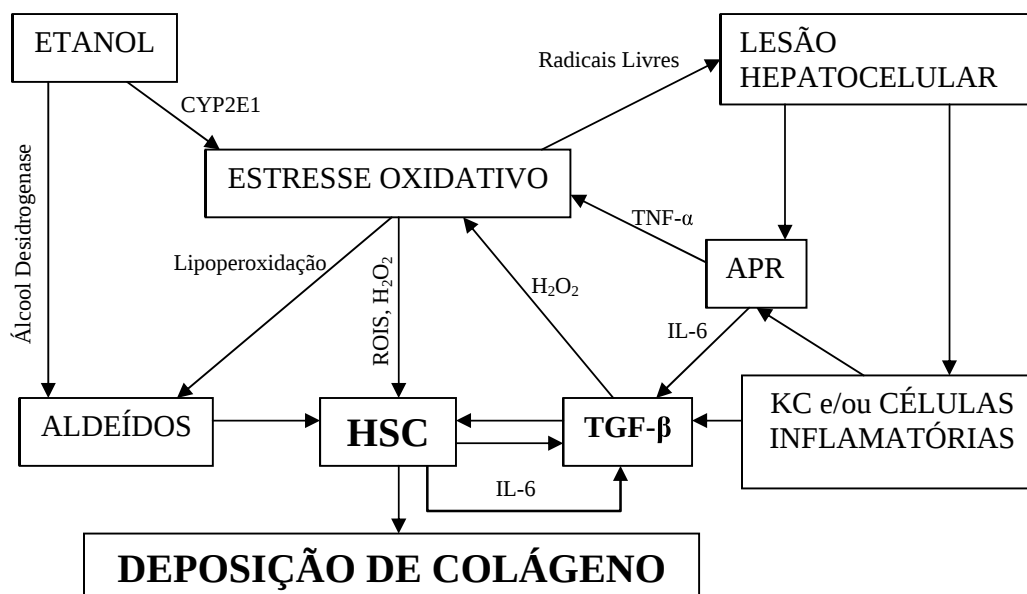


FIGURA 6 – Representação esquemática dos principais mecanismos envolvidos na fibrogênese hepática induzida por etanol (adaptado de ROJKIND & GREENWEL, 2001)

A ativação das HSCs é um evento essencial na fibrogênese hepática. As HSCs permanecem em estado quiescente até receberem um estímulo a ativação. A ativação da HSC pode ser iniciada por estímulos parácrinos de células que sofreram lesão celular: hepatócitos, SECs, células de Kupffer, plaquetas. Os hepatócitos promovem a ativação pela produção de lipoperóxidos e seus subprodutos (ex.: aldeídos) resultantes do estresse oxidativo nas células lesionadas, afetando os mecanismos transcricionais da HSC. Estudos demonstraram que as HSCs em cultura são induzidas à

proliferação e expressão de genes de colágeno tipo I após a exposição a meios de cultura condicionados por hepatócitos em estado de estresse oxidativo (SVEGLIATI *et al.*, 1998). As plaquetas são uma fonte de mediadores importantes como PDGF, EGF e TGF- β_1 . As SECs que sofreram lesão são estimuladas a produzir uma isoforma de fibronectina variante (EIIIA) que tem efeito promotor de ativação nas HSCs (JARNAGIN *et al.*, 1994). As SECs também são capazes de converter o fator de crescimento transformante β_1 latente (L-TGF- β_1) para a sua forma ativa (TGF- β_1) através da produção de ativador de plasminogênio tipo uroquinase (urokinase type plasminogen activator, uPA) (OKUNO *et al.*, 1997).

A ativação de KCs ocorre pouco antes da ativação de HSCs e desempenha papéis importantes na ativação das HSC. Ao serem estimuladas, as células de Kupffer liberam fatores que induzem a proliferação das HSCs e hepatócitos, e liberação de citocinas quimio-atratoras de células inflamatórias (neutrófilos e monócitos). Em pacientes acometidos por hepatopatias, há aumento dos níveis de citocinas produzidos pelas KCs: TNF- α , IL-1, IL-6 e oncostatina M (OSM), e induzem a resposta inflamatória de fase aguda (acute phase response, APR). A APR pode ter efeitos benéficos na fase aguda da lesão, pois é um evento que favorece a proliferação de hepatócitos e do remodelamento de tecido conectivo após hepatectomia parcial (SOLIS-HERRUZO *et al.*, 1999), porém estudos demonstraram que sobreposição de episódios de APR pode regular a expressão de RNA mensageiro de colágeno tipo I e de TIMP-1, e, portanto, favorece a fibrogênese (GREENWEL & ROJKIND, 1997).

As células de Kupffer também produzem TGF- β_1 que atua de forma autócrina sobre as KCs e parácrina sobre as HSCs, induzindo ao aumento de expressão de TGF- β_1 em ambas (FRIEDMAN, 1999). O TGF- β_1 induz também o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tanto na ativação das HSCs como no aumento da expressão de RNA mensageiro de colágeno $\alpha 1(I)$. (GREENWEL *et al.*, 2000).

A matriz extracelular participa da ativação das HSC. Estudos demonstraram que a célula permanece em seu estado quiescente quando cultivada sobre uma matriz extracelular derivada de tumor, em contraste ao fenótipo de HSC ativada quando aderida diretamente ao polímero sintético das placas de cultura. Além disso, demonstraram que as HSCs cultivadas sobre componentes individuais da matriz não apresentavam o fenótipo do estado quiescente, sugerindo que as interações entre as HSCs em estado quiescente e a matriz extracelular são complexas, e que as alterações nos componentes da matriz extracelular podem induzir mecanismos de diferenciação e proliferação celular (FRIEDMAN, 1989).

Outro estudo demonstra que a HSC torna-se responsiva ao estímulo por TGF- β de síntese de colágeno tipo I e tipo III quando cultivada sobre matriz de colágeno tipo I, enquanto o TGF- β perde seu efeito quando a célula é cultivada sobre matriz de colágeno tipo IV (DAVIS, 1998). Sugere-se que as HSCs possuem diferentes receptores para os componentes da matriz extracelular, além das integrinas. Estudos demonstraram o aumento na expressão de uma subclasse de receptor tirosina-quinase chamado de receptor de domínio discoidina (DDR) (ANKOMA-SEY *et al.*, 1998). Esse receptor seria responsável

pela sinalização intracelular em resposta a interação com colágenos fibrilares, como o colágeno tipo I e tipo III (VOGEL *et al.*, 1997).

Estudos mais recentes demonstraram que a matriz extracelular também pode ser um reservatório de citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (platelet-derived growth factor, PDGF). Essas moléculas têm maior afinidade com as proteoglicanas da matriz extracelular. Essa interação protege as citocinas e fatores de crescimento da degradação (ARIAS *et al.*, 2001).

1.3.2 – Ativação das HSCs

A ativação das HSCs é dividida em duas fases: iniciação e perpetuação. A iniciação é o processo de transdiferenciação da HSC, na qual sofre mudanças fenotípicas e de expressão gênica que irão dar suporte ao estado ativado. A perpetuação é o processo de amplificação e manutenção do fenótipo ativado pelos estímulos da iniciação (FRIEDMAN, 2000).

Durante a iniciação, a HSC está em processo de transdiferenciação. As HSCs se convertem em células com características morfológicas de miofibroblasto. Estudos demonstraram que as HSCs passam a sintetizar a α -actina de músculo liso (α -smooth muscle actin, α -SMA), marcador celular de miofibroblastos, em fígados que sofreram lesão por tetracloreto de carbono (CCl_4) ou por obstrução biliar (SCHMITT-GRAFF *et al.*, 1991).

As HSCs passam a expressar de receptores para citocinas que induzem a proliferação celular e atividade fibrogênica. Estudos demonstraram que as células de Kupffer induzem a síntese de receptores β para PDGF, um potente fator de proliferação de HSCs, além de outros fatores como: TGF- α , fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e fator de crescimento de epiderme (EGF) (PINZANI *et al.*, 1989), que aumentam a capacidade de proliferação das HSCs. O aumento de receptores para TGF- β_1 , IL-1 e TNF- α (MATSUOKA *et al.* 1989) favorece a síntese de colágeno e síntese de citocinas pró-fibróticas.

Os mecanismos de transcrição da HSC também sofrem alterações. Estudos demonstraram que o fator transcricional c-Myb tem sua expressão e atividade aumentada em HSCs ativadas (BUCK *et al.*, 2000). Esse fator se liga a regiões promotoras do gene de α -SMA, aumentando sua transcrição. Também são evidenciados aumentos de expressão e atividade dos fatores de transcrição Sp1 e NF κ B, que estão envolvidos na regulação de expressão do gene de colágeno tipo I induzido por TGF- β_1 (INAGAKI *et al.*, 1995), e no aumento da transcrição de citocinas fibrogênicas (GREENWEL *et al.* 1997).

Após a iniciação, o estado ativado das HSCs é mantido por ciclos autócrinos e parácrinos de regulação fatores de crescimento. Com o aumento da expressão dos receptores de PDGF, as HSC entram em mitogênese e proliferam. Além disso, há aumento da expressão de PDGF pela HSC, ativando um mecanismo autócrino de proliferação, que resulta no aumento de HSCs ativadas e, conseqüentemente, maior síntese e deposição de colágeno (PINZANI *et al.*, 1994). A liberação de PDGF pelas HSCs também é um fator quimiotático que induz a migração de outras HSCs até a região da lesão.

A síntese de citocinas pelas HSCs também é essencial para a manutenção do seu estado ativado. Além do estímulo parácrino regulado pelas KCs e SECs, a HSC ativada expressa suas próprias citocinas de ação autócrina. Para a manutenção da proliferação e da síntese de colágeno, sintetizam PDGF, HGF, FGF, ET-1, TGF- β_1 , fator de ativação de plaqueta. Liberam também fatores pró-inflamatórios e quimiotáticos que atraem neutrófilos e monócitos, tais como o fator de estimulação de colônia (CSF), proteína quimiotática de monócito e quimio-atrator de neutrófilo induzido por citocina. Também produzem citocinas antiinflamatórias, em especial, a interleucina-10 (IL-10). A IL-10 diminui a produção de TNF- α em macrófagos (VAN HOGHZARD *et al.*, 1997), reduz a expressão de colágeno tipo I e aumenta a expressão de collagenase intersticial (LOUIS *et al.*, 1998).

As HSCs também estão relacionadas à contratilidade da fibrose. Esta contratilidade pode estar relacionada presença de α -SMA nos filamentos de citoesqueleto das HSCs ativadas. Estas células expressam endotelina-1 (ET-1), que atua como agente vasoconstritor e regulador da expressão de α -SMA (ROCKEY *et al.* 1998) e também óxido nítrico (NO), antagonista fisiológico da ET-1. Sugere-se que a constrição dessas células aumenta a resistência do fluxo sanguíneo através do sinusóide, havendo relação com o desenvolvimento de hipertensão portal, devido a redução da atividade de NO e ao aumento do estímulo por ET-1 (GUPTA *et al.*, 1998). Sugere-se que as inervações encontradas próximas as HSCs também podem participar do processo de contração (UENO *et al.*, 1988).

1.3.3 – Síntese e degradação de colágeno

A deposição de colágeno está diretamente relacionada a ativação da HSC pelo TGF- β_1 , que é o fator fibrogênico mais potente que atua sobre as HSCs.

O TGF- β_1 possui três mecanismos que modulam a deposição de matriz extracelular: aumento da síntese de componentes de matriz extracelular, aumento da síntese de inibidores de proteases, e diminuição da expressão de metaloproteinases (BORDER & NOBLE, 1994).

O aumento da expressão de colágeno pela indução por TGF- β_1 ocorre através de uma via de sinalização intracelular. O TGF- β_1 induz a dimerização dos receptores serina/tirosina quinases do tipo I e tipo II. Concomitante a dimerização, o receptor tipo I é fosforilado e propaga a sinalização através de proteínas Smad, que são proteínas mediadoras de sinalização intracelular. As Smads 2, 3 são fosforiladas, formam hetero-oligômeros com a Smad 4, e se translocam para o núcleo. Os complexos Smad regulam a transcrição de genes específicos, como os genes do colágeno tipo I (revisto por MIYAZONO *et al.*, 2000).

A dinâmica do remodelamento tecidual está relacionada ao balanço entre a expressão de MMPs e TIMPs. As MMPs são enzimas que degradam os componentes da matriz extracelular. As TIMPs são os inibidores da ação das MMPs. As MMP-1 e MMP-13 têm especificidade de degradação sobre os colágenos intersticiais como o colágeno tipo I e tipo III. Já as MMP-2, MMP-3,

MMP-9 e MMP-10 têm especificidade pelos colágenos desnaturados, colágeno tipo IV, fibronectina e laminina (WESTERMARCK *et al.*, 1999).

Na fibrogênese, as MMPs que degradam colágenos intersticiais têm sua expressão reduzida e são inibidas pelas TIMPs. Inicialmente, ocorre o aumento da expressão de MMP-13, seguido do aumento da expressão de TIMP-1 e colágeno tipo I e III. Sugere-se que nesta fase, essa MMP desempenhe um papel de limpeza local para que possa que seja possível a deposição de fibras de colágeno. Após essa fase inicial, a expressão de MMP-1 e MMP-13 são reduzidas, enquanto a expressão de TIMP-1, TIMP-2 e colágeno tipo I e tipo III prosseguem aumentadas, que favorece a deposição dos colágenos fibrilares. Já as MMP-2, MMP-3, MMP-9 e MMP-10 têm a expressão aumentada desde a fase inicial da fibrogênese, resultando no aumento da degradação da matriz de baixa densidade (ROJKIND & GREENWEL, 2001). Além disso, o aumento da expressão da TIMP-1 e TIMP-2 favorecem ainda mais deposição de colágeno fibrilar (IREDALE, 1997).

1.3.4 - Cirrose Hepática

A cirrose hepática é definida como um processo difuso caracterizado pela presença de fibrose e pela conversão da arquitetura normal do fígado em nódulos estruturalmente anormais (ANTHONY *et al.*, 1978).

A cirrose hepática é uma doença crônica de caráter avançado, que se instala lenta e gradualmente, comprometendo gravemente as funções do

fígado. Em cerca de 50% dos casos, o paciente não apresenta complicações, somente sendo diagnosticada com o aparecimento de sintomas relacionados a esta doença (GRAUDAL *et al.* 1991). Quando manifestadas, as complicações reduzem a qualidade de vida do paciente e, dependendo do grau da complicação, pode levar a óbito.

Suas manifestações clínicas mais graves estão relacionadas às alterações na hemodinâmica hepática e redução de massa celular, representadas pela presença de hipertensão portal e insuficiência hepatocelular. Outras complicações também estão relacionadas à cirrose hepática, tais como: desnutrição, ascite, peritonite bacteriana, varizes e sangramento no esôfago, síndromes hepatorenal, síndrome hepatopulmonar e carcinoma hepatocelular (SHERLOCK & DOOLEY, 2002).

A cirrose hepática é caracterizada como uma doença irreversível. Portanto, o único tratamento definitivo é o transplante de órgão. Mesmo com os avanços no sistema de captação de órgãos, na conscientização da população sobre a importância da doação de órgãos, e nas técnicas cirúrgicas que permitem o transplante de fígado intervivos, o número de órgãos não supre a demanda e muitos pacientes vão a óbito durante a espera por um transplante. A taxa de mortalidade na fila de espera na cidade de São Paulo pode chegar até 75% (SETTE *et. al.*, 2003). O tratamento paliativo da cirrose é baseado na controle ou suspensão do agente etiológico, nutrição balanceada, alívio das complicações e na utilização de drogas anti-fibróticas (RILEY & BHATTI, 2001).

1.4 – Modelos Experimentais para Indução de Lesão Hepática

Grande parte dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na fibrose, cirrose e suas complicações clínicas foram elucidadas a partir de estudos utilizando modelos experimentais *in vivo*. Ao longo dos anos, diferentes abordagens metodológicas foram utilizadas a fim de estabelecer modelos experimentais capazes de reproduzir os aspectos clínicos e fisiopatológicos das lesões hepáticas crônicas, em especial, aqueles relacionados à fibrose e cirrose hepática.

Existem diversas abordagens metodológicas para o desenvolvimento de modelos experimentais para fibrose e cirrose, tais como: indução por obstrução biliar (GRINKO *et al.*, 1995; PAROLA *et al.*, 1996), por desordem metabólica (ZIESEL *et al.*, 1991; GEORGE *et al.*, 2003), por reação imunológica (BHUNCHET *et al.*, 1996; SHIGA *et al.*, 1997), e por substâncias hepatotóxicas (MADDEN *et al.*, 1970; MUÑOZ-TORRES *et al.*, 1991; GREENWEL *et al.*, 1993; ASTON *et al.*, 1998) .

Muitos modelos experimentais *in vivo* estão baseados na intoxicação por alguma substância hepatotóxica, principalmente pela administração de tetracloreto de carbono (CCl₄) (PEREZ-TAMAYO, 1983).

1.4.1 – Indução por tetracloreto de carbono

O CCl_4 é um líquido incolor e hidrofóbico, que libera vapor de odor etéreo. É produzido a partir da cloração de outros hidrocarbonetos. Hoje em dia, é utilizado apenas como solvente industrial, mas foi utilizado largamente na produção de cloro-flúor-carbonos (CFCs) para fluído refrigerante e propelente de aerossóis, como pesticida e como solvente de limpeza doméstica. Sua produção e utilização foram reduzidas após a constatação de seus efeitos deletérios tanto à saúde humana bem como ao meio ambiente (ATSDR, 2003).

Entre as décadas de 1920 e 1930, estudos com pacientes intoxicados por CCl_4 demonstraram alterações no quadro clínico relacionadas ao fígado, que causaram esteatose, necrose hepatocelular, fibrose e cirrose. Observaram também que as alterações eram dependentes da quantidade e tempo de exposição ao CCl_4 (revisto por ATSDR, 2003). Constatada sua hepatotoxicidade, diversos estudos buscaram desenvolver modelos experimentais, utilizando o CCl_4 como agente agressor de lesão hepática.

Basicamente, duas metodologias de indução de lesão hepática crônica por CCl_4 são utilizadas atualmente: a intoxicação por CCl_4 puro e a administração seqüencial ou simultânea de CCl_4 com substâncias que potencializam sua toxicidade.

Em 1936, CAMERON & KARUNARATNE (citado por McLEAN *et al.*, 1969) estabeleceu um modelo padronizado de indução de cirrose em ratos através da administração de doses orais repetidas de CCl_4 . Estudos

posteriores buscaram aprimorar o modelo, estabelecendo a relação entre tempo, dose e via de administração. Hoje em dia, a grande maioria dos estudos utiliza a administração por via intragástrica (PROCTOR & CHATAMRA, 1984; LLOVET *et al.*, 1994; ONORI *et al.*, 2000; BHIMANI *et al.*, 2003) ou por inalação (CLARKE *et al.*, 1973; DAVID *et al.*, 1981; GARCIA-FERNANDEZ *et al.*, 2005).

Em 1969, McLEAN *et al.* observaram que o método de CAMERON & KARUNARATNE apresentava lento processo de indução, alta taxa de mortalidade e que uma proporção dos ratos sobreviventes não desenvolvia cirrose. A partir disso, desenvolveram melhorias em relação ao método anterior, administrando CCl₄ por inalação com associação de fenobarbital, um fármaco utilizado como sedativo e que induz o aumento da toxicidade do CCl₄ (GARNER & McLEAN, 1969). Neste modelo, McLEAN *et al.* observaram redução de mortalidade de animais, redução do tempo de indução à metade e grande proporção de animais com cirrose.

Posteriormente, muitas outras substâncias também demonstraram potencializar a hepatotoxicidade do CCl₄, dentre essas: acetona (PLAA *et al.*, 1972), metanfetamina (ROBERTS *et al.*, 1992), nicotina (YUEN *et al.*, 1995) e etanol (HALL *et al.*, 1991).

1.4.2 – Mecanismo de ação do CCl₄

O CCl₄ é rapidamente absorvido pelos pulmões e pelo trato gastrointestinal (SANZGIRI *et al.* 1997). Por ter propriedades lipofílicas, difunde passivamente do sangue para os tecidos, principalmente o fígado e o rim. Quando absorvido pelo trato intestinal, sofre o efeito da primeira passagem pelo fígado, onde então é biotransformado. Essa biotransformação leva a produção de metabólitos reativos que iniciam a lesão celular.

O CCl₄ é metabolizado no fígado pelo sistema oxidativo enzimático microsomal (MEOS) ou sistema enzimático do citocromo P450. Esse sistema está presente no retículo endoplasmático de hepatócitos (RECKANEL *et al.*, 1989). É composto por diversas isoenzimas que catalizam a oxidação de substâncias xenobióticas para um derivado quimicamente inerte e estável (GONZALEZ, 2005). A isoenzima do MEOS mais relacionada a biotransformação do CCl₄ é o citocromo P450 2E1 (CYP2E1). Estudos utilizando camundongos *knock-out* para CYP2E1 (*cyp2e1*^{-/-}) demonstraram que esses animais apresentam resistência à intoxicação por CCl₄ e não apresentam evidências de lesão hepática, mesmo em doses subletais, enquanto os camundongos *wild-type* (*cyp2e1*^{+/+}) apresentavam as alterações relacionadas à intoxicação por CCl₄ (WONG *et al.*, 1998).

A reação do CYP2E1 com o CCl_4 produz o radical livre triclorometil ($\bullet\text{CCl}_3$) (LAI *et al.*, 1978). Esse radical livre reage rapidamente ao oxigênio, formando um radical ainda mais reativo, o triclorometilperoxi ($\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$) (MICO & POHL, 1983).

Dois processos principais estão associados à lesão hepatocelular: a haloalquilação de macromoléculas pelo radical triclorometil e a lipoperoxidação pelo radical triclorometilperoxi (FIGURA 7) (BUHLER *et al.*, 1992).

Na haloalquilação, o radical triclorometil pode se ligar covalentemente a macromoléculas como DNA, proteínas e lipídios, e induz a inativação dessas moléculas, prejudicando as funções celulares. Sugere-se que a ligação do radical triclorometil a ácidos nucleicos esteja relacionada ao potencial carcinogênico do CCl_4 (DIRENZO *et al.*, 1982). O radical triclorometil provoca um efeito depressivo na síntese protéica através da hipometilação de ribossomos (CLAWSON *et al.*, 1987). Também interfere na homeostase de lipídios, provocando o acúmulo de triglicerídeos no hepatócito pela inibição de síntese e secreção de VLDL, lipoproteína carreadora de triglicerídeos no sangue, o que resulta em esteatose (BOLL *et al.*, 2000).

Sugere-se que a lipoperoxidação é desencadeada pelo radical triclorometilperoxi que reage rapidamente com os ácidos graxos insaturados (FORNI *et al.*, 1985). Essa reação provoca desestabilização das pontes de metileno desencadeando uma série de reações autocatalíticas, que resultam na destruição do ácido graxo, juntamente com a formação de outros compostos reativos como aldeídos, grupos carbonila e alcanos (FRANK *et al.*, 1984).

Esses subprodutos também são capazes de se ligar às macromoléculas celulares e causar efeitos tóxicos nas células (STERBAUER, 1985).

Devido a sua abundância na composição de membranas lipídicas, os fosfolipídios são os principais alvos atacados pelos radicais livres de CCl_4 e os compostos reativos resultantes da lipoperoxidação (FORNI *et al.*, 1985). A destruição dos fosfolipídios leva a instabilidade das membranas do retículo endoplasmático (RECKNAGEL & LOMBARDI, 1961, citado por PLAA, 2000) da mitocôndria, do aparelho de Golgi e da membrana plasmática. Essa instabilidade resulta na disfunção de sistemas enzimáticos presentes nestas organelas e aumenta ainda mais a lesão celular, podendo causar a necrose hepatocelular (WEBER *et al.*, 2003) .

A ação hepatotóxica do CCl_4 pode ser potencializada pelo aumento da sua biotransformação em radicais triclorometil. O etanol e o fenobarbital são substâncias que induzem o aumento da síntese de enzimas do MEOS (CORNISH & ARDEFUIN. 1966; McLEAN & McLEAN, 1966; HASUMURA *et al.*, 1974; CASTILHO *et al.* 1992).

Embora atuem sob o mesmo sistema enzimático, o etanol e o fenobarbital têm ações específicas. Enquanto o fenobarbital possibilita a regeneração hepática e reparo tecidual (KODAVANTI *et al.* 1992), o etanol exerce uma ação inibitória da regeneração de hepatócitos. Estudos utilizando modelos de regeneração hepática (hepatectomia parcial) e uso de agentes mitógenos (DIEHL *et al.* 1993) demonstraram que o etanol reduz a indução de síntese de DNA de hepatócitos, mesmo quando administrado em doses de baixa citotoxicidade. Os mecanismos envolvidos na inibição de proliferação de

hepatócitos estão relacionados ao aumento da síntese de TNF- α , aumento de espécies reativas de oxigênio, e redução e expressão da ciclina D1, inibindo a progressão do ciclo celular nos hepatócitos (KOTEISH *et al.* 2002).

Modelos animais para cirrose hepática são importantes para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento da doença, bem como para o estudo de métodos terapêuticos. Para tanto, é necessário que os modelos experimentais *in vivo* sejam capazes de reproduzir os aspectos clínicos e fisiopatológicos da cirrose hepática.

Dentre as diversas abordagens metodológicas descritas na literatura científica, selecionamos o modelo de indução de cirrose hepática descrito por HALL *et al.* (1991) como base para o desenvolvimento do nosso modelo experimental. Os autores estabeleceram um modelo de indução de cirrose hepática de padrão micronodular em ratos Wistar machos, utilizando a exposição crônica por inalação de baixas doses de CCl₄ associada à ingestão crônica de etanol através da técnica de dieta líquida de LIEBER-DeCARLI (1982). Este modelo apresenta vantagens importantes em relação aos demais modelos, pois é capaz de induzir a cirrose hepática em menor tempo de intoxicação (10 semanas), de obter homogeneidade do padrão de cirrose entre os animais e a taxa de sobrevivência é de 100%.

A fim de estabelecer um modelo próprio e adequado às condições de nosso laboratório, realizamos algumas modificações no protocolo do modelo acima descrito. Com o desenvolvimento desse modelo, buscamos compreender as bases fisiopatológicas das doenças hepáticas crônicas, para futuros estudos em busca de alternativas terapêuticas para estas doenças.

2 – OBJETIVOS

Portanto os objetivos gerais são:

- Estabelecer um modelo animal experimental de lesão hepática crônica que reproduza a cirrose hepática;

Os objetivos específicos são:

- Induzir a cirrose hepática através da intoxicação por tetracloreto de carbono (CCl_4) e a ingestão crônica de etanol;
- Acompanhar a evolução da lesão hepática crônica ao longo do desenvolvimento do modelo através de análises histológicas, bioquímicas e ultra-sonográficas, comparando o modelo de lesão pelo CCl_4 e a da associação de CCl_4 com o álcool.

3 – Material e Métodos

3.1 – Animais

Para o desenvolvimento do modelo de lesão hepática crônica, foram utilizados ratos Wistar fêmeas pesando entre 160g a 200g.

Antes do início dos experimentos, animais normais (n = 85) foram submetidos a exame ultra-sonográfico e coleta de sangue para obtenção dos valores padrões médios de cada parâmetro avaliado por ultra-som e bioquímica.

3.2 – Preparação da Dieta Líquida Completa e Alcoólica

Para permitir a nutrição apropriada dos animais e o consumo diário de etanol em níveis adequados, utilizamos como fonte alimentar uma dieta líquida baseada na formulação desenvolvida por LIEBER & DeCARLI (1989). Os componentes nutricionais e suas respectivas concentrações estão descritos na Tabela 4. Os ingredientes da dieta foram diluídos em água filtrada estéril e homogeneizados em liquidificador até atingirem uma consistência líquida.

Para constituir a dieta líquida alcoólica, utilizamos bebida alcoólica destilada comercial – aguardente (Companhia Muller de Bebidas) - cuja composição essencial é de água e etanol a 42° GL. A aguardente era adicionada durante a preparação da dieta e a concentração final do etanol era de 5,5% (m/v). Esta dieta é hipercalórica em relação a dieta controle.

Tabela 4 – Composição da Dieta Líquida de Lieber-DeCarli modificada (adaptado de LIEBER & DeCARLI, 1989).

Concentração para preparação de 1 Litro de dieta líquida			
Albumina - 41,4 g	Maltose Dextran - 115,2 g	Vitamina A - 6000 UI	Ácido Nicotínico - 7,5 mg
Cisteína - 0,5 g	Colina - 5,68 g	Vitamina B1 - 1,5 mg	Pantetonato de Cálcio - 4 mg
Metionina - 0,3 g	Carbonato de Cálcio - 2,7 g	Vitamina B6 - 1,75 mg	Inositol - 25 mg
Goma Xantina - 3g	Cloreto de Sódio - 0,81 g	Vitamina B12 - 25 µg	Riboflavina - 1,5 mg
Celulose - 10g	Fosfato de Sódio - 0,92 g	Vitamina D - 400 UI	Biotina - 50 µg
Azeite de Oliva - 28,4 g	Fosfato de Potássio - 3,5 g	Vitamina E - 30 UI	Menadiona - 125 µg
Óleo de Milho - 8,5 g	Sulfato Ferroso - 0,044g	Ácido Fólico - 0,5 mg	
Óleo de Girassol - 2,7 g	Sulfato de Magnésio - 2,56g	Ácido Parabenzóico - 12,5 mg	*Aguardente comercial - 160mL

* adicionado para constituir a dieta líquida alcoólica a 5,5%

Quilocalorias da dieta líquida controle = 963,1 kcal/L

Quilocalorias da dieta líquida alcoólica = 1331,1 kcal/L

3.3 – Modelo Experimental de Hepatopatia Crônica

Após os exames prévios para o estabelecimento dos parâmetros de normalidade, os animais foram separados aleatoriamente em grupos experimentais conforme descrito na tabela 5.

O experimento foi dividido em 2 fases: fase de adaptação e fase de indução da injúria. Na fase de adaptação, substituímos a ração por dieta líquida *ad libitum*. O grupo RP recebeu apenas ração padrão e água (dieta padrão) durante esta fase. Todos os outros grupos receberam a dieta líquida sem álcool (dieta-controle) por 1 semana. Logo em seguida, os animais dos grupos A1, A2 e A3 consumiram a dieta líquida com álcool (dieta-álcool) por 1 semanas. Os demais grupos continuaram a receber a dieta líquida sem álcool.

Tabela 5 – Condições experimentais por grupo

Grupo Padrão	Dieta com ração padrão e água filtrada; n = 85; animais utilizados para obtenção dos valores padrões de bioquímica e avaliação dos parâmetros ultra-sonográficos
Grupo RP	dieta com ração padrão e água filtrada; n = 7
Grupo C1	dieta líquida sem álcool; n = 4
Grupo C2	dieta líquida sem álcool + injeção via i.p. de veículo (azeite de oliva); n = 4
Grupo C3	dieta líquida sem álcool + injeção de CCl ₄ 20%; n = 5
Grupo A1	dieta líquida com álcool; n = 5
Grupo A2	dieta líquida com álcool + injeção via i.p. de veículo (azeite de oliva) n = 5
Grupo A3	dieta líquida com álcool + injeção via i.p. de CCl ₄ 20%; n= 49

Após esta etapa, iniciamos a fase de indução da injúria hepática. Para tanto injetamos 0,05 mL/kg de tetracloreto de carbono (CCl₄) a 20% diluído em azeite de oliva por via intraperitoneal (i.p.) nos grupos C3 e A3. Os grupos C2 e A2 receberam injeções (i.p.) de azeite de oliva puro e os grupos C1 e A1 e RP não receberam nenhum tipo de injeção. As aplicações foram realizadas três vezes na semana ao longo de 12 semanas. Durante esse período, foi feito o acompanhamento do consumo das dietas administradas e do peso dos animais de cada grupo experimental, e realizamos exames de ultra-sonografia e de bioquímica clínica na 4^a, 8^a e 12^a semanas. A Figura 7 mostra o curso temporal do protocolo experimental.

Ao final da 12^a semana de experimento, todos os animais dos grupos RP, C1, C2, C3, A1, A2 e A3 foram anestesiados com éter e sacrificados por deslocamento cervical. Logo em seguida, os fígados foram removidos e preparados para serem submetidos aos métodos de análises histológicas

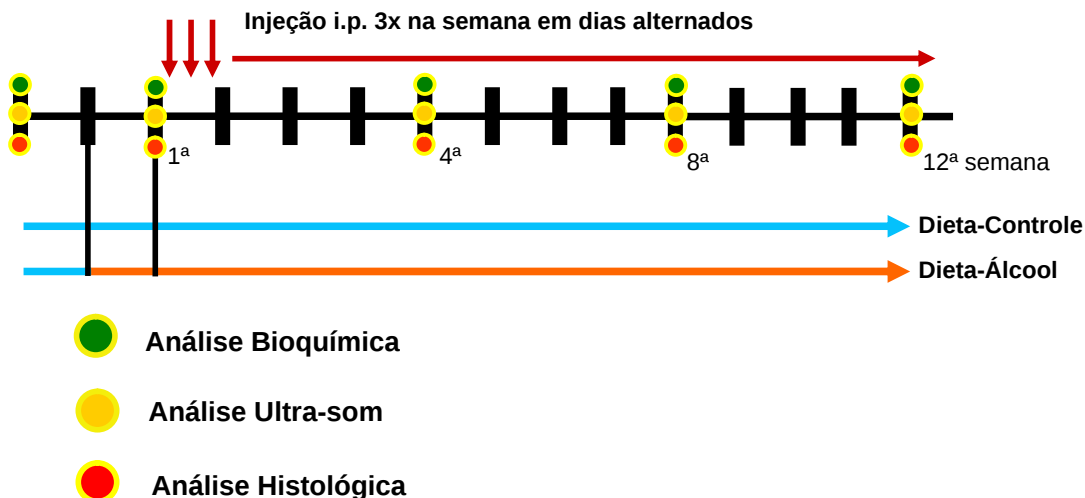


FIGURA 7 – Representação do curso temporal do modelo experimental de indução de cirrose hepática.

3.4 - Análises Histológicas

3.4.1 - Emblocamento em Parafina

O fígado de cada animal sacrificado foi lavado em Salina tamponada com fosfato 1X (PBS 1X) por 5 minutos. Os lobos do fígado foram separados e novamente lavados em PBS 1X, até conseguir lavar e remover o excesso de sangue. Em seguida, os lobos foram cortados em fatias pequenas de aproximadamente 1,5 mm de largura. As fatias eram rapidamente lavadas em PBS 1X e em seguida foram fixadas por 5h em solução de Gendre. Logo após, as fatias foram fixadas por 24h em solução tamponada de formaldeído a 10%.

Após a etapa de fixação, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 95% e 2 vezes de 100%), por 30 minutos em cada banho. Logo em seguida, foram colocadas em dois banhos de xilol puro por 15 minutos. A infiltração foi feita em três banhos de parafina a 60°C por 30 minutos. Posteriormente os blocos das amostras foram seccionados em micrótomo histológico, obtendo-se cortes de 5µm de espessura.

3.4.2 - Coloração por Hematoxilina e Eosina

Para promover a desparafinização dos cortes, as lâminas foram incubadas em estufa a 60°C por 20 minutos. Em seguida, foram feitos três banhos sucessivos de xilol PA por 3 minutos. Os cortes foram hidratados em banhos de concentrações decrescentes de álcool (álcool 100%, 95%, e 90%) por 3 minutos e, em seguida, foram lavados em água destilada por 3 minutos. As lâminas foram incubadas em solução de Hematoxilina de Harris por 10 minutos e lavados em água corrente por 10 minutos. A diferenciação foi realizada com solução de álcool clorídrico. Realizamos a lavagem das lâminas em água corrente por 5 minutos e água destilada por 3 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas em solução de eosina por 10 minutos e, logo após, foram lavadas rapidamente em água corrente. Os cortes foram então desidratados em soluções crescentes de álcool (álcool 95%, 95%, 100% e 100%) por 3 minutos em cada solução. Fizemos a clarificação dos cortes em 3 banhos de xilol durante 5 minutos cada. As lâminas foram montadas com

Entellan e observadas em microscópio óptico Axioplan 100 (Zeiss) com objetivas de 10X e 40X.

3.4.3 - Coloração por Picrosírius

As lâminas emblocadas em parafina foram colocadas na estufa a 60°C durante 40 minutos para facilitar a retirada da parafina. Os cortes histológicos foram submetidos a três banhos de xilol PA por 5 minutos. O material foi hidratado através de banhos de 5 minutos em soluções decrescentes de álcool (100%, 95%, 90% e 70%) e depois lavados em água destilada por 10 minutos. As lâminas foram incubadas em solução de ácido fosfomolibdico 0,2% por 1 minuto e em seguida incubadas em solução de picrosírius por 90 minutos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em ácido clorídrico 0,01N por 2 minutos e em álcool 70% durante 45 segundos. O material foi desidratado com duas lavagens sucessivas de 5 minutos em álcool 95% e 100%. Os cortes foram clarificados através de duas lavagens com xilol por 5 minutos. As lâminas foram montadas com Entellan e observadas em microscópio óptico Axioplan 100 (Zeiss) com objetivas de 10X e 40X.

3.5 - Análises de Bioquímica Clínica

3.5.1 - Coleta e Processamento de Amostra de Sangue

Os animais foram anestesiados com éter e a coleta de sangue foi realizada através da punção da artéria da cauda com seringa descartável de 1mL (BD Plastipak). Foi coletado aproximadamente 1mL de sangue. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. O soro obtido foi separado da fração celular e mantido resfriado a -4°C. O soro não utilizado imediatamente foi mantido a -70°C até a realização dos testes.

3.5.2 - Testes de Análises Clínicas

As amostras de soro foram submetidas a testes de rotina laboratorial para determinação de lesão hepatocelular, através da quantificação das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) através de Método Colorimétrico de Química Seca. Também foram submetidas a testes de função hepática, a fim de quantificar a concentração sérica total de bilirrubina (BilT), através do Método de Van den Bergh, e de albumina (ALB) através do Teste Padrão de Determinação de Albumina pelo Método Verde de Bromocresol.

3. 6 - Análises Ultra-sonográficas

3.6.1 – Exames de ultra-som

Para a realização dos exames ultra-sonográficos dos ratos, foi utilizado equipamento de ultra-sonografia comercialmente disponível (Caris Plus - Esaote) e transdutor linear multifrequencial de 7,5-10MHz no modo-B.

Para possibilitar a manipulação do animal e melhor observação durante o exame, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma dose de 0,1g/kg de xilazina 10% (Fort Dodge), associada a uma dose de 0,2g/kg de quetamina 2% (Fort Dodge). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal, realizamos tricotomia da região abdominal logo abaixo da parte inferior da caixa torácica. Aplicamos uma espessa camada de gel de contato para transmissão ultra-sônica (Carbogel).

Os parâmetros de avaliação ultra-sonográfica avaliados foram: diâmetro transversal do fígado, ascite, ecogenicidade hepática, relação da ecogenicidade hepática em relação a ecogenicidade do rim direito, calibre e tortuosidade da veia porta.

Para mensurar o diâmetro transversal do fígado, analisar a ecogenicidade do órgão como um todo e investigar a presença de ascite, o transdutor foi posicionado de maneira transversal, direcionada à caixa torácica do animal, logo abaixo do processo xifóide, com ângulo de aproximadamente 45 graus em relação ao abdome. Para analisar a veia porta, transdutor linear foi posicionado na linha média do animal, apoiada ao tórax com ângulo de aproximadamente 90 graus em relação ao abdome. Para analisar a

ecogenicidade do fígado em relação ao rim, a sonda linear foi posicionada paralelamente à direta da linha média do animal, com ângulo de aproximadamente 90 graus em relação ao abdome (Figura 8).

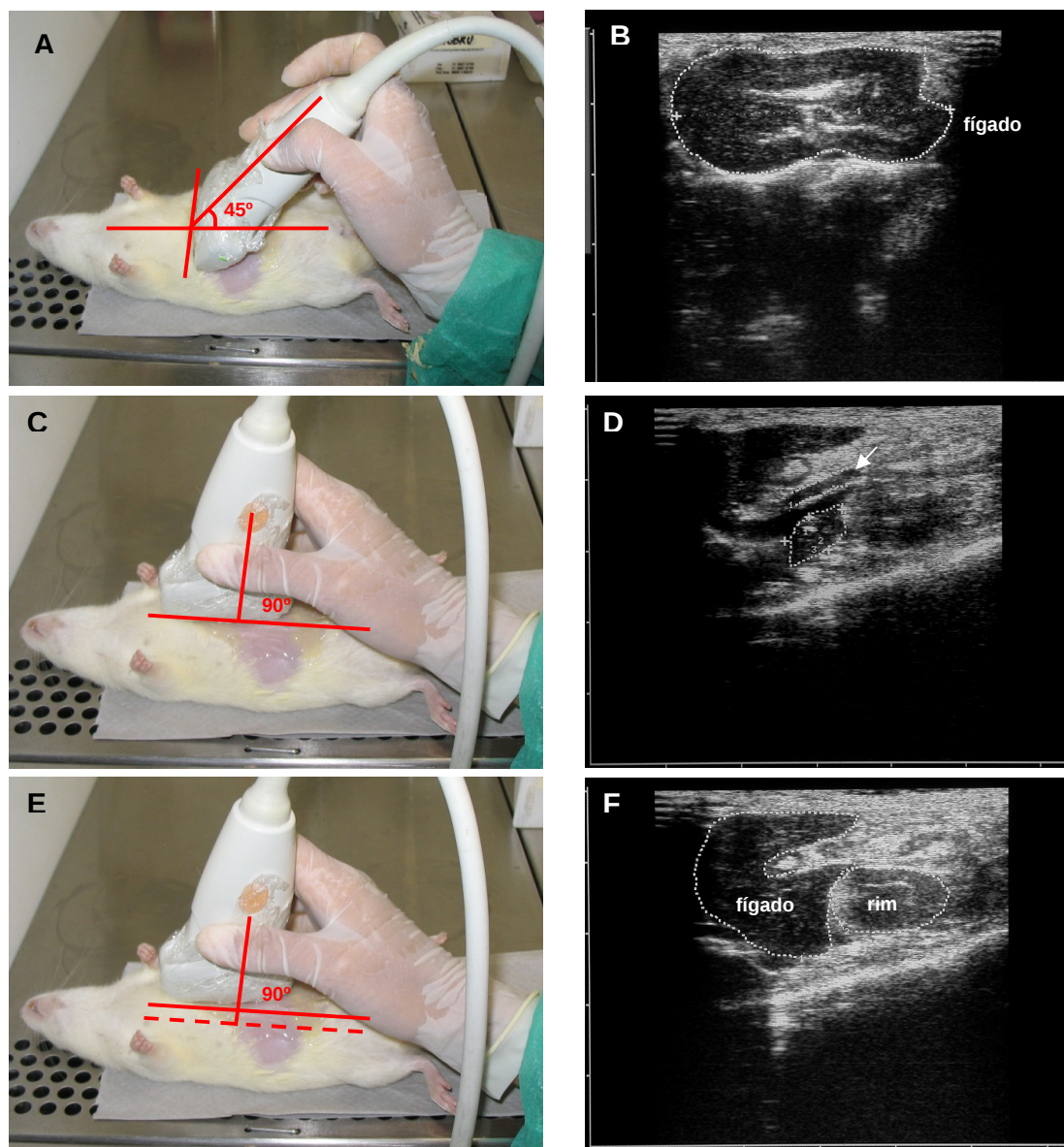


FIGURA 8 – Posicionamento do transdutor linear para realização do exame de ultra-som (A, C, E) e as imagens respectivas a cada exame (B, D, F). Em (A), o transdutor é posicionado transversalmente abaixo da caixa torácica do animal, com ângulo de 45° em relação ao abdome. A imagem (B) permite a análise da ecogenicidade e diâmetro transversal de um plano transversal do fígado (linha pontilhada). Em (C), o transdutor é posicionado sobre a linha média do animal, com ângulo de 90° em relação ao abdome. A imagem (D) permite a análise do calibre e tortuosidade da veia porta (seta branca). Em (E), o transdutor é posicionado à direita da linha média, com ângulo de 90° em relação ao abdome. A imagem (F) permite a análise da ecogenicidade de um plano lateral do fígado em relação ao rim direito.

3.6.2 – Estadiamento do fígado por ultra-som

Após as análises e a caracterização dos parâmetros ultra-sonográficos, elaboramos um sistema de pontuação para cada parâmetro a fim de determinar a severidade das alterações ultra-sonográficas observadas (Tabela 6). O estágio da doença hepática crônica é calculado pela soma dos pontos que cada parâmetro ultra-sonográfico foi avaliado. Ou seja, quanto maior a pontuação maior é o grau de gravidade da injúria hepática.

Tabela 6 – Sistema de pontuação dos parâmetros ultra-sonográficos.

	Pontuação
<u>Calibre da Veia Porta</u>	
normal (menor ou igual a 0,19cm*)	0
aumentada (maior que 0,19cm)	1
aumentada (maior que 0,19cm) e tortuosa	2
<u>Ecotextura do fígado</u>	
normal	0
difusamente aumentada	1
discretamente grosseira	2
moderada ou acentuadamente grosseira	3
<u>Ecogenicidade do fígado em relação ao rim</u>	
menor que o rim	0
igual ao rim	1
maior que o rim	2
<u>Ascite</u>	
ausente	0
mínima ou transitória	1
moderada ou acentuada	2
Pontuação Máxima Final	9

* através da análise estatística dos dados do calibre da veia porta dos ratos normais, observamos o intervalo de confiança, informando que a verdadeira média do calibre da veia porta em ratos normais pode se apresentar entre 0,15cm a 0,19cm. Ao considerar o valor máximo desse intervalo, sugerimos que calibres acima desse valor estariam relacionados a alterações morfológicas deste parâmetro.

3. 7 – Análise Estatística

Os dados de consumo de dieta líquida e consumo de calorias foram analisados através testes t, utilizando o programa GraphPad PRISM 4 (GraphPad Software). Os dados das análises de peso corporal, bioquímica e de ultra-som foram analisados através de testes two-way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni, utilizando o programa STATISTICA 6.0 (StatSoft), que comparou todos os grupos entre si, nos diferentes períodos de análise. Em todas as análises estatísticas, consideramos que $P < 0,05$ para determinar a significância da diferença entre os grupos. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

4 – RESULTADOS

4.1 – Análise do Peso e Consumo das Dietas Líquidas

4.1.1 – Peso dos animais durante o experimento

A fim de acompanhar a evolução ponderal dos ratos em cada condição experimental, realizamos a pesagem dos animais de cada grupo, e obtivemos o peso médio por grupo ao longo das 12 semanas de experimento.

Conforme podemos observar na Tabela 7, os resultados demonstraram que o grupo RP (dieta padrão), o grupo C1 (dieta-controle) e o grupo C2 (dieta-controle + veículo) apresentaram aumento progressivo dos pesos médios ao longo do experimento, com aumento significativo apenas no período de 12 semanas [RP – $200,4 \pm 3,5$ ($p < 0,05$); C1 – $194,8 \pm 9,2$ ($p < 0,05$); C2 – $196,2 \pm 2,3$ ($p < 0,05$)] em relação aos seus respectivos pesos médios imediatamente antes do início do protocolo experimental [RP – $192,2 \pm 4,3$; C1 – $182,3 \pm 11,8$; C2 – $184,5 \pm 2,1$]. Esses dados demonstram que os animais dos grupos C1 e C2 desenvolveram-se de maneira semelhante ao grupo RP, indicando que a administração de dieta-controle é capaz de suprir as necessidades nutricionais dos animais.

Já o grupo A1 (dieta-álcool) e o grupo A2 (dieta-álcool+veículo) mantiveram seus pesos médios durante as 12 semanas com valores semelhantes (entre $183,2 \pm 8,9$ e $188,6 \pm 7,6$), não apresentando diferenças significativas entre os períodos analisados. Esses dados demonstram que a administração de dieta-álcool inibe o crescimento normal dos ratos, mas não

causa redução de peso evidente. Entretanto, o grupo C3 (dieta-controle + CCl₄) apresentou queda significativa de peso médio após 8 semanas ($p<0,05$) e 12 semanas ($p<0,001$) de administração de CCl₄.

O grupo A3 (dieta-álcool + CCl₄) apresentou um perfil semelhante ao grupo C3, com queda de peso médio a partir de 8 semanas ($p<0,001$).

Esses dados demonstram que a dose administrada de CCl₄ induz uma perda ponderal tanto nos animais que receberam dieta-controle como naqueles que receberam dieta-álcool, indicando que essas alterações estão relacionadas diretamente à toxicidade do CCl₄.

Tabela 7 – Peso médio dos ratos por grupo durante 12 semanas de experimento.

Grupos	semanas de experimento			
	0	4	8	12
RP	192,2 ±4,3 (n= 7)	194,4 ±8,6 (n= 5)	199,5 ±3,3 (n= 5)	200,4 ±3,5 ^a (n= 5)
C1	182,3 ±11,8 (n= 4)	184,8 ±9,3 (n= 4)	190,1 ±10,6 (n= 4)	194,8 ±8,2 ^a (n= 4)
C2	184,5 ±2,1 (n= 4)	185,1 ±5,8 (n= 4)	193,6 ±9,3 (n= 4)	196,2 ±2,3 ^a (n= 4)
C3	187,4 ±6,5 (n= 5)	186,3 ±3,0 (n= 5)	175,4 ±7,0 ^b (n= 5)	166,6 ±2,7 ^c (n= 4)
A1	187,5 ±8,3 (n= 5)	188,6 ±7,6 (n= 5)	185,1 ±5,3 (n= 5)	185,5 ±10,8 (n= 5)
A2	188,1 ±9,9 (n= 5)	185,9 ±4,5 (n= 5)	185,5 ±12,4 (n= 5)	183,2 ±8,9 (n= 5)
A3	190,7 ±5,8 (n=49)	189,6 ±6,8 (n=42)	162,8 ±13,5 ^c (n=29)	154,4 ±23,8 ^c (n=17)

valores expressos como média ± desvio padrão em gramas (g)

^a $p<0,05$ vs respectivo peso médio em 0 semanas

^b $p<0,05$ vs respectivo peso médio em 0 e 4 semanas

^c $p<0,001$ vs respectivo peso médio em 0 e 4 semanas

Quando comparamos os pesos médios de cada grupo dentro de cada período do experimento (0, 4, 8 e 12 semanas), os resultados demonstraram que não há diferença significativa entre os pesos médios dos grupos RP, C1, C2, C3, A1, A2 e A3 nos períodos de 0 semana (Figura 9A) e 4 semanas (Figura 9B). É importante notar que em ambos os períodos, os grupos que receberam dieta líquida apresentaram valores de peso médio relativamente próximos, na faixa dos 180 a 190g.

No entanto, após 8 semanas de administração de CCl_4 , observamos que enquanto há aumento dos pesos médios nos grupos RP, C1 e C2, há manutenção dos pesos médios dos grupos A1 e A2 (Figura 9C). Também observamos que o grupo C3 apresenta queda significativa de peso médio ($p < 0,05$) em relação ao grupo RP. Já o grupo A3 apresenta queda significativa dos pesos médios em relação aos grupos RP e C2 ($p < 0,001$), C1, A1 e A2 ($p < 0,01$). Não há diferença significativa entre o peso médio do grupo C3 e do grupo A3 indicando que o CCl_4 é responsável pela perda de peso.

Após 12 semanas de experimento (Figura 9D), observamos que os pesos médios dos grupos RP, C1 e C2 aumentaram, enquanto não há variação nos pesos médios dos grupos A1 e A2. Há também uma queda significativa dos pesos médios dos grupos C3 e A3 em relação ao período anterior. O grupo C3 apresenta queda significativa ($p < 0,05$) de peso médio em relação ao grupo RP. O grupo A3 apresenta queda significativa dos pesos médios em relação aos grupos RP, C1, C2 ($p < 0,001$), A2 ($p < 0,01$) e A1 ($p < 0,05$).

Esses dados demonstram, que dentre os períodos analisados, só é possível observar os efeitos da toxicidade do CCl_4 sobre o peso médio dos animais após 8 semanas.

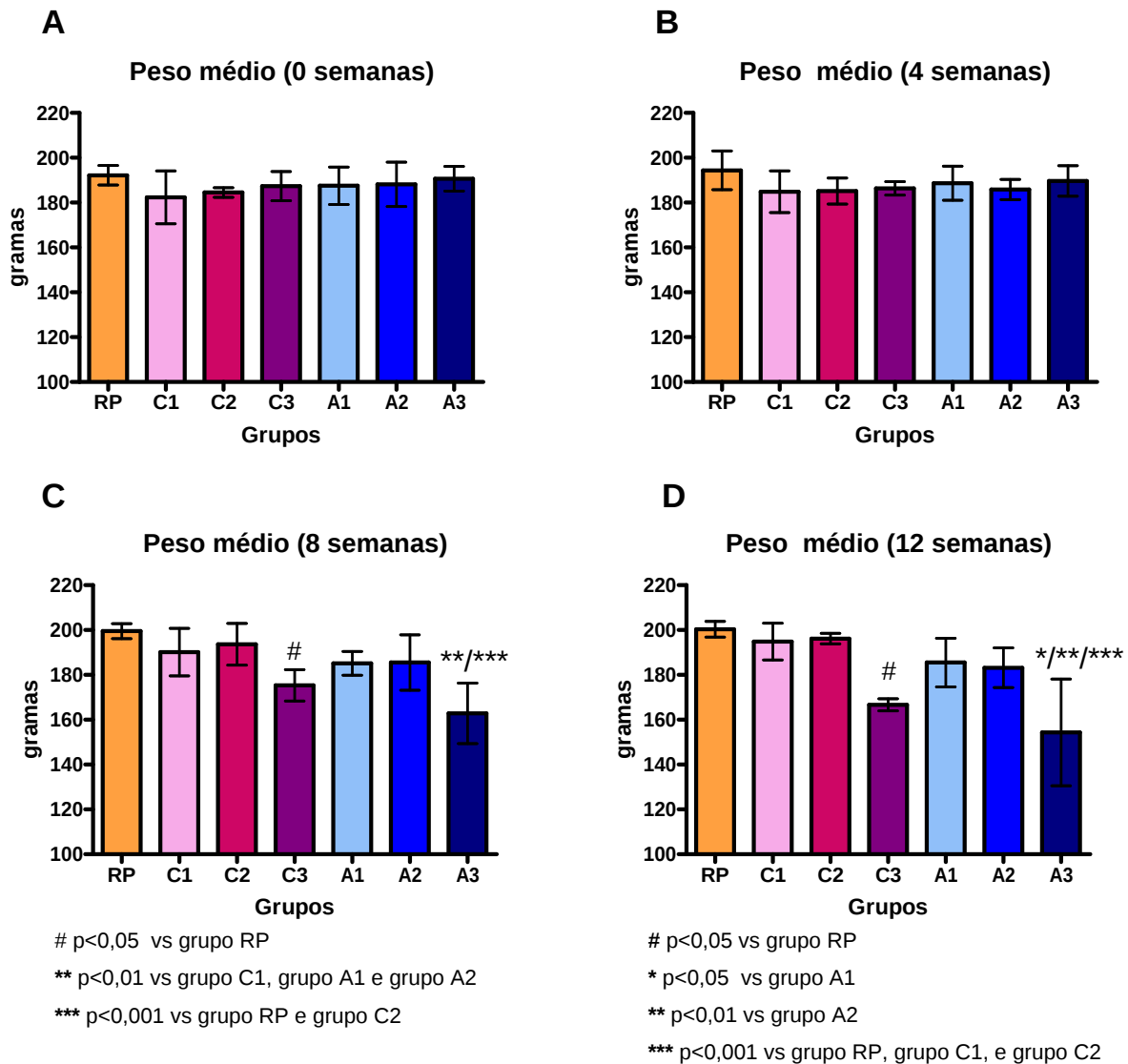


Figura 9 – Pesos médios dos animais por grupo experimental nos períodos de 0 semana (A), 4 semanas (B), 8 semanas (C) e 12 semanas (D) de protocolo experimental. Em (A) e (B), observamos que não houve diferença significativa nos pesos médios dos animais em todos os grupos analisados. Em (C) e (D), observamos aumento do peso médio nos grupos RP, C1 e C2, e queda significativa do peso médio nos grupos C3 e A3. Os grupos A1 e A2 mantiveram seus pesos médios sem alterações ao longo do experimento.

4.1.2 – Consumo de dieta líquida, de calorias e ingestão de etanol

A fim de comparar o consumo da dieta-controle e dieta-álcool, mensuramos o consumo da dieta líquida pelos grupos experimentais. O consumo médio por animal foi estimado a partir do volume consumido por caixa experimental dividido pelo número de animais correspondentes.

Os resultados demonstraram que o consumo médio diário de dieta líquida foi menor ($p < 0,01$) nos grupos que receberam dieta-álcool ($62,1 \pm 25,9$; grupos A1, A2 e A3) que nos grupos que receberam dieta-controle ($82,9 \pm 26,9$; grupos C1, C2 e C3), no decorrer das 12 semanas de experimento (Figura 10).

Ao analisarmos o consumo médio de dieta por grupo (Tabela 8), verificamos que o consumo médio das dietas líquidas foi semelhante em todos os grupos (entre $60,5 \pm 24,2\text{mL}$ e $68,7 \pm 17,4\text{mL}$) após 4 semanas de experimento. Após 8 semanas, o grupo C1 ($97,8 \pm 33,9\text{mL}$), grupo C2 ($101,6 \pm 32,3\text{mL}$) e grupo C3 ($103,3 \pm 31,1\text{mL}$) apresentaram aumento significativo de consumo médio ($p < 0,001$) em relação ao período anterior. Após 12 semanas, o consumo médio dos grupos C1 ($80,7 \pm 23,4\text{mL}$), C2 ($81,7 \pm 15,5\text{mL}$) e C3 ($84,1 \pm 15,7$) apresentou uma queda significativa ($p < 0,05$) em relação ao período de 8 semanas. Já os grupos A1, A2 e A3 apresentaram oscilações entre aumento e queda de consumo médio entre os períodos de 8 e 12 semanas, porém sem apresentar diferenças significativas. Esses resultados sugerem que a suplementação de álcool na dieta pode ter contribuído significativamente para a diminuição do consumo da dieta líquida

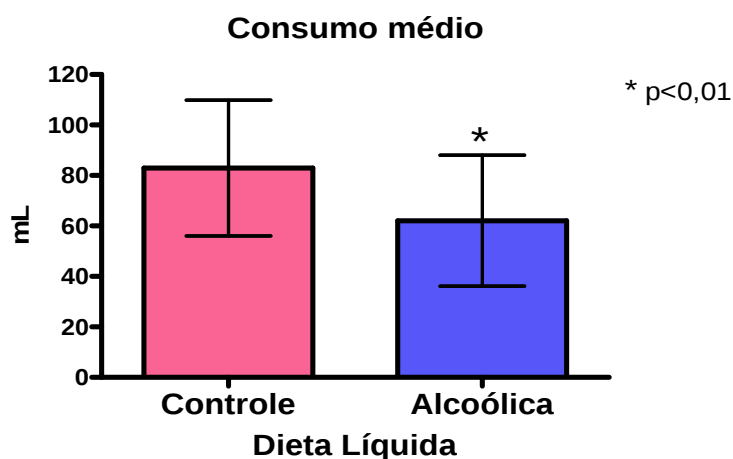


Figura 10 – Consumo médio de dieta líquida ao final de 12 semanas de experimento. O consumo médio de dieta líquida alcoólica foi significativamente menor ($p < 0,01$) que o consumo médio de dieta líquida controle.

Tabela 8 – Consumo médio de dieta líquida por grupo experimental ao longo de 12 semanas de experimento.

Grupos	semanas de experimento		
	4	8	12
C1	67,4±21,2	97,8±33,9 ^a	80,7±23,4
C2	68,7±17,4	101,6±32,3 ^a	81,7±15,5
C3	67,8±22,9	103,3±31,1 ^a	84,1±15,7
A1	67,8±30,1	64,6±28,3	55,3±17,9
A2	62,8±26,5	58,8±27,9	62,4±24,2
A3	60,5±24,2	65,8±23,2	52,6±25,8

valores expressos como média ± desvio padrão em mililitros (mL)

^a $p < 0,001$ vs 4 semanas

Ao realizarmos uma estimativa da média de consumo de calorias através dos dados das médias de consumo de dieta líquida de ambos grupos (controle e álcool), observamos que não houve diferença no consumo de calorias entre os grupos, conforme verificamos na Tabela 9.

Tabela 9 – Estimativa do consumo médio de calorias por grupo experimental após 12 semanas de experimento.

Grupo	Calorias consumidas
Dieta Controle	79,8±26 kcal
Dieta Líquida	82,7±33 kcal
valores expressos como média ± desvio padrão	
1000mL de dieta líquida controle	963,1 kcal
1000mL de dieta líquida alcoólica	1331,1 kcal

A dose média de etanol ingerida pelos animais dos grupos A1, A2 e A3 foi estimada com base na concentração de etanol (5,5% m/v) na dieta-álcool e nos valores do consumo médio de dieta líquida alcoólica, em relação ao peso médio dos animais de cada grupo experimental.

Os resultados demonstraram que a dose média de etanol ingerida pelos animais dos grupos A1, A2 e A3 se manteve entre $16,4 \pm 7,4$ g/Kg/dia e $22,2 \pm 7,8$ g/Kg/dia, sem apresentar diferenças significativas entre os grupos e entre os períodos analisados (Tabela 9).

Tabela 10 – Dose média de etanol por grupo ao longo das 12 semanas de experimento.

Grupos	semanas de experimento		
	4	8	12
A1	19,8 $\pm$ 8,6	18,8 $\pm$ 10,3	16,4 $\pm$ 7,4
A2	18,6 $\pm$ 7,6	17,4 $\pm$ 8,0	18,7 $\pm$ 7,1
A3	17,6 $\pm$ 7,0	22,2 $\pm$ 7,8	18,7 $\pm$ 9,2

valores expressos como média $\pm$ desvio padrão
em gramas por quilograma ao dia (g/kg/dia)

4.2 – Análise Macroscópica do Fígado

Com a finalidade de caracterizar a morfologia dos fígados removidos, foram feitas análises da superfície do órgão, levando em conta a textura, aparência, consistência e coloração.

Ao final do período de 12 semanas de experimento, os fígados dos ratos sacrificados do grupo RP (n=5) apresentaram uma textura superficial lisa, cor marrom avermelhada e consistência elástica, características também observadas em fígados de ratos saudáveis sacrificados antes do início do experimento (Figura 11A). Os fígados dos ratos do grupo C1 (n=4) e do grupo C2 (n=4) (Figura 11B) e do grupo A1 (n=5) e A2 (n=5) (Figura 11C), sacrificados no mesmo período, apresentaram os mesmos padrões morfológicos do grupo RP.

Os fígados dos ratos sacrificados do grupo C3 (n=5) apresentaram alterações morfológicas evidentes quando comparados aos padrões acima descritos. Observamos que estes fígados apresentam uma textura superficial irregular causada pela presença discreta de nódulos pequenos na superfície do órgão, aspecto rugoso, consistência rígida e coloração vermelha (Figura 11A).

Os fígados dos ratos sacrificados do grupo A3 (n=7) apresentaram morfologia alterada visualizada já na quarta semana de indução de cirrose hepática (n=3). Observamos que neste tempo, os fígados já apresentavam consistência friável, textura superficial irregular suave e coloração amarelada semelhante ao aspecto do fígado humano esteatótico (Figura 11B). Ao final de

8 semanas (n=3), os fígados apresentaram consistência mais rígida, presença de septos, textura superficial irregular causada pela presença discreta de nódulos pequenos na superfície do fígado e coloração pardo-amarelada (Figura 11C). Já com 12 semanas de experimento (n=7), os fígados apresentaram tamanho reduzido (atrofia) e características como consistência rígida, presença de septos intraparenquimatosos, coloração avermelhada, textura irregular causada pela presença difusa de nódulos grandes e pálidos distribuídos pela superfície do órgão, características semelhantes ao padrão de cirrose hepática em humanos (Figura 11D).

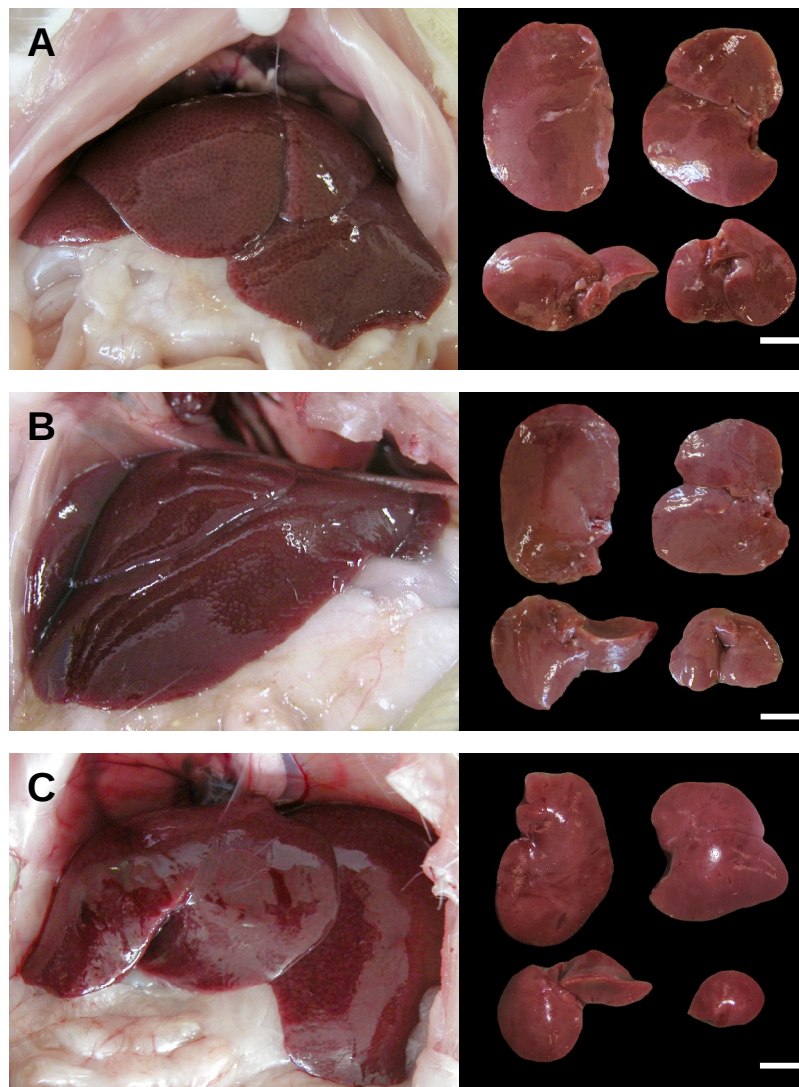
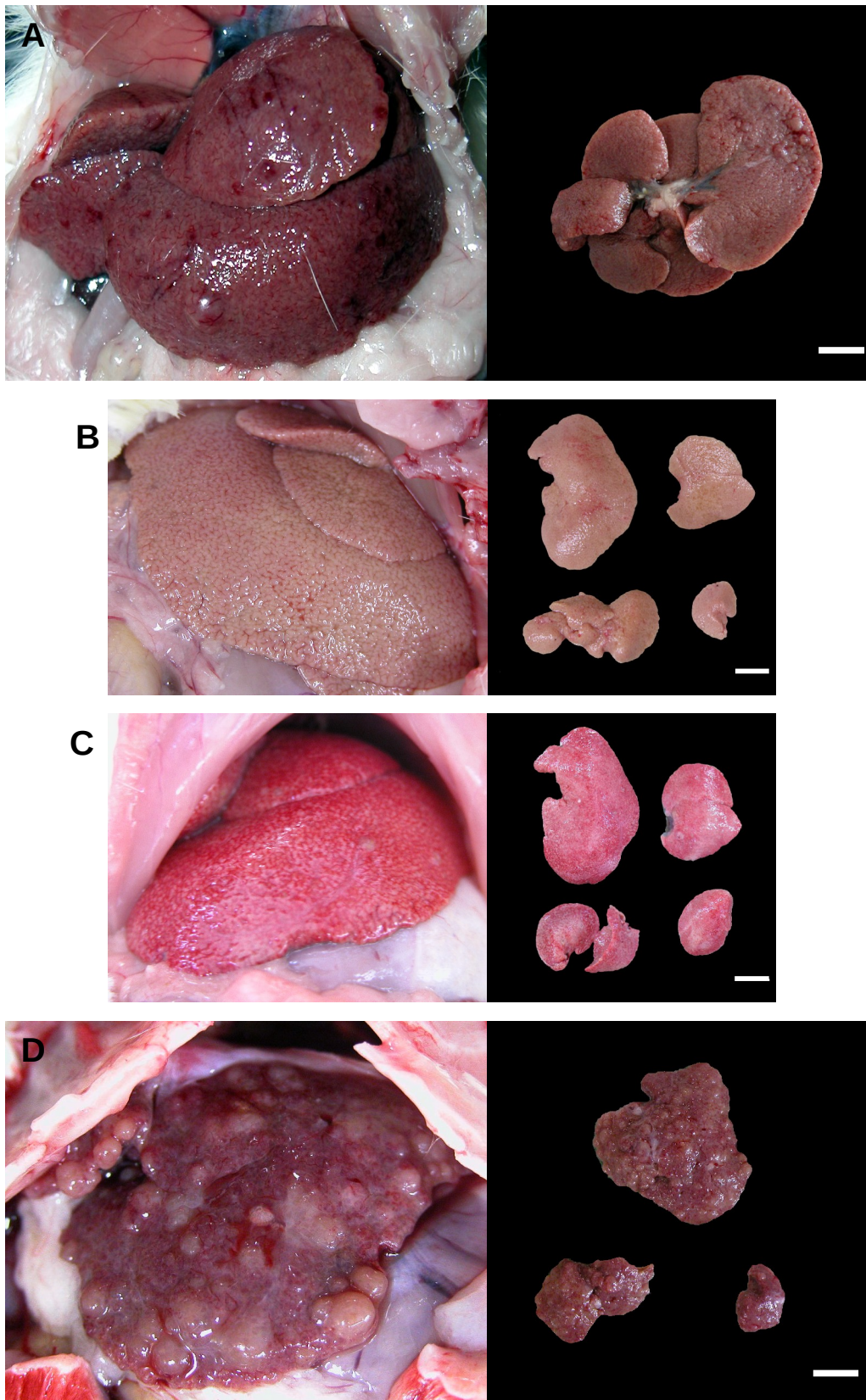


Figura 11 – Imagens representativas da morfologia dos fígados dos animais do grupo RP (A), dos grupos C1 e C2 (B) e dos grupos A1 e A2 (C). Os fígados apresentaram características normais como textura superficial lisa, coloração marrom avermelhada, ausência de septos interlobulares e consistência friável. Barras de calibração: 1cm.

Figura 12 – Imagens representativas da morfologia dos fígados dos animais do grupo C3 após 12 semanas (A), e do grupo A3 nos períodos de 4 semanas (B), 8 semanas (C) e 12 semanas (D) de indução de lesão crônica. Em (A), observamos que os fígados apresentaram uma textura superficial irregular causada pela presença discreta de nódulos pequenos na superfície do órgão, aspecto rugoso, consistência rígida e coloração vermelha, características relacionadas à cirrose hepática. Em (B), os fígados apresentaram características relacionadas a esteatose hepática como consistência friável, textura superficial irregular suave, aspecto adiposo e coloração amarelada. Em (C), observamos alterações relacionadas à fibrose avançada como consistência mais rígida, presença de septos, textura superficial irregular causada pela presença discreta de nódulos pequenos na superfície do fígado e coloração pardo-amarelada. Em (D), observamos alterações relacionadas à cirrose hepática de grau mais avançado, tais como consistência rígida, presença de septos intraparenquimatosos, coloração avermelhada, textura irregular causada pela presença difusa de nódulos grandes e pálidos distribuídos pela superfície do órgão. Barras de calibração: 1cm.



4.3 – Análise Microscópica do Fígado

Com a finalidade de caracterizar os aspectos histológicos envolvidos no processo de indução e evolução da cirrose hepática, foram feitas análises histológicas de fígado a partir da coloração por hematoxilina e eosina (H/E), para observar os componentes celulares do parênquima hepático, e coloração por picrosírius, para observar a trama de colágeno no parênquima hepático.

As análises das amostras histológicas demonstraram que os animais dos grupos RP, C1, C2, A1 e A2 não apresentaram alterações ao final de 12 semanas de experimento. Pudemos observar que o parênquima hepático manteve sua arquitetura normal, não apresenta infiltrado inflamatório (Figura 13A), os hepatócitos, com núcleos grandes e arredondados, formam traves que irradiam da veia central, delimitando os sinusóides (Figura 13C). Além disso, observamos que o colágeno só se apresenta nas regiões da veia central e veia porta (Figura 13B e 13D), e que não há formação de septos fibrosos no parênquima hepático.

Já as amostras dos animais do grupo C3 apresentaram alterações evidentes após 12 semanas de experimento. Observamos a desestruturação do parênquima hepático, onde não é possível distinguir as traves hepatocelulares; os hepatócitos se apresentavam tumefeitos com discreta modificação de sua forma, anisocariose e acúmulo de lipídios em microgotículas (esteatose microgoticular) no citoplasma, além de proliferação de ductos biliares (Figura 13E). Também observamos a presença de septos

fibróticos finos ou espessos que circundavam grupos de hepatócitos formando nódulos evidentes (Figura 13F). Estes resultados indicam que a intoxicação somente por CCl_4 induz uma cirrose hepática.

As amostras dos animais do grupo A3 apresentaram alterações evidenciadas ao longo do experimento. Após 4 semanas de intoxicação por CCl_4 e etanol, observamos uma desorganização da estrutura hepática causada pela degeneração gordurosa (esteatose) hepática difusa (Figura 14A), e também o início da formação de septos fibróticos, irradiando das margens das veias centrolobulares (Figura 14B). Após 8 semanas, observamos avanço da desestruturação do parênquima hepático, hepatócitos tumefeitos e infiltrado inflamatório moderado intraseptal e intralobular (Figura 14C). Há a formação de septos fibróticos com espessura fina e formação de nódulos (Figura 14D). Após 12 semanas, observamos total desorganização do parênquima hepático, com tumefação de hepatócitos, redução do acúmulo de lipídeos, infiltrado inflamatório moderado e proliferação de ductos biliares nos espaços portais (Figura 14E e 14F). Também observamos a formação de septos fibróticos espessos, além da formação de nódulos envolvidos por fibras colágenas espessas (Figura 14G), e o aumento da quantidade de colágeno na região periportal (Figura 14H). Esses resultados demonstraram que a intoxicação por CCl_4 associada à ingestão de etanol induz uma cirrose hepática.

Figura 13 – Micrografias histológicas representativas dos fígados dos animais do grupo RP, C1, C2, A1 e A2 (A - D), e dos grupos C3 (E e F) e dos grupos A1 e A2 (C). Em (A), observamos o parênquima hepático com arquitetura normal, traves hepatocelulares irradiando das veias centrais (VC), e alguns tratos portais (TP). Em (C), podemos observar os hepatócitos com núcleos grandes e arredondados (cabeças de setas) formando traves hepatocelulares, os sinusóides (setas) que desembocam na veia central (VC). Em (B), observamos a presença de colágeno somente nas regiões peri-portais e peri-centrais, sem a formação de septos fibróticos. Em (D), observamos em maior detalhe o colágeno intersticial que envolve as estruturas do trato portal: veia porta (VP), ducto biliar (DB) e artéria hepática (AH). Em (E), observamos a desorganização da arquitetura normal do fígado, com hepatócitos tumefeitos, de núcleos irregulares (cabeças de seta) e com acúmulo de lipídios (setas). Em (F), podemos observar aumento da quantidade de colágeno (corado em vermelho) formação de nódulos envolvidos por fibras colágenas espessas, indicando a cirrose hepática. Colorações - A,C,E - H/E; B,D,F – Picrosírius. Barras de calibração: A, B, F – 200µm; C,D,E - 20µm.

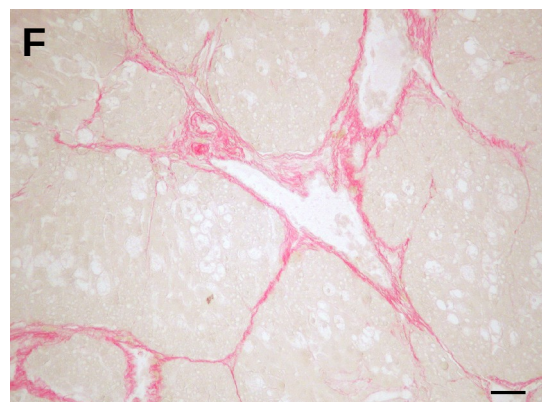
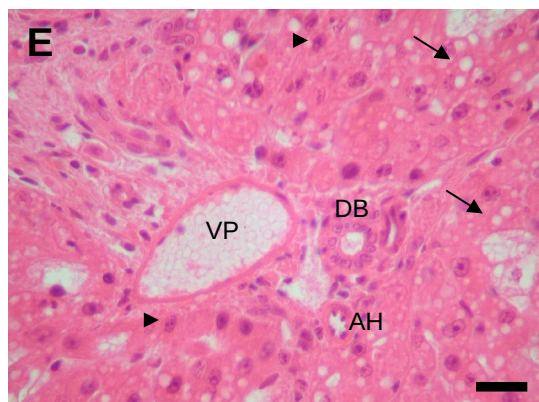
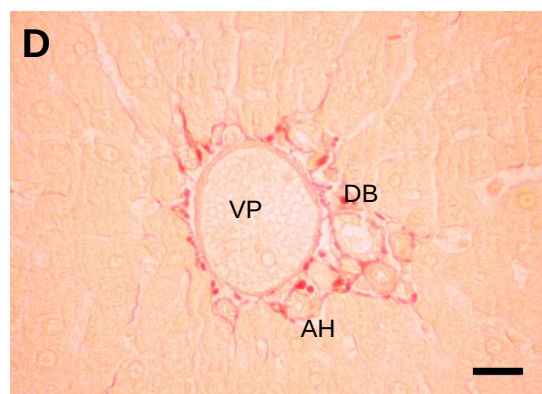
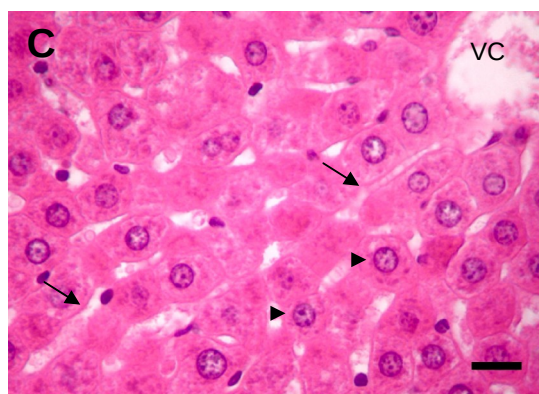
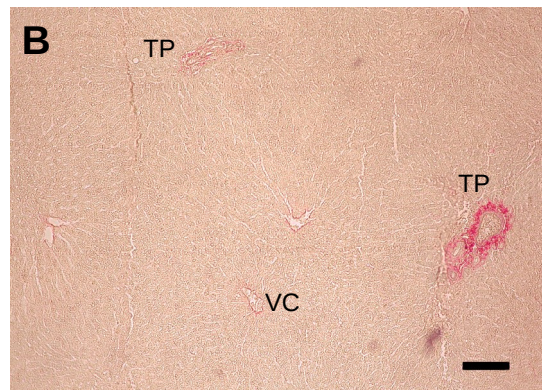
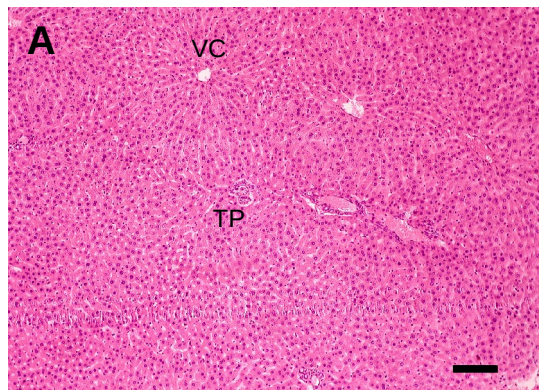
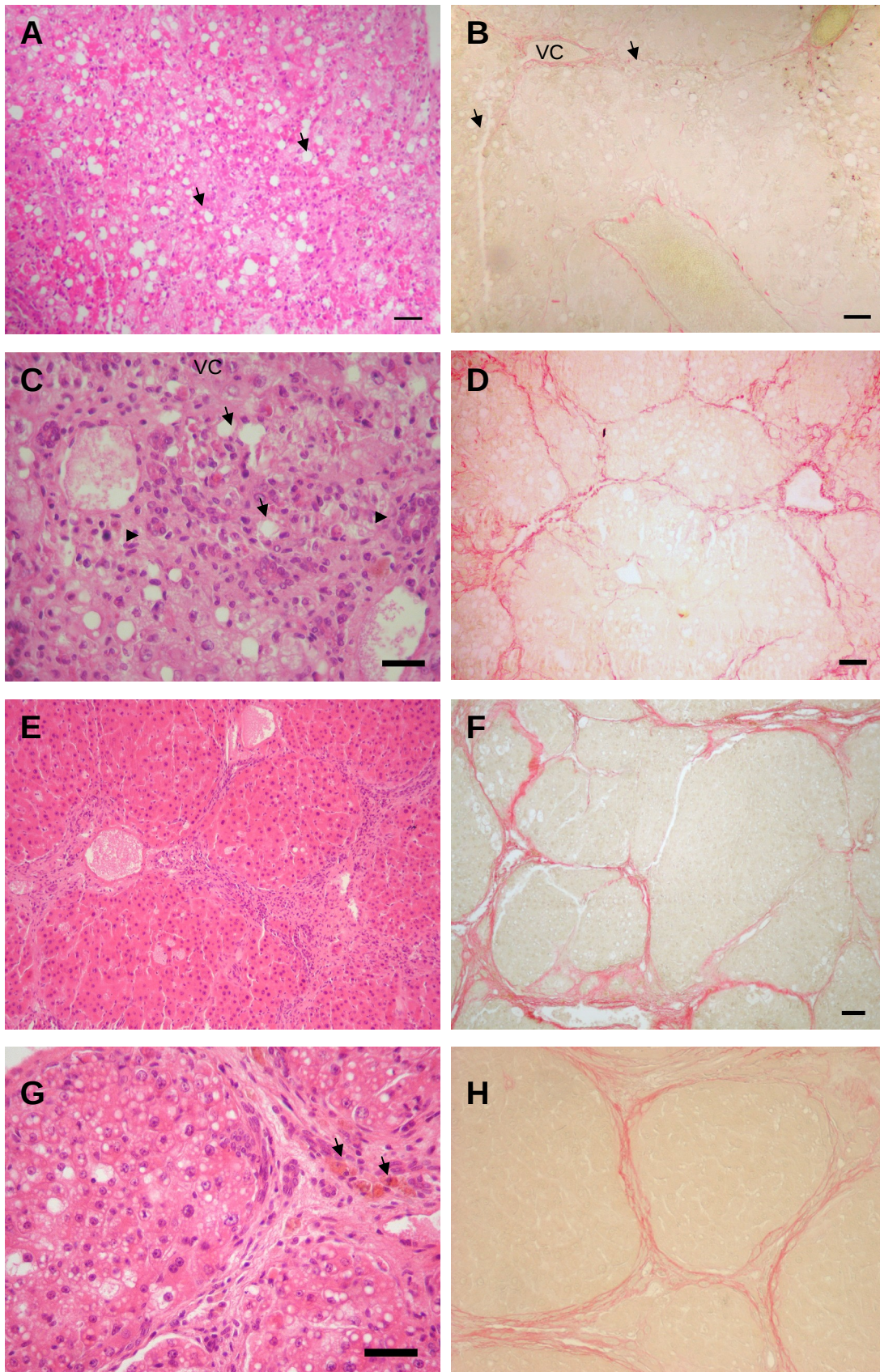


Figura 14 – Micrografias histológicas representativas dos fígados dos animais do grupo A3 após 4 semanas (A e B), 8 semanas (C e D) e 12 semanas (E – H). Em (A), observamos o acúmulo de gordura (seta) nos hepatócitos (esteatose hepática difusa), dificultando a visualização das traves hepatocelulares. Em (B), observamos aumento da quantidade de colágeno pericentral (corados em vermelho) e a formação de septos fibróticos irradiando das veias centrais (setas). Em (C), observamos a proliferação de ductos biliares (cabeças de setas), esteatose (setas), hepatócitos tumefeitos com núcleos irregulares. Em (D), observamos a formação de septos fibróticos de espessura fina, e início da formação de nódulos encapsulados por fibras colágenas. Em (E) e (G), podemos observar redução da esteatose, hepatócitos tumefeitos e corpúsculos de Mallory (setas). Em (F) e (H), observamos a formação de nódulos completos, com fibras colágenas espessas, indicando cirrose hepática. Colorações - A,C,E,G - H/E; B,D,F,H – Picrosírius. Barras de calibração: A, B, D, F – 200µm; C, E, G, H - 20µm.



4.4 – Análise dos Parâmetros de Bioquímica

4.4.1 – Testes Bioquímicos para Enzimas Hepáticas

A fim de verificar possíveis alterações nos níveis séricos das enzimas hepáticas dos animais no decorrer do experimento, realizamos os testes bioquímicos para as enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), ambas relacionadas à lesão hepatocelular.

Antes de iniciarmos o protocolo experimental, realizamos os testes bioquímicos para AST e ALT em uma amostra de ratos do nosso laboratório (grupo padrão – PdrN), a fim de obtermos os valores padrões médios de cada teste bioquímico (Tabela 10).

Ao compararmos os valores médios de AST e ALT entre o grupo RP e o grupo PdrN, observamos que não houve qualquer alteração nos níveis das enzimas séricas em ambos testes, nos períodos de 0, 4, 8 e 12 semanas de experimento (Figura 15), indicando que durante o período do experimento não há variação nos níveis das enzimas séricas analisadas.

Tabela 11 – Valor padrão médio dos testes bioquímicos para aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

Testes	Grupo Padrão
AST	97,0±31,2 UI/L (n = 85)
ALT	51,4±10,8 UI/L (n = 84)

valores expressos como média ± desvio padrão

Ao compararmos os níveis séricos da AST e ALT dos grupos C1, C2, A1 e A2, verificamos que estes apresentaram variações nos valores médios ao longo das 12 semanas. Mesmo apresentando estas oscilações, os níveis de enzimas séricas de AST e ALT destes grupos não apresentaram diferença significativa quando comparados com o grupo padrão, e entre si, em cada um dos períodos analisados (Figura 16). Esses dados demonstram que tanto a dieta-controle como a dieta-álcool, associadas ou não à injeção de veículo, não causam alterações significativas quando são administradas aos animais, indicando que os ratos sob essas condições não apresentam lesão hepatocelular evidente.

Realizamos as análises dos níveis séricos de AST e ALT entre o grupo C3 e grupo A3, e destes em relação aos valores médios do grupo RP, C2 e A2, a fim de verificar a eficiência da intoxicação crônica por CCl_4 (Figura 17). Os resultados demonstraram aumento dos níveis séricos de AST do grupo C3 no decorrer do experimento, porém sem apresentar diferenças significativas em relação aos demais grupos analisados, enquanto os níveis séricos de AST do grupo A3 tiveram aumento significativo após 8 semanas ($p < 0,05$) em relação ao grupo RP e após 12 semanas em relação aos grupos RP ($p < 0,001$) e A2 ($p < 0,01$) (Figura 17A). Os níveis séricos de ALT do grupo C3 aumentaram após 4 semanas ($p < 0,05$) e 8 semanas ($p < 0,01$) de experimento em relação aos valores médios do grupo padrão. Já os níveis séricos de ALT do grupo A3 apresentaram aumento significativo somente após 12 semanas em relação ao grupo RP. Também houve aumento significativo em relação ao grupo A2 nos períodos de 8 e 12 semanas de experimento (Figura 17B).

Esses resultados demonstram que a intoxicação por CCl_4 levou à lesão hepatocelular, levando a aumento nos níveis séricos de AST e ALT.

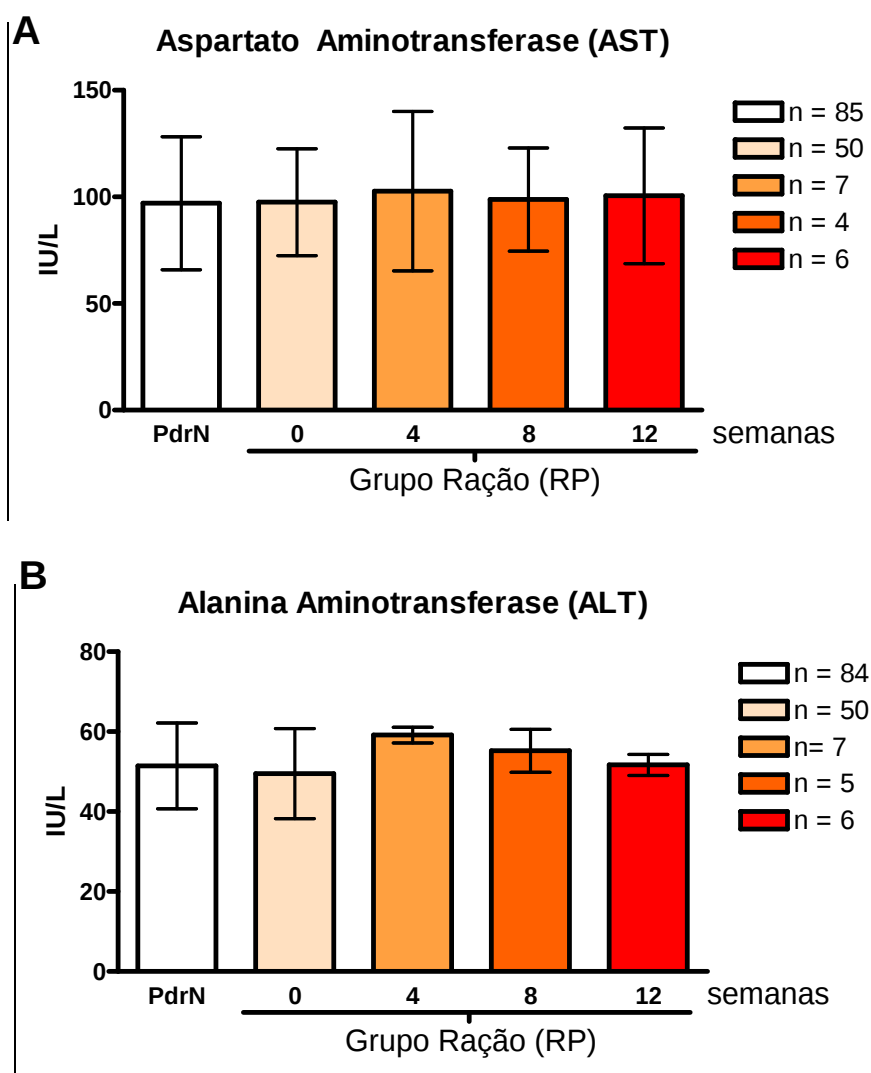


Figura 15 – Níveis séricos das enzimas Aspartato Aminotransferase - AST (A) e Alanina Aminotransferase - ALT (B) do grupo RP nos períodos de 0, 4, 8 e 12 semanas de experimento. Os níveis séricos de AST e ALT do grupo RP não apresentaram alterações significativas ao longo do experimento.

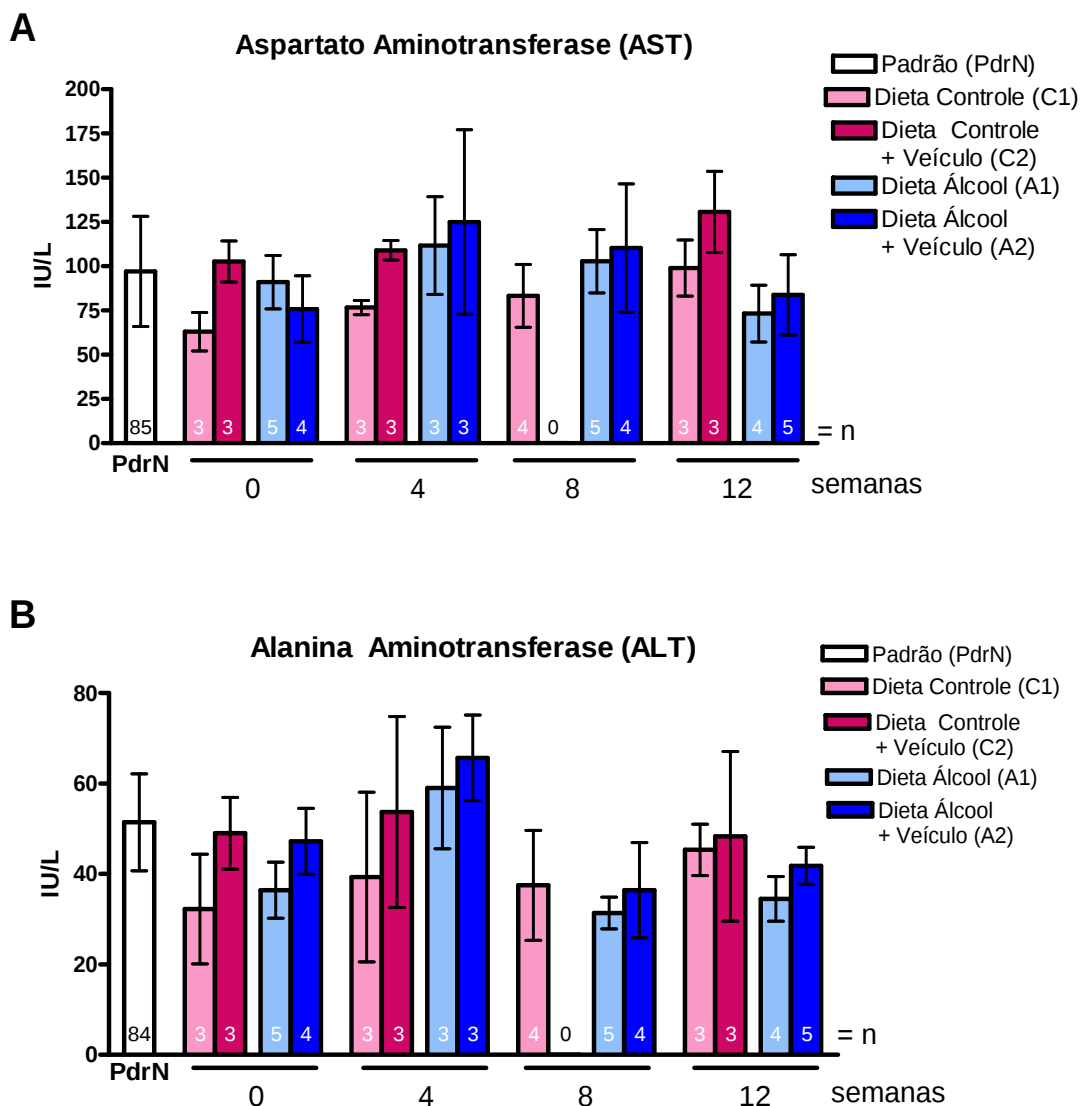
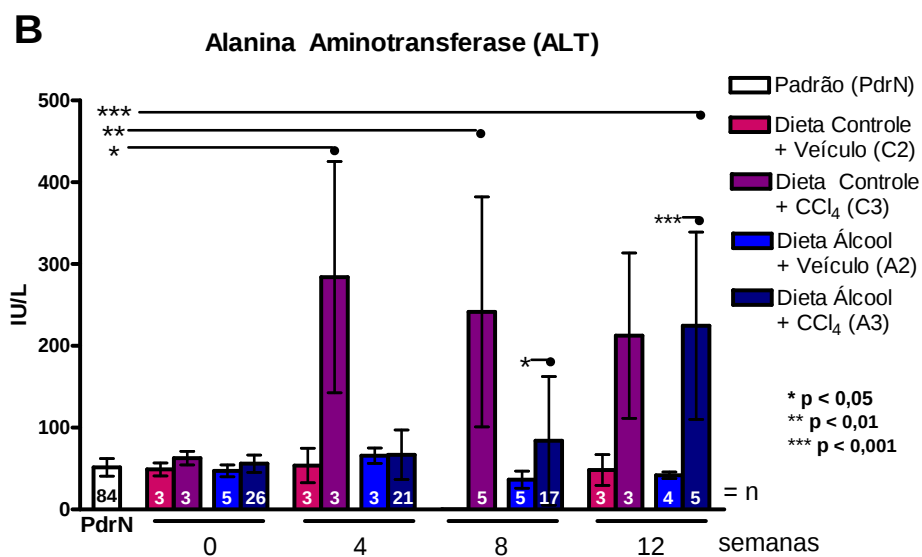
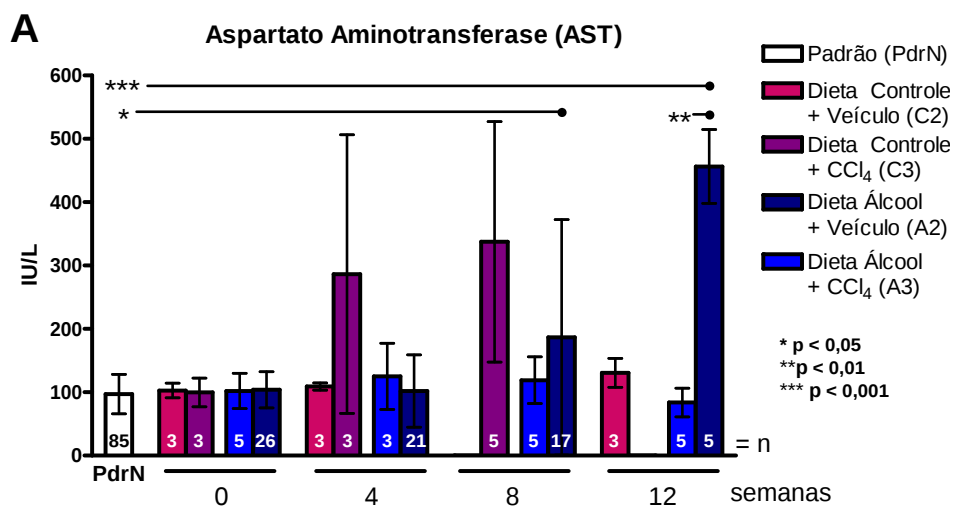


Figura 16 – Níveis séricos das enzimas Aspartato Aminotransferase (A) e Alanina Aminotransferase (B) dos grupos C1, C2, A1 e A2. Os níveis séricos de AST e ALT dos grupos analisados não apresentaram alterações significativas ao longo do experimento.

Figura 17 – Níveis séricos das enzimas Aspartato Aminotransferase (A) e Alanina Aminotransferase (B) dos grupos C2, C3, A2 e A3. Em (A), observamos que os níveis séricos de AST do grupo A3 aumentaram significativamente apenas nos períodos de 8 semanas ($p<0,05$) e 12 semanas ($p<0,001$) de experimento em relação aos valores normais de níveis séricos (PdrN). Também há aumento significativo ($p<0,01$) dos níveis séricos de AST do grupo A3 em relação ao grupo A2 no período de 12 semanas. Os demais grupos não apresentam alterações. Em (B), observamos que os níveis séricos de ALT do grupo C3 aumenta significativamente nos períodos de 4 semanas ($p<0,05$) e 8 semanas ($p<0,01$) em relação a PdrN, enquanto os níveis séricos de ALT do grupo A3 apresentam aumento significativo ($p<0,001$) após 12 semanas em relação a PdrN. Também há aumento significativo dos níveis séricos de ALT do grupo A3 em relação ao grupo A2 no período de 8 semanas ($p<0,05$) e 12 semanas ($p<0,001$) de experimento. Os demais grupos não apresentam alterações.



4.4.2 – Testes Bioquímicos para Função Hepática

A fim de verificar possíveis alterações no desempenho normal das funções hepáticas dos animais no decorrer do experimento, realizamos os testes bioquímicos para bilirrubina total (BiT), teste relacionado à capacidade de biotransformação e excreção de bilirrubina pelos hepatócitos, e albumina sérica (ALB), teste relacionado à capacidade de síntese protéica do hepatócito.

Antes de iniciarmos o protocolo experimental, realizamos os testes bioquímicos BiT e ALB em uma amostra de ratos do nosso laboratório (grupo padrão – PrdN), a fim de obtermos os valores padrão médios de cada teste bioquímico (Tabela 11).

Ao compararmos os valores médios de BiT e ALB do grupo RP com o grupo PdrN, observamos que não houve qualquer alteração na concentração de bilirrubina e albumina, nos períodos de 0, 4, 8 e 12 semanas de experimento (Figura 18), indicando que durante o crescimento dos animais não há variação nos níveis das enzimas séricas analisadas.

Tabela 12 – Valor padrão médio dos testes bioquímicos para Bilirrubina sérica Total (BiT) e Albumina sérica (ALB).

Testes	Grupo Padrão
BiT	0,42±0,16 mg/dL (n = 78)
ALB	3,2±0.4 g/L (n = 78)

valores expressos como média ± desvio padrão

Ao compararmos os valores médios de BilT e ALB dos grupos C1, C2, A1 e A2, verificamos que não apresentaram diferença significativa quando comparados com o grupo padrão, e entre si, em cada um dos períodos analisados (Figura 19A e 19B). Esses dados demonstram que tanto a dieta-controle como a dieta-álcool, associadas ou não à injeção de veículo, não causam alterações significativas quando são administradas aos animais, indicando que os ratos sob essas condições não apresentam disfunção hepática.

Realizamos as análises dos valores médios de BilT e ALB entre o grupo C3 e grupo A3, e destes em relação aos valores médios do grupo RP, C2 e A2, a fim de verificar se a intoxicação crônica por CCl_4 foi eficiente (Figura 20). Os resultados demonstraram que houve aumento dos valores médios ($p < 0,01$) de BilT do grupo C3 em relação ao grupo C2 somente após 12 semanas, e o grupo A3 apresentou aumento significativo após 12 semanas em relação aos grupos RP ($p < 0,001$) e A2 ($p < 0,001$) (Figura 20A). Os valores médios de ALB do grupo C3 não apresentaram diferença significativa em relação aos valores médios dos demais grupos, embora tenha apresentado queda dos valores médios após 12 semanas de experimento. Já os valores médios de ALB do grupo A3 apresentaram redução significativa somente após 12 semanas em relação ao grupo RP (Figura 20B).

Esses resultados demonstram que a intoxicação por CCl_4 foi eficiente e causou aumento dos valores médios de BilT e diminuição dos valores médios de ALB, alterações estas relacionadas à disfunção hepática.

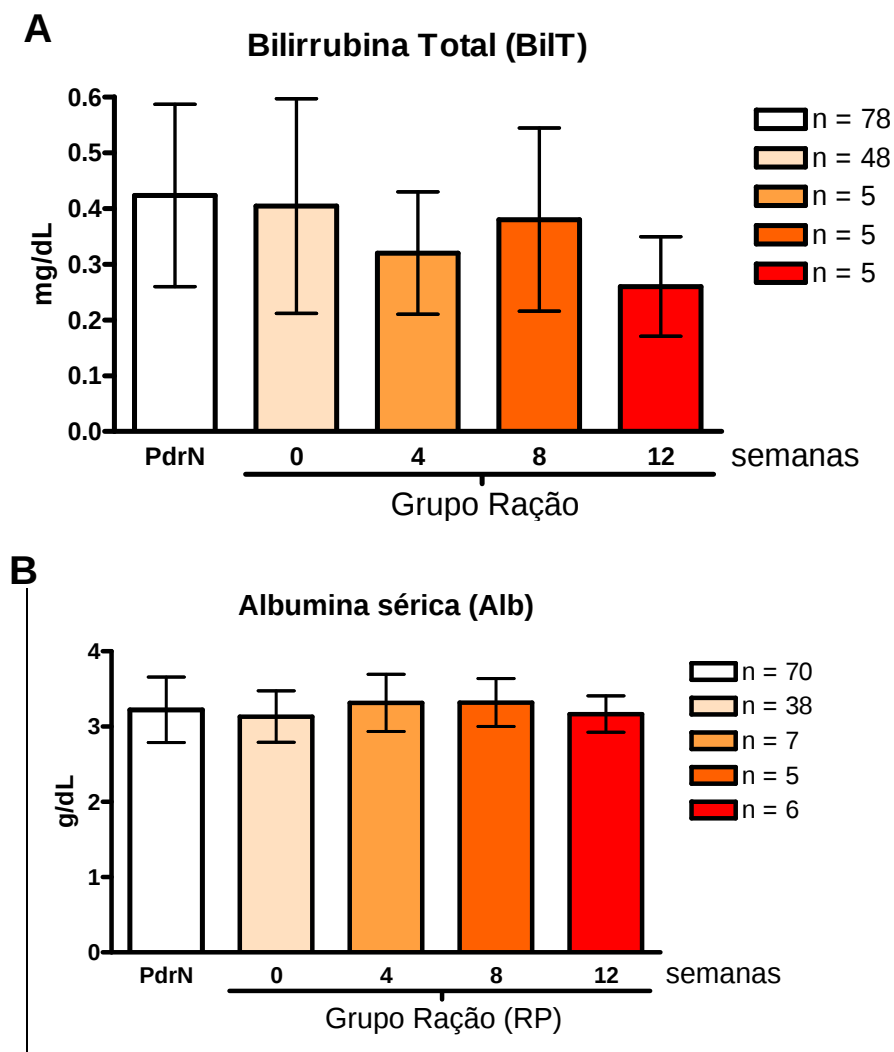


Figura 18 – Níveis séricos de Bilirrubina Total - BiT (A) e Albumina - Alb (B) do grupo RP nos períodos de 0, 4, 8 e 12 semanas de experimento. Os níveis séricos de BiT e Alb do grupo RP não apresentaram alterações significativas ao longo do experimento.

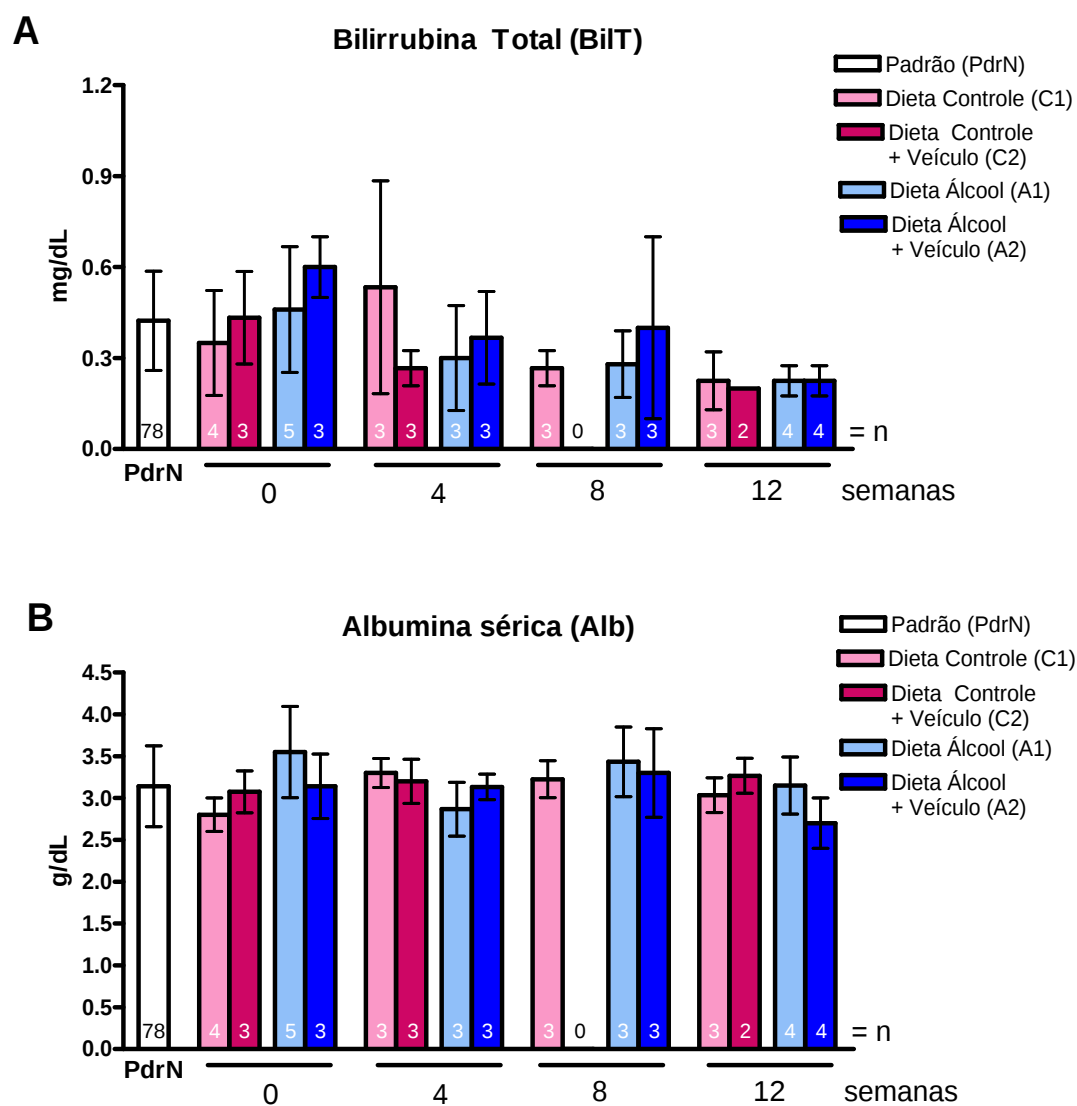
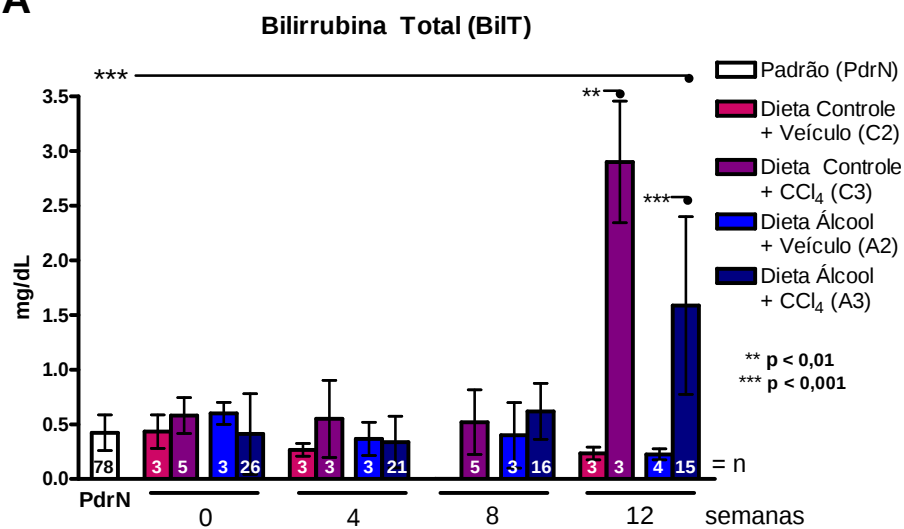
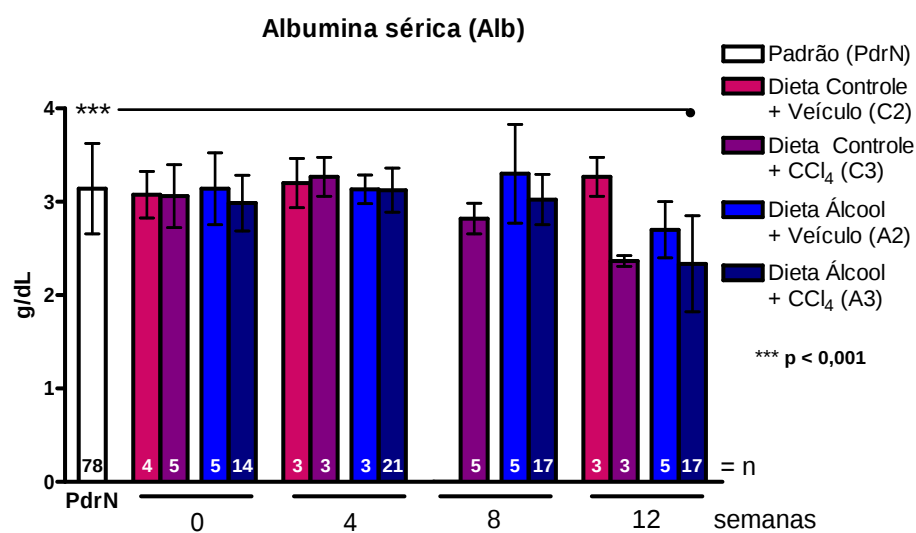


Figura 19 – Níveis séricos Bilirrubina Total - BiT (A) e Albumina - Alb (B) dos grupos C1, C2, A1 e A2. Os níveis séricos de BiT e Alb dos grupos analisados não apresentaram alterações significativas ao longo do experimento.

Figura 20 – Níveis séricos Bilirrubina Total - BilT (A) e Albumina - Alb (B) dos grupos C2, C3, A2 e A3. Em (A), observamos que os níveis séricos de BilT do grupo A3 aumentaram significativamente apenas no período de 12 semanas ($p < 0,001$) de experimento em relação aos valores normais de níveis séricos (PdrN). Também há aumento significativo dos níveis séricos de BilT do grupo C3 em relação ao grupo C2 ($p < 0,01$) e do grupo A3 em relação ao grupo A2 ($p < 0,001$) no período de 12 semanas. Os demais grupos não apresentam alterações. Em (B), observamos que os níveis séricos de Alb do grupo A3 aumentam significativamente apenas no período de 12 semanas ($p < 0,001$) em relação a PdrN. Os demais grupos não apresentam alterações.

A**B**

4.5 – Análise dos Parâmetros Ultra-sonográficos

4.5.1 – Ecogenicidade Hepática

A fim de caracterizar o padrão de ecogenicidade do parênquima hepático, analisamos as imagens de secções transversais do fígado obtidas a partir dos exames de ultra-som em escala de cinza.

A partir das análises das imagens obtidas pelos exames ultra-sonográficos, estabelecemos 4 padrões qualitativos de ecogenicidade hepática: padrão 0 - ecogenicidade normal (Figura 21A), padrão I - ecogenicidade difusamente aumentada (Figura 21B), padrão II - ecogenicidade discretamente grosseira (Figura 21C), e padrão III - ecogenicidade difusamente grosseira (Figura 21D).

O resultado das análises das imagens demonstrou que no início do experimento, os animais de todos os grupos experimentais apresentaram padrão de ecogenicidade normal (Tabela 12.1).

Após 4 semanas de experimento, observamos que 22 entre 42 animais examinados do grupo A3 apresentaram ecogenicidade difusamente aumentada. Os demais animais do grupo A3 e dos outros grupos experimentais se mantiveram com padrão de ecogenicidade normal (Tabela 12.2).

Após 8 semanas de experimento, observamos que 1 entre 4 animais examinados do grupo C3 apresentou ecogenicidade discretamente grosseira, enquanto os demais apresentaram padrão de ecogenicidade normal. No mesmo período, observamos que os 29 animais do grupo A3 apresentaram-se

distribuídos entre os seguintes padrões de ecogenicidade: 9 animais com ecogenicidade acentuadamente grosseira, 9 animais com ecogenicidade discretamente grosseira, 5 animais com ecogenicidade difusamente aumentada, e apenas 6 animais mantiveram-se com ecogenicidade hepática normal. Os animais dos demais grupos apresentaram padrão de ecogenicidade normal (Tabela 12.3).

Após 12 semanas de experimento, observamos que, 1 entre 4 animais examinados do grupo A1, e, 2 entre 5 animais examinados do grupo A2, apresentaram ecogenicidade difusamente aumentada, enquanto os demais se mantiveram com padrão de ecogenicidade normal. Neste mesmo período, podemos observar que todos os 4 animais examinados do grupo C3 apresentaram ecogenicidade discretamente grosseira. Assim como no período anterior, os animais do grupo A3 se apresentaram distribuídos entre os padrões de ecogenicidade. Dos 25 animais examinados, 14 animais apresentaram ecogenicidade difusamente grosseira, 6 animais apresentaram ecogenicidade discretamente grosseira, e apenas 5 animais apresentaram ecogenicidade difusamente aumentada. Os animais dos demais grupos examinados apresentaram padrão de ecogenicidade normal (Tabela 12.4).

Esses resultados demonstram que a administração de dieta padrão e a dieta-controle sem associação com CCl_4 não causam alterações no parênquima hepático, enquanto a dieta-álcool pode causar alterações brandas, evidenciadas somente após 12 semanas de administração. Entretanto, a intoxicação por CCl_4 associada ou não ao consumo de etanol causa alterações

progressivas no parênquima hepático, porém essas alterações são mais proeminentes quando há associação dos agentes hepatotóxicos.

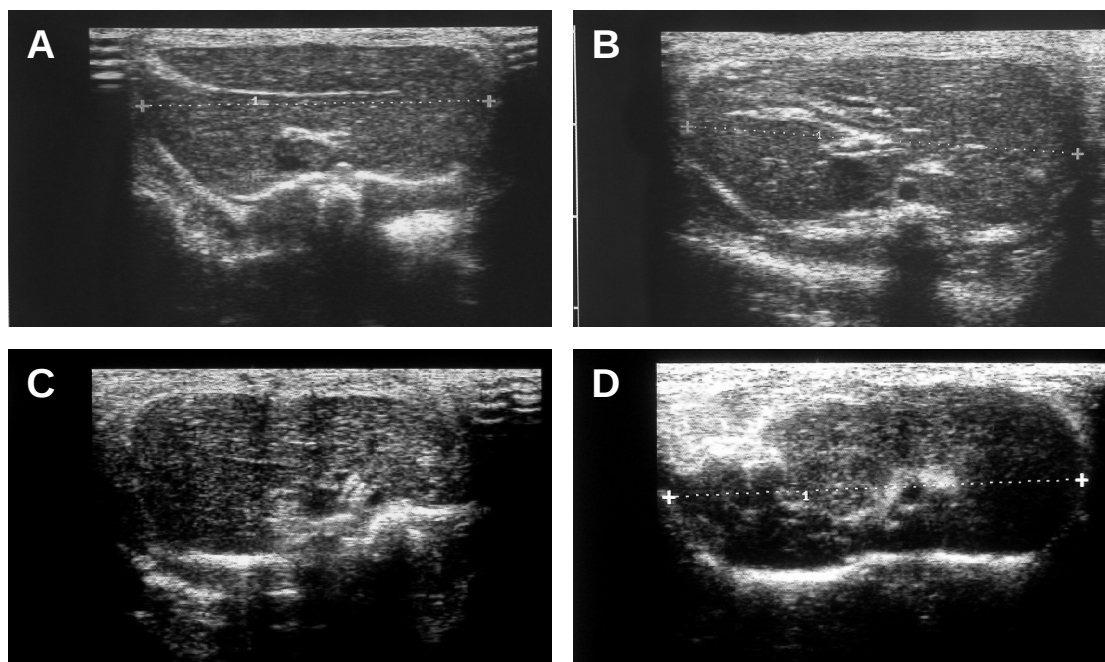


Figura 21 – Imagens de secções representativas dos padrões qualitativos de ecogenicidade hepática dos animais observados ao longo de 12 semanas de indução de lesão crônica hepática (A – D). Note que há um aumento progressivo da intensidade da ecogenicidade do órgão, indicando alterações na composição do parênquima hepático. Os padrões foram definidos como: ecogenicidade normal (A), ecogenicidade difusamente aumentada (B), ecogenicidade discretamente grosseira (C) e ecogenicidade acentuadamente grosseira (D).

Tabela 13.1 – Avaliação ultra-sonográfica qualitativa da ecogenicidade hepática por grupo antes do início da administração de CCl₄ (0 semana).

GRUPO	Padrão de Ecogenicidade hepática				Total
	0	I	II	III	
RP	7	0	0	0	7
C1	4	0	0	0	4
C2	4	0	0	0	4
C3	5	0	0	0	5
A1	5	0	0	0	5
A2	5	0	0	0	5
A3	49	0	0	0	29
Total	79	0	0	0	79

0 – normal; I – difusamente aumentada; II – discretamente grosseira; III – difusamente grosseira.

Tabela 13.2 – Avaliação ultra-sonográfica qualitativa da ecogenicidade hepática por grupo após 4 semanas de administração de CCl₄.

GRUPO	Padrão de Ecogenicidade hepática				Total
	0	I	II	III	
RP	4	0	0	0	4
C1	4	0	0	0	4
C2	4	0	0	0	4
C3	5	0	0	0	5
A1	4	0	0	0	4
A2	5	0	0	0	5
A3	20	22	0	0	42
Total	46	22	0	0	68

0 – normal; I – difusamente aumentada; II – discretamente grosseira; III – difusamente grosseira.

Tabela 13.3 – Avaliação ultra-sonográfica qualitativa da ecogenicidade hepática por grupo após 8 semanas de administração de CCl₄.

GRUPO	Padrão de Ecogenicidade hepática				Total
	0	I	II	III	
RP	4	0	0	0	4
C1	3	0	0	0	3
C2	4	0	0	0	4
C3	3	0	1	0	4
A1	4	0	0	0	4
A2	5	0	0	0	5
A3	6	5	9	9	29
Total	29	5	10	9	53

0 – normal; I – difusamente aumentada; II – discretamente grosseira; III – difusamente grosseira.

Tabela 13.4 – Avaliação ultra-sonográfica qualitativa da ecogenicidade hepática por grupo após 12 semanas de administração de CCl₄.

GRUPO	Padrão de Ecogenicidade hepática				Total
	0	I	II	III	
RP	4	0	0	0	4
C1	3	0	0	0	3
C2	4	0	0	0	4
C3	0	0	4	0	4
A1	3	1	0	0	4
A2	3	2	0	0	5
A3	0	5	6	14	25
Total	18	7	10	14	49

0 – normal; I – difusamente aumentada; II – discretamente grosseira; III – difusamente grosseira.

4.5.2 – Ecogenicidade Hepática versus Ecogenicidade Renal

A fim de caracterizar o padrão de ecogenicidade do parênquima do lóbulo posterior direito do fígado, analisamos as imagens de secções para-mediais do fígado obtidas a partir dos exames de ultra-som em escala de cinza.

Para estabelecer os padrões de ecogenicidade hepática (ecoH), utilizamos como referência o padrão de ecogenicidade normal do rim direito (ecoR). A partir das imagens obtidas, observamos 3 padrões qualitativos de ecoH comparada a ecoR: padrão hipoecogênico ($EcoH < EcoR$) (Figura 22A), padrão isoecogênico ($EcoH = EcoR$) (Figura 22B), e padrão hiperecogênico ($EcoH > EcoR$) (Figura 22C).

O resultado das análises das imagens demonstrou que todos os animais dos grupos experimentais apresentaram padrão hipoecogênico no início do experimento (Tabela 13.1).

Após 4 semanas, apenas 4 entre 19 animais examinados do grupo A3 apresentaram padrão isoecogênico, enquanto os demais animais apresentaram padrão hipoecogênico (Tabela 13.2).

Após 8 semanas, observamos que 2 entre 4 animais examinados do grupo C3 apresentaram padrão isoecogênico, enquanto os demais apresentaram padrão hipoecogênico. Já no grupo A3, dos 10 animais examinados, 4 apresentaram padrão hiperecogênico, 3 apresentaram padrão isogênico, e 3 apresentaram padrão hipoecogênico. Os animais dos demais grupos apresentaram padrão hipoecogênico (Tabela 13.3).

Após 12 semanas, todos os 4 animais do grupo C3 apresentaram padrão isoecogênico. No grupo A2, 2 entre 5 animais examinados apresentaram padrão isoecogênico. No grupo A3, dos 10 animais examinados, 7 apresentaram padrão hiperecogênico, e 3 apresentaram padrão isoecogênico. Os animais dos demais grupos examinados apresentaram padrão hipoecogênico (Tabela 13.4).

Esses resultados demonstram que a administração de dieta padrão e a dieta-controle sem associação com CCl_4 não causam alterações no parênquima hepático. Também demonstrou que a dieta-álcool sem associação com CCl_4 pode causar alterações moderadas no parênquima hepático, embora seja evidenciada apenas após 12 semanas de experimento. A intoxicação por CCl_4 associada ou não ao consumo de etanol causa alterações progressivas no parênquima hepático, porém essas alterações são mais proeminentes quando há associação dos agentes hepatotóxicos.

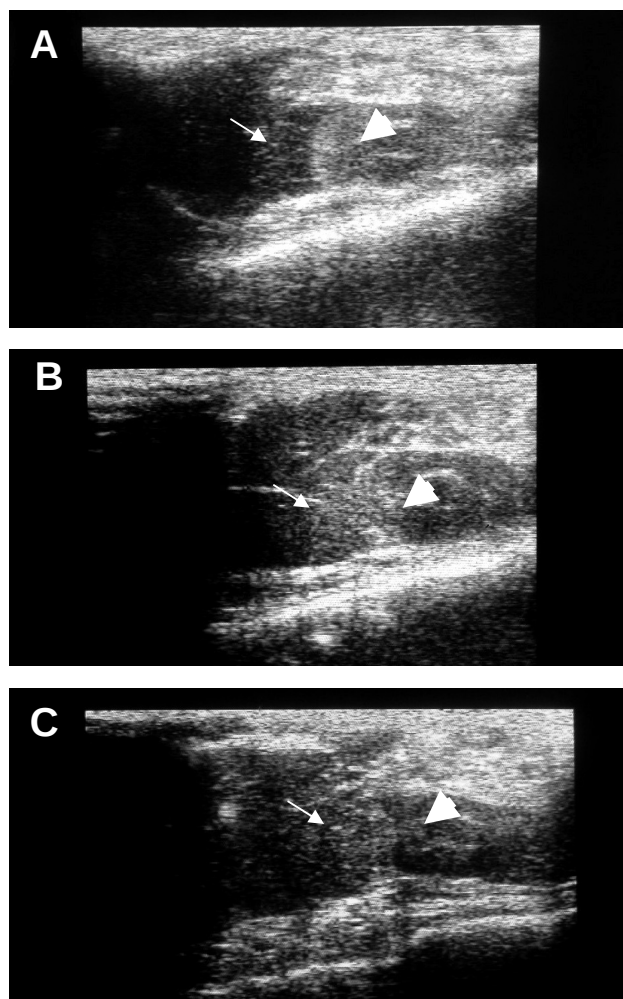


Figura 22 – Imagens de secções representativas dos padrões qualitativos de ecogenicidade hepática (ecoH) em relação a ecogenicidade renal (ecoR) dos animais observados ao longo de 12 semanas de indução de lesão crônica hepática (A – C). O parênquima hepático (seta) foi comparado ao córtex do rim direito (cabeça de seta). Note que há um aumento progressivo da intensidade da ecogenicidade do fígado, indicando alterações na composição do parênquima hepático. Os padrões foram definidos como: ecoH menor que ecoR (A), ecoH igual a ecoR (B), e ecoH maior que ecoR (C).

Tabela 14.1 – Avaliação ultra-sonográfica qualitativa da ecogenicidade hepático (EcoH) em relação a ecogenicidade renal (EcoR) por grupo experimental antes do início da administração de CCl₄.

GRUPO	Ecogenicidade hepática (EcoH)			Total
	< EcoR	= EcoR	> EcoR	
RP	7	0	0	7
C1	4	0	0	4
C2	4	0	0	4
C3	5	0	0	5
A1	5	0	0	5
A2	5	0	0	5
A3	26	0	0	26
Total	56	0	0	56

Tabela 14.2 – Avaliação ultra-sonográfica qualitativa da ecogenicidade hepático (EcoH) em relação a ecogenicidade renal (EcoR) por grupo experimental após 4 semanas da administração de CCl₄.

GRUPO	Ecogenicidade hepática (EcoH)			Total
	< EcoR	= EcoR	> EcoR	
RP	4	0	0	4
C1	4	0	0	4
C2	4	0	0	4
C3	5	0	0	5
A1	4	0	0	4
A2	5	0	0	5
A3	15	4	0	19
Total	41	4	0	45

Tabela 14.3 – Avaliação ultra-sonográfica qualitativa da ecogenicidade hepático em relação a ecogenicidade renal (EcoR) por grupo experimental após 8 semanas da administração de CCl₄.

GRUPO	Ecogenicidade hepática (EcoH)			Total
	< EcoR	= EcoR	> EcoR	
RP	4	0	0	4
C1	3	0	0	3
C2	4	0	0	4
C3	2	2	0	4
A1	4	0	0	4
A2	5	0	0	5
A3	3	3	4	10
Total	25	5	4	34

Tabela 14.4 – Avaliação ultra-sonográfica qualitativa da ecogenicidade hepático (EcoH) em relação a ecogenicidade renal (EcoR) por grupo experimental após 12 semanas da administração de CCl₄.

GRUPO	Ecogenicidade hepática (EcoH)			Total
	< EcoR	= EcoR	> EcoR	
RP	4	0	0	4
C1	3	0	0	3
C2	4	0	0	4
C3	0	4	0	4
A1	4	0	0	4
A2	3	2	0	5
A3	0	3	7	10
Total	18	9	7	34

4.5.3 – Diâmetro Transverso do Fígado

A fim de caracterizar as alterações morfológicas hepáticas relacionadas ao tamanho do órgão, medimos o diâmetro transverso (DT) do fígado através das imagens de secções transversais obtidas pelos exames de ultra-som em escala de cinza.

Podemos observar que ao longo das 12 semanas de experimento, os animais do grupo RP não apresentaram alterações significativas no diâmetro transverso do fígado, indicando que o fígado não sofre alteração morfológicas durante o crescimento dos animais (Figura 23A). O mesmo foi observado quando analisamos os diâmetros transversos dos grupos que receberam dieta-controle sem associação com o CCl_4 , indicando que o consumo de dieta-controle não causa alterações morfológicas nos animais (Figura 23B).

Ao compararmos os grupos A1 e A2, observamos que não há alterações significativas dos diâmetros transversos dos fígados ao longo do experimento (Figura 24A). Observamos o mesmo perfil acima ao compararmos os grupos C1 e A1 (Figura 24B) e os grupos C2 e A2 (Figura 24C), indicando que o consumo de dieta-álcool não causa alterações morfológicas nos animais.

Ao compararmos os grupos C2 e C3, observamos que não há alterações significativas dos diâmetros transversos dos fígados ao longo do experimento (Figura 25A). Observamos o mesmo perfil acima ao compararmos os grupos A2 e A3 (Figura 25B), indicando que a intoxicação por CCl_4 não causa alterações morfológicas no fígado dos animais.

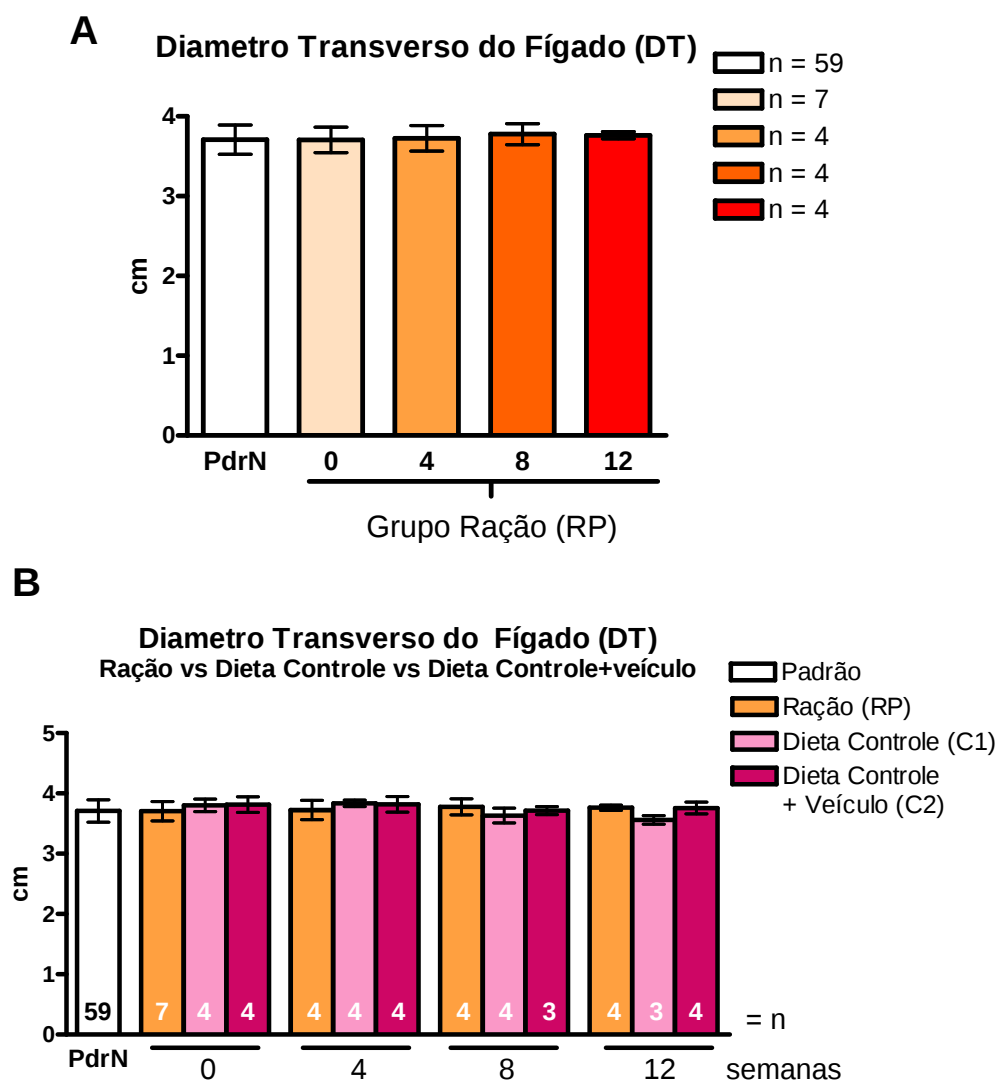


Figura 23 – Valores médios do diâmetro transverso do fígado dos animais do grupo RP (A) do grupo RP, C1 e C2 (B) nos períodos de 0, 4, 8 e 12 semanas de experimento. Os animais de todos os grupos analisados não apresentam alterações no diâmetro transverso do fígado ao longo do experimento.

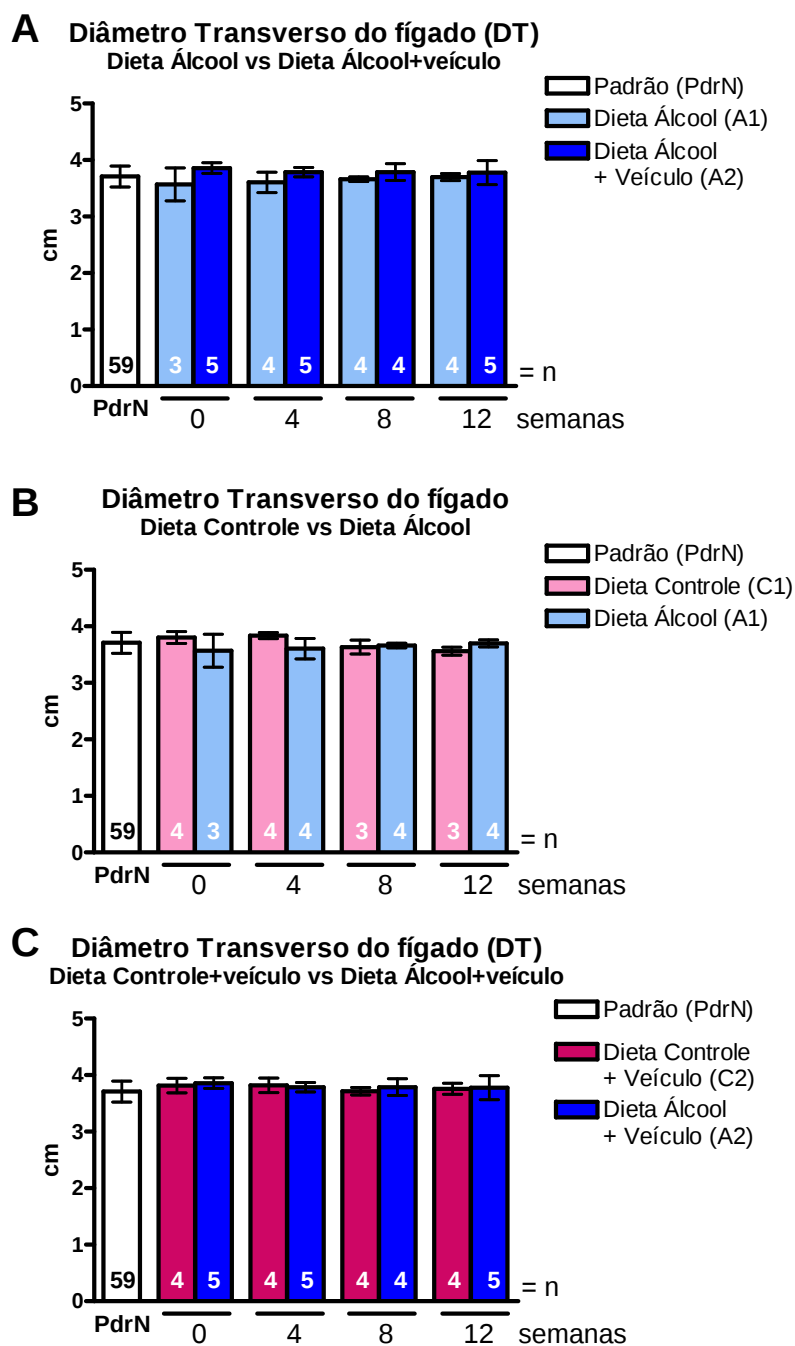


Figura 24 – Valores médios do diâmetro transverso do fígado dos animais do grupo A1 e A2 (A) do grupo C1 e A1 (B), e do grupo C2 e A2, nos períodos de 0, 4, 8 e 12 semanas de experimento. Os animais de todos os grupos analisados não apresentam alterações no diâmetro transverso do fígado ao longo do experimento.

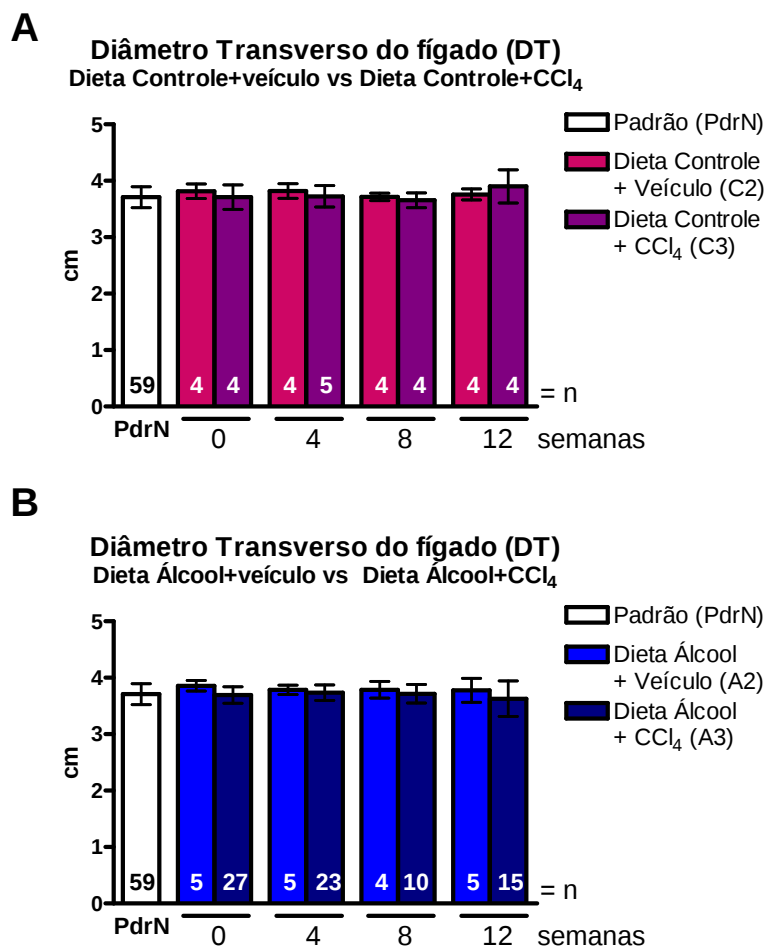


Figura 25 – Valores médios do diâmetro transverso do fígado dos animais do grupo C2 e C3 (A) e do grupo A2 e A3 (B) nos períodos de 0, 4, 8 e 12 semanas de experimento. Os animais de todos os grupos analisados não apresentam alterações no diâmetro transverso do fígado ao longo do experimento.

4.5.4 – Calibre e Tortuosidade da Veia Porta

A fim de avaliar possíveis alterações nas características estruturais da veia porta, analisamos o diâmetro e a tortuosidade da veia porta a partir de imagens obtidas pelos exames de ultra-som em escala de cinza.

Podemos observar que ao longo das 12 semanas de experimento, os animais do grupo RP não apresentaram alterações significativas no diâmetro da veia porta, indicando que a veia porta não sofre alteração de sua estrutura durante o período do experimento (Figura 26A). O mesmo foi observado quando analisamos os diâmetros dos grupos que receberam dieta-controle sem associação com o CCl₄, indicando que o consumo de dieta-controle não causa alterações estruturais da veia porta (Figura 26B).

Ao compararmos os grupos C1 e A1, observamos que não há alterações significativas dos diâmetros da veia porta ao longo do experimento (Figura 27A). Observamos o mesmo perfil acima ao compararmos os grupos A1 e A2 (Figura 27B) e os grupos C2 e A2 (Figura 27C), indicando que o consumo de dieta-álcool não modifica os parâmetros analisados.

Ao analisarmos o grupo C3, observamos que houve aumento do diâmetro da veia porta, porém sem apresentar diferença significativa (Figura 28A). O grupo A3 apresentou aumento progressivo do diâmetro da veia porta nos períodos de 4 semanas ($0,20 \pm 0,04$; $p < 0,05$), 8 semanas ($0,24 \pm 0,04$; $p < 0,001$) e 12 semanas ($0,23 \pm 0,03$; $p < 0,001$), em relação ao grupo RP ($0,16 \pm 0,02$), além de apresentar diferenças significativas nos períodos de 8

semanas ($p<0,01$) e 12 semanas ($p<0,001$) em relação ao grupo A2 ($0,15\pm0,01$) (Figura 28B).

Esse resultado demonstra que a intoxicação por CCl_4 associada ao consumo de etanol causa alterações estruturais da veia porta relacionadas à hipertensão portal a partir de 4 semanas de administração das substâncias hepatotóxicas, enquanto a intoxicação somente por CCl_4 pode causar alterações, porém somente evidenciadas após 12 semanas de intoxicação.

As análises da tortuosidade da veia porta nos permitiram estabelecer 2 padrões estruturais: veia porta não-tortuosa (Figura 29A e 29B), e veia porta tortuosa (Figura 29C).

O resultado das análises demonstrou que todos os animais dos grupos examinados apresentaram veia porta não-tortuosa no início do experimento (Tabela 14.1). Após 4 semanas, os animais não modificam os parâmetros estruturais da veia porta, analisados, em relação ao período anterior (Tabela 14.2).

Somente após 8 semanas, observamos 5 entre 10 animais examinados do grupo A3 apresentaram tortuosidade da veia porta, enquanto os demais animais do grupo A3 e dos demais grupos mantiveram-se com padrão morfológico normal (Tabela 14.3). Após 12 semanas, observamos que 1 entre 4 animais examinados do grupo C3 apresentou tortuosidade da veia porta. Já no grupo A3, observamos que 6 entre 10 animais examinados do grupo A3 apresentaram tortuosidade da veia porta. Os demais animais apresentaram padrão estrutural normal (Tabela 14.4).

Esses resultados demonstram que a dieta-controle e a dieta-álcool não causam alterações na veia porta, enquanto a intoxicação por CCl_4 pode estar associada a alterações nas características estruturais da veia porta relacionadas à hipertensão portal.

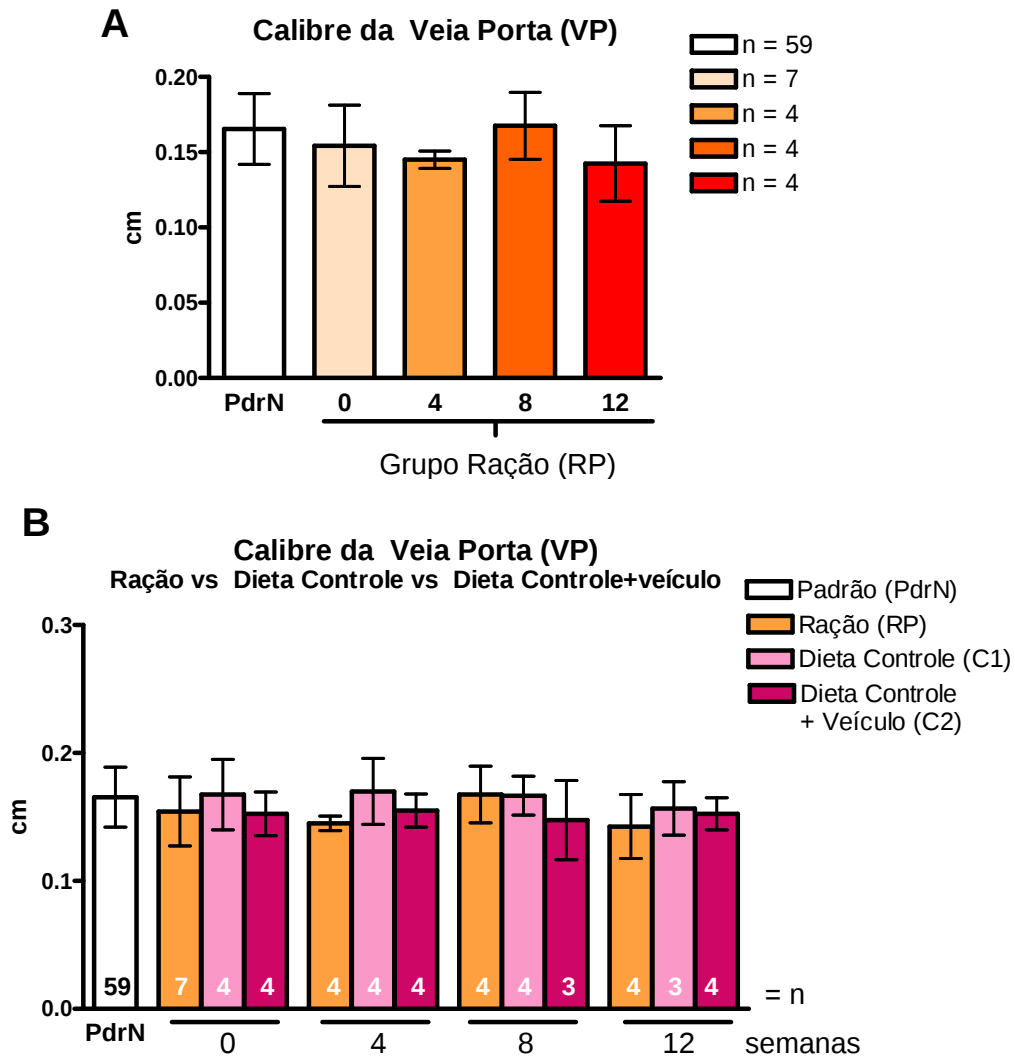


Figura 26 – Valores médios do calibre da veia porta dos animais do grupo RP (A) do grupo RP, C1 e C2 (B) nos períodos de 0, 4, 8 e 12 semanas de experimento. Os animais de todos os grupos analisados não apresentam alterações no calibre da veia porta ao longo do experimento.

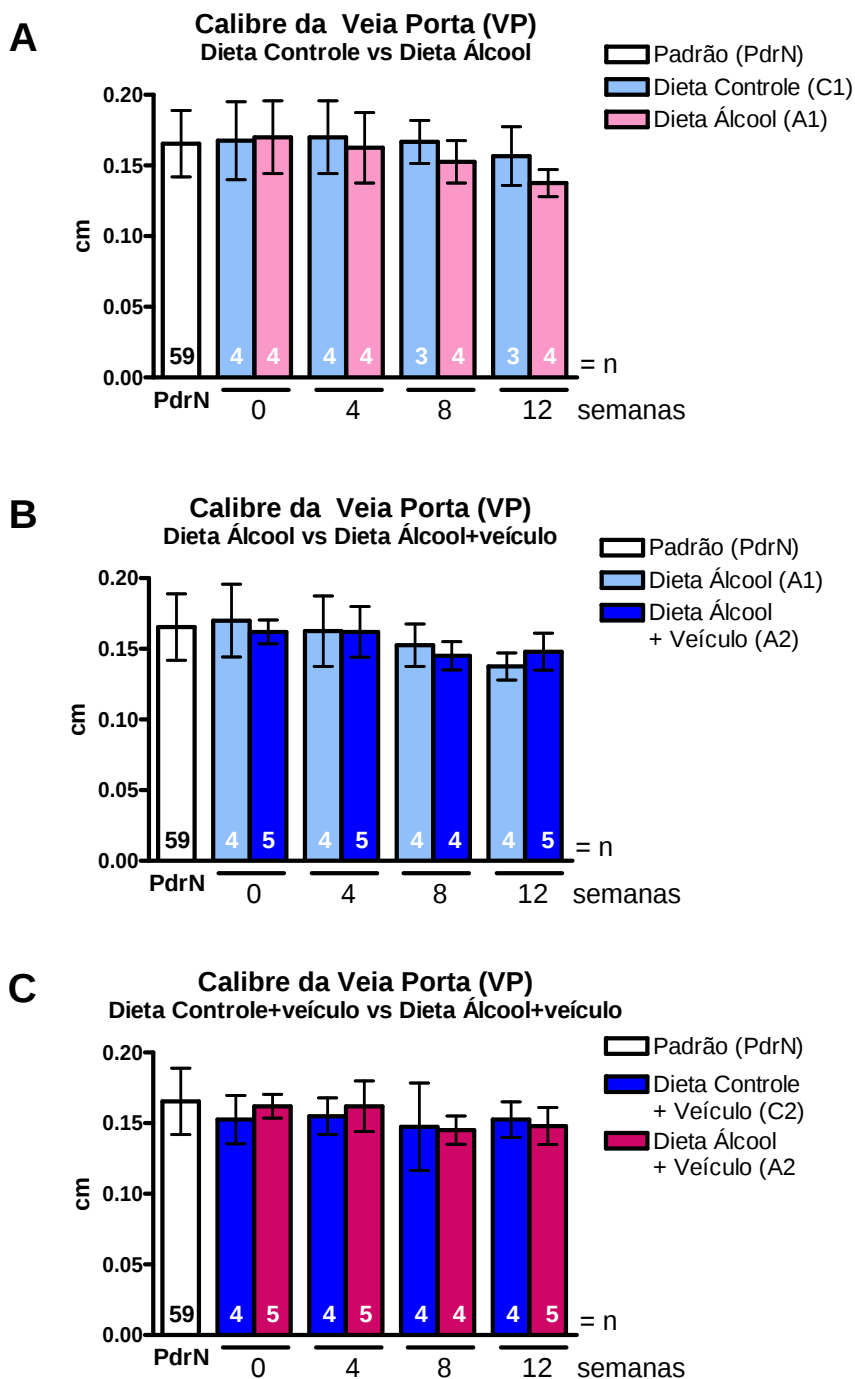


Figura 27 – Valores médios do calibre da veia porta dos animais do grupo A1 e A2 (A) do grupo C1 e A1 (B), e do grupo C2 e A2, nos períodos de 0, 4, 8 e 12 semanas de experimento. Os animais de todos os grupos analisados não apresentam alterações no calibre da veia porta ao longo do experimento.

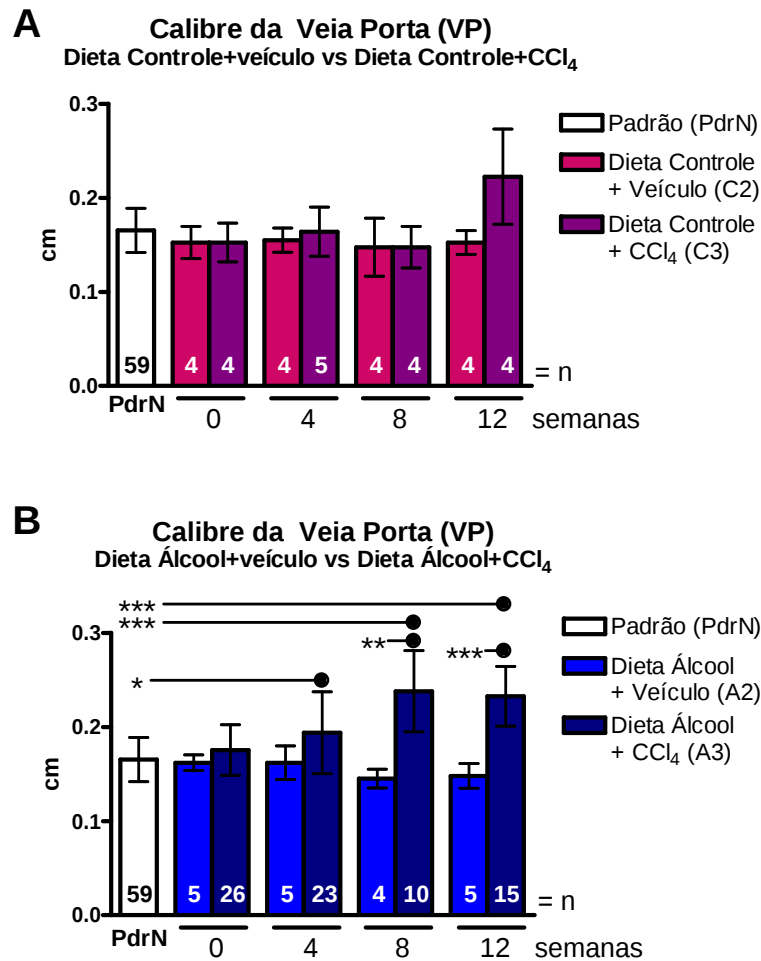


Figura 28 – Valores médios do calibre da veia porta dos animais do grupo C2 e C3 (A) e do grupo A2 e A3 (B) nos períodos de 0, 4, 8 e 12 semanas de experimento. Em (A), observamos aumento do calibre da veia porta no grupo C3 após 12 semanas, porém não significativo. Em (B) observamos que o calibre da veia porta do grupo A3 aumenta significativamente após 4 semanas ($p<0,05$) em relação aos valores normais (PdrN). Houve aumento ainda maior nos períodos de 8 semanas ($p<0,001$) e 12 semanas ($p<0,001$) e relação ao grupo PdrN. Nos mesmos períodos, o calibre da veia porta demonstrou diferença significativa entre o grupo A2 e grupo A3 (8semanas, $p<0,01$; 12 semanas, $p<0,001$). O grupo A2 não apresentou alteração do calibre da veia porta em relação ao grupo PdrN.

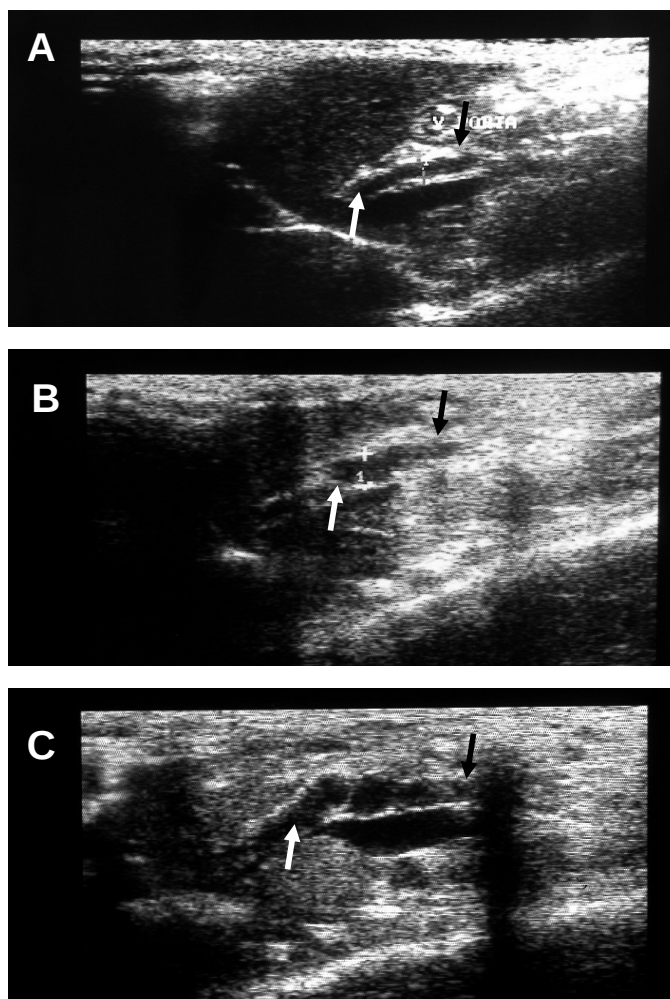


Figura 29 – Imagens de secções representativas dos padrões de calibre da veia porta dos animais observados ao longo de 12 semanas de indução de lesão crônica hepática (A – C). As setas indicam a localização da veia porta. Em (A), observamos uma veia porta normal, com baixo calibre e retilínea. Em (B), observamos um discreto aumento no calibre da veia porta. Em (C), podemos observar o aumento pronunciado do calibre da veia porta além de ondulações nas paredes do vaso, indicando tortuosidade.

Tabela 15.1 – Avaliação ultra-sonográfica qualitativa da tortuosidade da veia porta por grupo experimental antes do início da administração de CCl₄ (0 semana).

GRUPO	Veia Porta		Total
	não tortuosa	tortuosa	
RP	7	0	7
C1	4	0	4
C2	4	0	4
C3	5	0	5
A1	5	0	5
A2	5	0	5
A3	26	0	26
Total	59	0	56

Tabela 15.2 – Avaliação ultra-sonográfica qualitativa da tortuosidade da veia porta por grupo experimental após 4 semanas da administração de CCl₄.

GRUPO	Veia Porta		Total
	não tortuosa	tortuosa	
RP	4	0	4
C1	4	0	4
C2	4	0	4
C3	5	0	5
A1	4	0	4
A2	5	0	5
A3	19	0	19
Total	49	0	45

Tabela 15.3 – Avaliação ultra-sonográfica qualitativa da tortuosidade da veia porta por grupo experimental após 8 semanas da administração de CCl_4 .

GRUPO	Veia Porta		Total
	não tortuosa	tortuosa	
RP	4	0	4
C1	3	0	3
C2	4	0	4
C3	4	0	4
A1	4	0	4
A2	5	0	5
A3	5	5	10
Total	28	5	34

Tabela 15.4 – Avaliação ultra-sonográfica qualitativa da tortuosidade da veia porta por grupo experimental após 12 semanas da administração de CCl_4 .

GRUPO	Veia Porta		Total
	não tortuosa	tortuosa	
RP	4	0	4
C1	3	0	3
C2	4	0	4
C3	3	1	4
A1	4	0	4
A2	5	0	5
A3	4	6	10
Total	27	7	34

4.5.5 – Presença de Ascite

A fim de avaliar a presença de ascite nos animais, realizamos exames através das imagens de secções transversais obtidas pelos exames de ultrassom em escala de cinza.

Dois padrões de ascite foram observados: ascite discreta (Figura 30A) e ascite moderada (Figura 30B). Em nossos resultados apenas 3 animais apresentaram ascite, sendo 1 do grupo C3 após 12 semanas de experimento apenas com ascite discreta, e 2 animais do grupo A3, 1 destes apresentando ascite discreta já com 8 semanas de experimento, e ascite moderada após 12 semanas, e outro apresentou ascite moderada somente após 12 semanas.

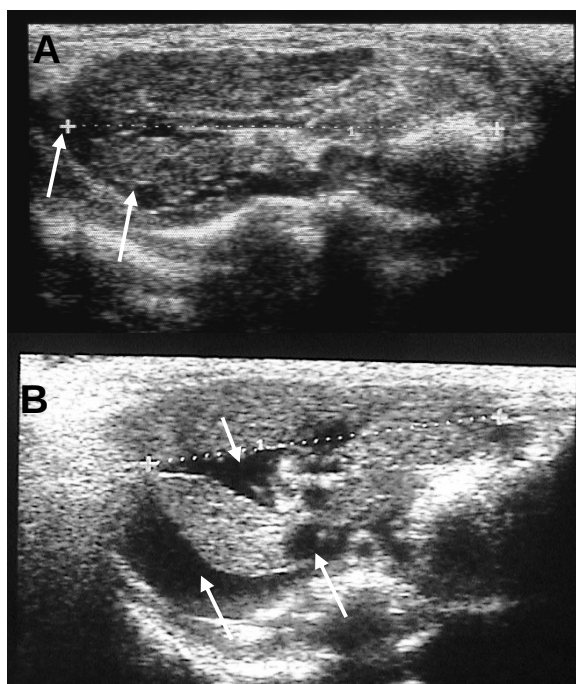


Figura 30 – Imagens de secções representativas dos padrões de ascite: discreta (A) e moderada (B). As setas indicam a presença do líquido ascítico.

4.5.6 – Estadiamento do fígado por Ultra-som

A fim de classificar o grau de severidade da lesão hepática dos animais através dos exames de ultra-som, desenvolvemos um sistema de pontuação para cada parâmetro analisado. O sistema está descrito no item 3.6.2 da seção Materiais e Métodos.

Nossos resultados demonstraram que a maioria dos animais não apresentava alterações nos parâmetros ultra-sonográficos analisados ao início do experimento (Tabela 15.1). Após 4 semanas, aproximadamente metade dos animais do grupo A3 apresentou grau entre 2 e 3 pontos, indicando que estes animais sofreram alterações em alguns dos parâmetros ultra-sonográficos. Observamos que estas alterações estavam relacionadas ao leve aumento da ecogenicidade hepática e ecogenicidade hepática (ecoH) em relação a ecogenicidade renal (ecoR). Os demais animais mantiveram-se entre o grau 0 e 1.

Após 8 semanas, dentre os 10 animais analisados, 3 animais apresentaram grau 7, e 2 animais apresentaram grau 6, já demonstrando alterações mais severas relacionadas a aumento de ecogenicidade hepática, da ecoH vs EcoR, do calibre e tortuosidade da veia porta; 1 animal apresentou grau 5, e 2 animais apresentaram grau 4, relacionadas alterações moderadas na ecogenicidade hepática, ecoH vs EcoR e calibre da veia porta. Apenas 1 animal do grupo C3 apresentou grau 3, relacionada a aumento da

ecogenicidade hepática e ecoH vs EcoR. Os demais animais não sofreram alterações.

Após 12 semanas, dentre os 10 animais analisados do grupo A3, 2 animais atingiram a pontuação máxima, relacionada a alterações severas em todos os parâmetros avaliados (ecogenicidade, ecoH vs ecoR, calibre e tortuosidade da veia porta e ascite); 3 animais apresentaram grau 7, e 3 apresentaram grau 6, relacionados aos parâmetros descritos anteriormente; 1 animal apresentou grau 5, e 1 animal apresentou grau 4. Os animais do grupo C3 também apresentaram alterações, sendo 1 animal com grau 6 e os demais com grau 4. O restante dos animais se mantiveram entre grau 0 e 1.

Estes resultados demonstram que a avaliação destes parâmetros ultrasonográficos possibilita o diagnóstico indireto de alterações no fígado examinado e permite determinar a severidade das alterações do mesmo.

Tabela 16.3 – Estadiamento dos fígados através de exame de ultra-som após 8 semanas de experimento.

GRUPO	Pontuação Final										Total
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
RP	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
C1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
C2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
C3	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	4
A1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4
A2	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
A3	0	2	0	0	2	1	2	3	0	0	10
Total	21	4	0	1	2	1	2	3	0	0	34

Tabela 16.4 – Estadiamento dos fígados através de exame de ultra-som após 12 semanas de experimento.

GRUPO	Pontuação Final										Total
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
RP	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
C1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
C2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
C3	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0	4
A1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4
A2	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	5
A3	0	0	0	0	1	1	3	3	0	2	10
Total	17	1	2	0	4	1	4	3	0	2	34

5 – Discussão

Modelos animais para indução de lesão hepática crônica são ferramentas importantes para o estudo da fisiopatologia e dos tratamentos associados a essa doença. Para tal, é fundamental que o modelo seja capaz de reproduzir os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da lesão hepática crônica.

Em nossos estudos, substituímos alguns dos ingredientes da fórmula estabelecida por LIEBER & DeCARLI (1989) por componentes equivalentes (ex. caseína por albumina). Verificamos se essas alterações iriam causar alguma alteração no consumo da dieta, e conseqüentemente, no peso dos animais.

HALL *et al.* (1991) demonstram que o consumo de dieta líquida controle permite o crescimento normal dos animais enquanto a dieta líquida alcoólica reduz o ganho de peso dos animais. Nossos resultados corroboram com os achados de HALL *et al.* (1991). Conforme descrito na Tabela 7, os animais dos grupos C1 e C2 apresentaram ganho ponderal significativo após 12 semanas de experimento. Isso indica que a dieta líquida controle é nutricionalmente adequada. Isto não ocorreu com os animais dos grupos A1 e A2, porém estes mantiveram seus pesos médios com pouca variação durante o experimento. Este fato está relacionado ao consumo da dieta pelos animais. Conforme podemos observar na Figura 10 e Tabela 8, houve menor consumo de dieta líquida alcoólica em relação ao consumo de dieta líquida controle, pois a dieta líquida alcoólica ser hipercalórica, ou seja, a dieta contém calorias em excesso,

devido ao incremento calórico proporcionado pelo etanol. Ao estimar o consumo calórico dos animais (Tabela 9), observamos que ambos grupos (controle e álcool) consumiram quantidades próximas de calorias. Portanto, a redução no consumo de dieta líquida alcoólica não prejudicou a quantidade de calorias ingerida e necessária para manutenção energética dos animais. Todavia, com a redução do consumo de dieta líquida alcoólica, houve queda na ingestão adequada de nutrientes de potencial calórico como proteínas, lipídeos e carboidratos, o que pode explicar a manutenção ponderal dos animais que consumiram dieta alcoólica. A queda do consumo de dieta líquida alcoólica pode ter relação com a aversão natural dos ratos pelo etanol (LIEBER & DeCARLI, 1963; TSUKAMOTO, 1998). Este fato pode ser superado pela necessidade de alimentação do animal, já que a dieta é a única fonte alimentícia disponível. Outro fator é o efeito do consumo crônico de etanol sobre a metabolização de macro e micronutrientes essenciais para o organismo (para revisão, HALSTED, 2004). Este fator também pode ter contribuído para a queda de peso um pouco mais pronunciada nos animais do grupo A3 em relação ao grupo C3, embora essa diferença não seja significativa. A hepatopatia crônica reduz o apetite e pode interferir na absorção dos alimentos (para revisão, HALSTED, 2004).

Para obter resultados satisfatórios quanto à indução de cirrose hepática pela associação de CCl_4 e etanol, é necessário garantir que a ingestão diária de etanol seja acima de 8g/kg de peso corporal por dia (PLUMMER *et al.*, 1994). Em nossos estudos, embora o consumo de dieta líquida alcoólica tenha sido baixo, a ingestão média diária de etanol foi acima dos valores

estabelecidos por LIEBER & DeCARLI (1989), HALL *et al.* (1991) e PLUMMER *et al.* (1994), mesmo apresentando alta variabilidade (entre 8g e 29g/kg de peso corporal por dia - Tabela 10), indicando que a ingestão diária de etanol de nossos animais foi adequada.

HALL *et al.* (1991) utilizaram a intoxicação de CCl₄ por inalação. Decidimos modificar a via de administração de CCl₄ para injeções i.p. de CCl₄ em dias alternados, por ser um método mais simples e de menor custo. Devido a isso, foi necessário estabelecer a dose de CCl₄ equivalente à utilizada no modelo-base. HALL *et al.* (1991) demonstraram que os animais tratados somente com uma dose média diária de vapor de CCl₄ de 480ppm/h apresentaram alterações histopatológicas como esteatose, necrose hepatocelular e apoptose, porém sem desenvolver fibrose. SANZGIRI *et al.* (1997) demonstraram que a exposição de 1000ppm de CCl₄ por 2 horas equivale a uma absorção total de 179mg ou 1,1mL de CCl₄/kg de peso corporal. Neste mesmo estudo, também demonstraram que a concentração máxima de CCl₄ é três vezes maior no fígado após a administração oral em bolo quando comparada à inalação, ou seja, uma quantidade maior de CCl₄ é absorvida pelo sistema gastrointestinal, permitindo maior ação do CCl₄ e resultando em uma lesão hepática maior. Em nossos ensaios preliminares, utilizamos a dose de 1,0mL de CCl₄/kg de peso corporal associada à ingestão de etanol e observamos a mortalidade de aproximadamente 90% dos animais. Sendo assim, decidimos reduzir a dose administrada, baseados também nos achados de RAO *et al.* (1997), que demonstraram que a administração de dose única de 0,1mL/kg resultou em mínimas alterações no tecido hepático.

Utilizamos uma dose ainda menor (0,05mL/kg de peso corporal), a fim de estabelecer uma correlação com os achados de HALL *et al.* (1991).

Em nossos estudos, observamos que, com a dose de 0,05mL/kg de peso corporal, a taxa de sobrevivência dos animais do grupo C3 foi de 100% e do grupo A3 71%, após 12 semanas de experimento. Podemos sugerir que a redução da taxa de sobrevivência no grupo A3 em relação ao observado por HALL *et al.* (1991) tenha ocorrido devido à nutrição inadequada, associada ao aumento da hepatotoxicidade do CCl₄ pelo etanol. Além disso, a susceptibilidade dos ratos Wistar fêmeas ao etanol é maior que em ratos machos (NANJI *et al.*, 2001; KONO *et al.*, 2001; TADIC *et al.*, 2002), o que pode ter contribuído tanto para a indução das alterações fisiopatológicas como para o aumento da mortalidade.

Ao analisarmos os parâmetros histopatológicos dos animais dos grupos C3 e A3, observamos que estes apresentaram alterações semelhantes, apresentando septos fibrosos separando grupos de hepatócitos com distorção da arquitetura do fígado ao final de 12 semanas (Figura 12A, 12D, 13E, 13 F e 14E, 14F, 14G e 14H). Ou seja, mesmo utilizando uma dose baixa de CCl₄ sem a potencialização pelo etanol, foi possível induzir lesões hepáticas mais severas em relação aos achados descritos por HALL *et al.* (1991), que estão relacionados à cirrose hepática. Sugere-se que isso ocorreu devido à via de administração utilizada (i.p.), que possibilitou uma eficiente absorção do CCl₄ pelo trato intestinal, direcionando o agente hepatotóxico diretamente para o fígado através da circulação esplâncnica.

Muito embora o grupo C3 tenha apresentado alterações importantes, foi possível evidenciar que os septos fibrosos que envolviam os nódulos de regeneração eram menos densos que os septos fibrosos circundando os nódulos de regeneração observados nos fígados dos animais do grupo A3.

Este aumento de deposição de colágeno presente no grupo A3 em relação ao grupo C3 pode ser justificado pela associação de CCl₄ e etanol. A deposição de colágeno está diretamente relacionada à ativação das HSC, que por sua vez é regulada pelos metabólitos resultantes da lesão e necrose hepatocelular (ROJKIND & GREENWELL, 2001).

Portanto, se sugere que o efeito hepatotóxico do consumo crônico de etanol (perda da fluidez das membranas de organelas; RUBIN & ROTTENBERG, 1982) juntamente com o aumento de síntese de enzimas do MEOS (CASTILHO *et al.* 1992) induzam o hepatócito a um estado vulnerável a outros tipos de agressões, como a lipoperoxidação provocada pelos radicais livres resultantes da biotransformação do CCl₄, aumentando a susceptibilidade de hepatócitos a lesões irreversíveis, que resultam em uma maior quantidade de áreas de necrose hepatocelular.

Entretanto, as análises dos parâmetros bioquímicos e ultra-sonográficos demonstraram algumas diferenças entre os animais dos grupos C3 e A3.

As análises de bioquímica clínica são testes importantes que permitem estimar o grau da lesão e disfunção hepatocitária (SHERLOCK & DOOLEY, 2002). Para estabelecer um perfil bioquímico relacionado à cirrose hepática nos animais, seria ideal realizar o maior número de testes bioquímicos possível, porém alguns parâmetros foram selecionados em virtude da pequena volemia

dos animais. A escolha dos parâmetros bioquímicos (AST, ALT, BilT e Alb) foi baseada na sua relação com doenças hepáticas crônicas, principalmente a cirrose hepática (CAREY, 2002). Em nosso estudo, estabelecemos os valores normais dos parâmetros analisados e observamos que os valores obtidos se encontraram semelhantes aos relatados em outros estudos que avaliaram testes bioquímicos dos animais (FIGUERAS *et al.*, 1996; DIAZ-GIL *et al.*, 1999; KUS *et al.*, 2004; LUO *et al.*, 2004). Esses estudos também demonstraram que, quando há lesão hepática crônica, os níveis séricos de AST, ALT e BilT aumentam, e há a diminuição dos níveis séricos de Alb.

Observamos esse mesmo perfil no grupo A3, indicando que esses animais sofreram lesões hepatocelulares com morte celular e com comprometimento das funções de excreção e síntese protéica do fígado. Esses achados poderiam confirmar a potencialização da hepatotoxicidade do CCl₄ pelo etanol, porém não se pode deixar de notar que, embora somente o grupo A3 tenha apresentado alterações significativas nos parâmetros bioquímicos, o grupo C3 aponta um leve incremento dos níveis séricos de AST, ALT, BilT, e queda dos níveis séricos de Alb, não significativos, sendo que os valores médios desses parâmetros se apresentaram próximos aos do grupo A3.

Por ser um método não-invasivo, realizamos o acompanhamento ultrassonográfico dos animais ao longo do período experimental, para avaliar a progressão da lesão hepática crônica nos animais. Esse método de diagnóstico é amplamente utilizado para visualizar alterações morfológicas em doenças hepáticas difusas, contribuindo para o diagnóstico clínico e procedimento terapêutico (MURAKAMI *et al.*, 2001). A escolha dos parâmetros foi baseada

nos exames em humanos relacionados ao diagnóstico clínico de cirrose hepática (NICOLAU et al., 2002).

Diversos estudos demonstram que o aumento do conteúdo lipídico e a sua distribuição no parênquima hepático têm maior influência nas alterações dos parâmetros físicos e textura da imagem dos exames de ultra-som em escala de cinza que o aumento do conteúdo de colágeno (TAYLOR *et al.* 1986; LAYER *et al.*, 1991; SUZUKI *et al.*, 1992; LEE et al, 2005), aumentando a ecogenicidade do parênquima.

Em nossos estudos, observamos a textura do parênquima hepático em tempo real e analisamos a ecogenicidade do fígado e sua relação com a ecogenicidade renal. Portanto, estabelecemos padrões qualitativos da ecogenicidade hepática relacionados ao aumento progressivo de sua textura e do brilho das imagens dos fígados analisados. Nossas análises demonstraram que apenas os grupos tratados com CCl₄ sem ou com associação com etanol (grupos C3 e A3) apresentaram alterações nesses parâmetros ao longo do experimento (Tabelas 13.1 – 13.4 e 14.1 – 14.4). Pudemos observar também que a progressão para os padrões de maior gravidade foi maior no grupo A3 que no grupo C3. Sugerimos que essa progressão acelerada pode estar associada à potencialização do CCl₄ pelo etanol, juntamente com a ação hepatotóxica do próprio etanol, que leva ao aumento de acúmulo de gordura, conforme foi observado nos achados histopatológicos, principalmente na fase inicial da indução de lesão hepática crônica (Figura 14A). O aumento difuso da ecogenicidade do parênquima hepático foi secundário à esteatose enquanto o padrão grosseiro foi causado pelo aumento do conteúdo de colágeno.

Cerca de 56% dos animais do grupo A3 apresentaram alterações graves na ecogenicidade hepática ao final de 8 semanas, alcançando o índice de 70% dos animais desse mesmo grupo com alterações graves ao final de 12 semanas de experimento. Os demais animais desse grupo apresentaram alterações moderadas ou mínimas. Sugerimos que a heterogeneidade dos achados tenha relação com a susceptibilidade individual dos animais à associação de CCl_4 e etanol. Também pode ter sido influenciado pela quantidade de etanol ingerido ao longo do experimento, ou seja, os animais que ingeriram menor quantidade de etanol apresentaram menores alterações nesses parâmetros.

Os animais do grupo C3 apresentaram maior homogeneidade ao final de 12 semanas, porém, não atingiram os padrões máximos nos parâmetros de ecogenicidade hepática. Esses achados sugerem que o CCl_4 pode ter induzido alterações menos evidentes relacionadas ao aumento de conteúdo lipídico, embora tenhamos observado acúmulo de gordura nos achados histopatológicos.

Uma das mais importantes complicações associadas à cirrose hepática é a hipertensão portal. Na cirrose hepática, a hipertensão portal ocorre quando há o aumento da resistência ao fluxo sanguíneo da veia porta. Essa resistência está relacionada principalmente as alterações na arquitetura normal do tecido hepático (SHERLOCK & DOOLEY, 2002). Outros fatores podem contribuir para a hipertensão portal tais como: a capilarização dos sinusóides (BATHAL & GROSSMAN, 1985), a tumefação de hepatócitos (BLENDIS *et al.*, 1982), e a esclerose das veias centrais (GOODMAN & ISHAK, 1982).

Para diagnosticar a hipertensão portal, os exames ultra-sonográficos procuram avaliar se os diâmetros da veia porta, veia mesentérica superior e veia esplênica estão aumentados, se há alteração do calibre destas mesmas veias na respiração (ZOLI *et al.*, 1990;), além de avaliar o fluxo da veia porta (GAIANI *et al.*, 1991) e “shunts” porto-sistêmicos por exame de ultra-som com Doppler (KUDO *et al.*, 1993). Devido ao tamanho do órgão dos animais, nossos estudos ficaram limitados à análise das alterações estruturais da veia porta, devido à dificuldade de localizar e observar com precisão as demais veias. As análises por Doppler não foram possíveis devido ao fluxo da veia porta dos animais ser turbilhonado (*hepatopetal* e *hepatofugal*) e apresentar uma grande variabilidade com os movimentos respiratórios.

Em nossas análises observamos que somente os animais do grupo A3 apresentaram aumento significativo do calibre da veia porta já a partir de 4 semanas de indução, sendo mais proeminente após 8 e 12 semanas de experimento (Figura 28B). O grupo C3 apresentou um aumento não-significativo somente após 12 semanas (Figura 28A). Portanto, sugerimos que o aparecimento precoce de alterações relacionadas à hipertensão portal esteja relacionado à potencialização do CCl₄ pelo etanol, induzindo lesão hepática principalmente nos hepatócitos da zona acinar 3 ou da região perivenular, onde a função de biotransformação de substâncias pelo MEOS é maior que nas demais zonas. Com a potencialização, essa região é mais susceptível a lesão, o que acarretaria maior desorganização estrutural local e também a esclerose venular, aumentando a resistência ao fluxo sanguíneo.

Com o desenvolvimento da cirrose, há profundas modificações das árvores vasculares venosa e arterial (HALES *et al.*, 1959). A formação dos nódulos regenerativos associada à deposição de colágeno leva ao aumento da resistência do fluxo sanguíneo, tendo em consequência uma hipertrofia destas e tortuosidade dessas árvores.

Como complemento, realizamos estudo da estrutura da veia porta onde verificamos a presença de tortuosidade da veia porta. Em nossos estudos, observamos que 60% dos animais do grupo A3 e apenas 25% dos animais do grupo C3 apresentaram tortuosidade da veia porta. Verificamos que em alguns animais, o calibre da veia porta pode aumentar e não apresentar tortuosidade, entretanto, em calibres maiores que 0,25cm, todos os animais apresentaram tortuosidade.

Uma outra complicação que está associada à cirrose hepática é o aparecimento de ascite (SHERLOCK & DOOLEY, 2002). Em nossos estudos observamos que dois animais do grupo A3 que apresentavam maior calibre e tortuosidade da veia porta em relação aos demais apresentaram ascite. Sugerimos que o aparecimento da ascite está relacionado à alteração nesses parâmetros e portanto relacionados à hipertensão portal.

Alterações morfológicas do fígado, como atrofia geral ou hipertrofia do lobo caudado, estão relacionadas à cirrose hepática (NICOLAU *et al.*, 2002). Em nossos estudos, procuramos analisar o diâmetro transversal do fígado a fim de avaliar a morfologia dos fígados durante a indução de lesão hepática crônica. No entanto este parâmetro não apresentou qualquer alteração evidente durante todo o período experimental (Figuras 23, 24 e 25). É possível

que ao longo do experimento tenha ocorrido algum mecanismo de compensação dos lobos mais prejudicados o que impediu a observação das alterações morfológicas no fígado.

O estadiamento dos fígados por ultra-som se baseou nas análises dos parâmetros ultra-sonográficos. Embora tanto o grupo C3 como o grupo A3 tenha diagnóstico de cirrose hepática pela análise histopatológica, observamos que os animais do grupo A3 apresentaram alterações relacionadas às complicações da cirrose hepática, e, na maioria dos casos, apresentaram graus de gravidade maiores que o grupo C3. Portanto estes achados corroboram o fato da associação CCl_4 e álcool levarem a uma maior agressão ao fígado.

6 – Conclusões

Diante dos resultados obtidos em nossos estudos, podemos concluir que:

- A ingestão de dieta líquida controle e alcoólica não induz alterações em nenhum dos parâmetros histológicos, bioquímicos e ultra-sonográficos após 12 semanas de indução;
- A administração de CCl_4 na dose de 0,05mL/kg de peso corporal, associada ou não à ingestão crônica de etanol, induz lesões hepáticas crônicas que progridem para cirrose hepática ao fim de 12 semanas;
- Os animais tratados com CCl_4 e alimentados com dieta alcoólica apresentaram alterações significativas nos parâmetros bioquímicos (AST, ALT, BIL e Alb) relacionados aos achados histopatológicos;
- Os animais tratados com CCl_4 e alimentados com dieta alcoólica apresentaram alterações mais evidentes nos parâmetros ultra-sonográficos hepáticos relacionados às complicações da cirrose hepática;
- Estabelecemos um modelo animal de cirrose hepática que apresenta parâmetros bioquímicos e ultra-sonográficos semelhantes aos vistos em humanos.

7 – REFERÊNCIAS

3B SCIENTIFIC GMBH, **3B MICROanatomy™ Liver**. 2004 Disponível em: <http://www.3bscientific.com/Datenbank/PDF/k24.pdf>. Acesso em: 18 de dez. 2004.

AKERMAN, P.A., COTE, P.M., YANG, S.Q. *et al.* **Long-term ethanol consumption alters the hepatic response to the regenerative effects of tumor necrosis factor-alpha**. *Hepatology*, 1993, vol.17: p.1066-1073.

ANKOMA-SEY, V., MATLI, M., CHANG, K.B. *et al.* **Coordinated induction of VEGF receptors in mesenchymal cell types during rat hepatic wound healing**. *Oncogene*, 1998, vol.17: p.115-121.

ANTHONY, P.P., ISHAK, K.G., NAYAK, N.C. *et al.* **The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization**. *J Clin.Pathol.*, 1978, vol.31: p.395-414.

ARIAS, I.M. **Extracellular Matrix**. In: _____. ed.chefe, BOYER, J.L. *et al.* ed.assoc. **The Liver: Biology and Pathology**. 3a. ed. *Lippincott Williams & Wilkins*, 2001, Cap. On-line modificado em 2002, disponível em: <http://tusk.tufts.edu/hsdb4/content/20833/20777/20757>. Acesso em: 23 de jan. 2005.

ARIAS, I.M. **The Organ: Hepatic Microvascular System.** In: _____. ed.chefe, BOYER, J.L. *et al.* ed.assoc. **The Liver: Biology and Pathology.** 3a. ed. *Lippincott Williams & Wilkins*, 2001, Cap. On-line modificado em 2002, disponível em: <http://tusk.tufts.edu/hsdb4/content/20833/20779/20762>. Acesso em: 23 de jan. 2005.

ARII, S., IMAMURA, M. **Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury.** *J Hepatobiliary.Pancreat.Surg.*, 2000, vol.7: p.40-48.

ARTHUR, M.J., FRIEDMAN, S.L., ROLL, F.J. *et al.* **Lipocytes from normal rat liver release a neutral metalloproteinase that degrades basement membrane (type IV) collagen.** *J Clin.Invest*, 1989, vol.84: p.1076-1085.

ASTON, N.S., MORRIS, P.A., TANNER, M.S. *et al.* **An animal model for copper-associated cirrhosis in infancy.** *J Pathol.*, 1998, vol.186: p.215-221.

ATSDR/USA, **Toxicological Profile for Carbon Tetrachloride.** Agency for Toxic Substances and Disease Registry / U.S. Departament of Health and Human Services – Public Health Service, 2003. 309p. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp30.pdf>. Acesso em: 16 de fev. 2005.

BHATHAL, P.S., GROSSMAN, H.J. **Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators.** *J Hepatol.*, 1985, vol.1: p.325-337.

BHIMANI, E.K., SERRACINO-INGLOTT, F., SARELA, A.I. *et al.* **Hepatic and mesenteric nitric oxide synthase expression in a rat model of CCl(4)-induced cirrhosis.** *J Surg.Res.*, 2003, vol.113: p.172-178.

BHUNCHET, E., EISHI, Y., WAKE, K. **Contribution of immune response to the hepatic fibrosis induced by porcine serum.** *Hepatology*, 1996, vol.23: p.811-817.

BISSELL, D.M. **Hepatic fibrosis as wound repair: a progress report.** *J Gastroenterol.*, 1998, vol.33: p.295-302.

BLENDIS, L.M., ORREGO, H., CROSSLEY, I.R. *et al.* **The role of hepatocyte enlargement in hepatic pressure in cirrhotic and noncirrhotic alcoholic liver disease.** *Hepatology*, 1982, vol.2: p.539-546.

BLOMHOFF, R. **Transport and metabolism of vitamin A.** *Nutr.Rev.*, 1994, vol.52: p.S13-S23.

BOLL, M., WEBER, L.W., BECKER, E. *et al.* **Hepatocyte damage induced by carbon tetrachloride: inhibited lipoprotein secretion and changed lipoprotein composition.** *Z.Naturforsch.[C.]*, 2001, vol.56: p.283-290.

BOLONDI, L., ZIRONI, G., GAIANI, S. *et al.* **Caliber of splenic and hepatic arteries and spleen size in cirrhosis of different etiology.** *Liver*, 1991, vol.11: p.198-205.

BORDER, W.A., NOBLE, N.A. **Transforming growth factor beta in tissue fibrosis.** *N.Engl.J Med.*, 1994, vol.331: p.1286-1292.

BUCK, M., KIM, D.J., HOUGLUM, K. *et al.* **c-Myb modulates transcription of the alpha-smooth muscle actin gene in activated hepatic stellate cells.** *Am.J Physiol Gastrointest.Liver Physiol*, 2000, vol.278: p.G321-G328.

CAREY, W. **Tests and screening strategies for the diagnosis of hepatitis C.** *Cleve.Clin.J Med.*, 2003, vol.70 Suppl 4: p.S7-13.

CASTILLO, T., KOOP, D.R., KAMIMURA, S. *et al.* **Role of cytochrome P-450 2E1 in ethanol-, carbon tetrachloride- and iron-dependent microsomal lipid peroxidation.** *Hepatology*, 1992, vol.16: p.992-996.

CLARKE, L.H., NOBLE, M., OLOFFS, P.C. *et al.* **An inhalation chamber for administering volatile compounds to animals: performance using carbon tetrachloride.** *Can.J Zool.*, 1973, vol.51: p.387-392.

CLAWSON, G.A., MACDONALD, J.R., WOO, C.H. **Early hypomethylation of 2'-O-ribose moieties in hepatocyte cytoplasmic ribosomal RNA underlies the protein synthetic defect produced by CCl₄.** *J Cell Biol.*, 1987, vol.105: p.705-711.

CORNISH, H.H., ADEFUIN, J. **Ethanol potentiation of halogenated aliphatic solvent toxicity.** *Am.Ind.Hyg.Assoc.J*, 1966, vol.27: p.57-61.

DATASUS/MS, **Informações de saúde – Indicadores de Mortalidade no Brasil em 2002.** Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obtuf.def>. Acesso em: 13 de jan. 2005.

DAVID, A., FRANTIK, E., HOLUSA, R. *et al.* **Role of time and concentration on carbon tetrachloride toxicity in rats.** *Int.Arch.Occup.Environ.Health*, 1981, vol.48: p.49-60.

DAVIS, B.H. **Transforming growth factor beta responsiveness is modulated by the extracellular collagen matrix during hepatic ito cell culture.** *J Cell Physiol*, 1988, vol.136: p.547-553.

DE BLESER, P.J., NIKI, T., ROGIERS, V. *et al.* **Transforming growth factor-beta gene expression in normal and fibrotic rat liver** . *J Hepatol.*, 1997, vol.26: p.886-893.

DESMET, V.J. **Organizational Principles**. In: ARIAS, I.M. ed.chefe, BOYER, J.L. *et al.* ed.assoc. **The Liver: Biology and Pathology**. 4a. ed. *Lippincott Williams & Wilkins*, 2001. Cap. 1, p. 3-16.

DIAZ-GIL, J.J., MUNOZ, J., ALBILLOS, A. *et al.* **Improvement in liver fibrosis, functionality and hemodynamics in CCl₄-cirrhotic rats after injection of the Liver Growth Factor**. *J Hepatol.*, 1999, vol.30: p.1065-1072.

DIRENZO, A.B., GANDOLFI, A.J., SIPES, I.G. **Microsomal bioactivation and covalent binding of aliphatic halides to DNA**. *Toxicol.Lett.*, 1982, vol.11: p.243-252.

ESTERBAUER, H., ZOLLNER, H., LANG, J. **Metabolism of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by isolated hepatocytes and by liver cytosolic fractions**. *Biochem.J*, 1985, vol.228: p.363-373.

EVANS, W.H. **A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte**. *Biochim.Biophys.Acta*, 1980, vol.604: p.27-64.

FIGUERAS, J., FARRAN, L., BENASCO, C. *et al.* **Vascular occlusion in hepatic resections in cirrhotic rat livers: an experimental study in rats**. *Liver Transpl.Surg.*, 1997, vol.3: p.617-623.

FORNI, L.G., PACKER, J.E., SLATER, T.F. *et al.* **Reaction of the trichloromethyl and halothane-derived peroxy radicals with unsaturated fatty acids: a pulse radiolysis study.** *Chem.Biol.Interact.*, 1983, vol.45: p.171-177.

FRIEDMAN, S.L., ROLL, F.J., BOYLES, J. *et al.* **Maintenance of differentiated phenotype of cultured rat hepatic lipocytes by basement membrane matrix.** *J Biol.Chem.*, 1989, vol.264: p.10756-10762.

FRIEDMAN, S.L. **Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies.** *N.Engl.J Med.*, 1993, vol.328: p.1828-1835.

FRIEDMAN, S.L. **Stellate cell activation in alcoholic fibrosis--an overview.** *Alcohol Clin.Exp.Res.*, 1999, vol.23: p.904-910.

FRIEDMAN, S.L. **Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury.** *J Biol.Chem.*, 2000, vol.275: p.2247-2250.

GARCIA-FERNANDEZ, M., CASTILLA-CORTAZAR, I., DIAZ-SANCHEZ, M. *et al.* **Antioxidant effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in rats with advanced liver cirrhosis.** *BMC.Gastroenterol.*, 2005, vol.5: p.7-

GARNER, R.C., MCLEAN, A.E. **Increased susceptibility to carbon tetrachloride poisoning in the rat after pretreatment with oral phenobarbitone.** *Biochem.Pharmacol.*, 1969, vol.18: p.645-650.

GEERTS, A., GREENWEL, P., CUNNINGHAM, M. *et al.* **Identification of connective tissue gene transcripts in freshly isolated parenchymal, endothelial, Kupffer and fat-storing cells by northern hybridization analysis.** *J Hepatol.*, 1993, vol.19: p.148-158.

GEORGE, J., PERA, N., PHUNG, N. *et al.* **Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis.** *J Hepatol.*, 2003, vol.39: p.756-764.

GONZALEZ, F.J. **Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1.** *Mutat.Res.*, 2005, vol.569: p.101-110.

GOODENOUGH, D.A., REVEL, J.P. **A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver.** *J Cell Biol.*, 1970, vol.45: p.272-290.

GOODMAN, Z.D., ISHAK, K.G. **Occlusive venous lesions in alcoholic liver disease. A study of 200 cases.** *Gastroenterology*, 1982, vol.83: p.786-796.

GRAUDAL, N., LETH, P., MARBJERG, L. *et al.* **Characteristics of cirrhosis undiagnosed during life: a comparative analysis of 73 undiagnosed cases and 149 diagnosed cases of cirrhosis, detected in 4929 consecutive autopsies.** *J Intern.Med.*, 1991, vol.230: p.165-171.

GREENWEL, P., RUBIN, J., SCHWARTZ, M. *et al.* **Liver fat-storing cell clones obtained from a CCl₄-cirrhotic rat are heterogeneous with regard to proliferation, expression of extracellular matrix components, interleukin-6, and connexin 43.** *Lab Invest*, 1993, vol.69: p.210-216.

GREENWEL, P., IRABURU, M.J., REYES-ROMERO, M. *et al.* **Induction of an acute phase response in rats stimulates the expression of alpha 1(I) procollagen messenger ribonucleic acid in their livers. Possible role of interleukin-6.** *Lab Invest*, 1995, vol.72: p.83-91.

GREENWEL, P., ROJKIND, M. **Accelerated development of liver fibrosis in CCl4-treated rats by the weekly induction of acute phase response episodes: upregulation of alpha1(I) procollagen and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNAs.** *Biochim.Biophys.Acta*, 1997, vol.1361: p.177-184.

GREENWEL, P., INAGAKI, Y., HU, W. *et al.* **Sp1 is required for the early response of alpha2(I) collagen to transforming growth factor-beta1.** *J Biol.Chem.*, 1997, vol.272: p.19738-19745.

GREENWEL, P., DOMINGUEZ-ROSALES, J.A., MAVI, G. *et al.* **Hydrogen peroxide: a link between acetaldehyde-elicited alpha1(I) collagen gene up-regulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells.** *Hepatology*, 2000, vol.31: p.109-116.

GRESSNER, A.M., BACHEM, M.G. **Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis.** *Semin.Liver Dis.*, 1990, vol.10: p.30-46.

GRESSNER, A.M. **Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells.** *J Hepatol.*, 1995, vol.22: p.28-36.

GRINKO, I., GEERTS, A., WISSE, E. **Experimental biliary fibrosis correlates with increased numbers of fat-storing and Kupffer cells, and portal endotoxemia.** *J Hepatol.*, 1995, vol.23: p.449-458.

GUPTA, T.K., TORUNER, M., GROSZMANN, R.J. **Intrahepatic modulation of portal pressure and its role in portal hypertension. Role of nitric oxide.** *Digestion*, 1998, vol.59: p.413-415.

HALL, P.D., PLUMMER, J.L., ILSLEY, A.H. *et al.* **Hepatic fibrosis and cirrhosis after chronic administration of alcohol and "low-dose" carbon tetrachloride vapor in the rat.** *Hepatology* , 1991, vol.13: p.815-819.

HALES, M.R., ALLAN, J.S., HALL, E.M. **Injection –corrosion studies of normal and cirrhotic livers.** *Am. J. Pathol.* 1953, vol. 35: p.909-41.

HALL, P.M., PLUMMER, J.L., ILSLEY, A.H. *et al.* **The pathology of liver injury induced by the chronic administration of alcohol and 'low-dose' carbon tetrachloride in Porton rats.** *J Gastroenterol.Hepatol.*, 1994, vol.9: p.250-256.

HALSTED, C.H. **Nutrition and alcoholic liver disease.** *Semin.Liver Dis.*, 2004, vol.24: p.289-304.

HASUMURA, Y., TESCHKE, R., LIEBER, C.S. **Increased carbon tetrachloride hepatotoxicity, and its mechanism, after chronic ethanol consumption.** *Gastroenterology*, 1974, vol.66: p.415-422.

HOFMANN, A.F. **Bile Acids**. In: ARIAS, I.M. ed.chefe, BOYER, J.L. *et al.* ed.assoc. **The Liver: Biology and Pathology**. 3a. ed. *Lippincott Williams & Wilkins*, 2001, Cap. On-line modificado em 2004, disponível em: <http://tusk.tufts.edu/hsdb4/content/20833/20775/20752#6>. Acesso em: 4 de mar. 2005.

INAGAKI, Y., TRUTER, S., TANAKA, S. *et al.* **Overlapping pathways mediate the opposing actions of tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta on alpha 2(I) collagen gene transcription**. *J Biol.Chem.*, 1995, vol.270: p.3353-3358.

IREDALE, J.P., MURPHY, G., HEMBRY, R.M. *et al.* **Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-1. Implications for regulation of matrix degradation in liver**. *J Clin.Invest*, 1992, vol.90: p.282-287.

IREDALE, J.P. **Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis**. *Int.J Biochem.Cell Biol.*, 1997, vol.29: p.43-54.

ISHIKAWA, K., MOCHIDA, S., MASHIBA, S. *et al.* **Expressions of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis**. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 1999, vol.254: p.587-593.

JARNAGIN, W.R., ROCKEY, D.C., KOTELIANSKY, V.E. *et al.* **Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis**. *J Cell Biol.*, 1994, vol.127: p.2037-2048.

KODAVANTI, P.R., KODAVANTI, U.P., FAROON, O.M. *et al.* **Pivotal role of hepatocellular regeneration in the ultimate hepatotoxicity of CCl₄ in chlordecone-, mirex-, or phenobarbital-pretreated rats.** *Toxicol.Pathol.*, 1992, vol.20: p.556-569.

KOJIMA, T., YAMAMOTO, T., MURATA, M. *et al.* **Regulation of the blood-biliary barrier: interaction between gap and tight junctions in hepatocytes.** *Med.Electron Microsc.*, 2003, vol.36: p.157-164.

KONO, H., WHEELER, M.D., RUSYN, I. *et al.* **Gender differences in early alcohol-induced liver injury: role of CD14, NF-kappaB, and TNF-alpha.** *Am.J Physiol Gastrointest.Liver Physiol*, 2000, vol.278: p.G652-G661.

KOTEISH, A., YANG, S., LIN, H. *et al.* **Ethanol induces redox-sensitive cell-cycle inhibitors and inhibits liver regeneration after partial hepatectomy.** *Alcohol Clin.Exp.Res.*, 2002, vol.26: p.1710-1718.

KRISTENSEN, D.B., KAWADA, N., IMAMURA, K. *et al.* **Proteome analysis of rat hepatic stellate cells.** *Hepatology*, 2000, vol.32: p.268-277.

KUDO, M., TOMITA, S., TOCHIO, H. *et al.* **Intrahepatic portosystemic venous shunt: diagnosis by color Doppler imaging.** *Am.J Gastroenterol.*, 1993, vol.88: p.723-729.

KUS, I., COLAKOGLU, N., PEKMEZ, H. *et al.* **Protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats.** *Acta Histochem.*, 2004, vol.106: p.289-297.

LAYER, G., ZUNA, I., LORENZ, A. *et al.* **Computerized ultrasound B-scan texture analysis of experimental diffuse parenchymal liver disease: correlation with histopathology and tissue composition.** *J Clin.Ultrasound*, 1991, vol.19: p.193-201.

LEE G.P., JEONG W.I., JEONG D.H. *et al.* **Diagnostic evaluation of carbon tetrachloride-induced rat hepatic cirrhosis model.** *Anticancer Res.* 2005 Mar-Apr;25(2A):1029-38

LIEBER, C.S., DECARLI, L.M. **Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update.** *Alcohol Alcohol*, 1989, vol.24: p.197-211.

LINK, B., DURK, H., THIEL, D. *et al.* **Binding of trichloromethyl radicals to lipids of the hepatic endoplasmic reticulum during tetrachloromethane metabolism.** *Biochem.J*, 1984, vol.223: p.577-586.

LLOVET, J.M., BARTOLI, R., PLANAS, R. *et al.* **Bacterial translocation in cirrhotic rats. Its role in the development of spontaneous bacterial peritonitis.** *Gut*, 1994, vol.35: p.1648-1652.

LOUIS, H., VAN LAETHEM, J.L., WU, W. *et al.* **Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice.** *Hepatology*, 1998, vol.28: p.1607-1615.

LUO, Y.J., YU, J.P., SHI, Z.H. *et al.* **Ginkgo biloba extract reverses CCl₄-induced liver fibrosis in rats.** *World J Gastroenterol.*, 2004, vol.10: p.1037-1042.

MADDEN, J.W., GERTMAN, P.M., PEACOCK, E.E., Jr. **Dimethylnitrosamine-induced hepatic cirrhosis: a new canine model of an ancient human disease.** *Surgery*, 1970, vol.68: p.260-267.

MATSUOKA, M., PHAM, N.T., TSUKAMOTO, H. **Differential effects of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor alpha, and transforming growth factor beta 1 on cell proliferation and collagen formation by cultured fat-storing cells.** *Liver*, 1989, vol.9: p.71-78.

MCLEAN, E.K., MCLEAN, A.E., SUTTON, P.M. **Instant cirrhosis. An improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone.** *Br.J Exp.Pathol.*, 1969, vol.50: p.502-506.

MICHALOPOULOS, G.K., DEFRANCES, M.C. **Liver regeneration.** *Science*, 1997, vol.276: p.60-66.

MICO, B.A., POHL, L.R. **Reductive oxygenation of carbon tetrachloride: trichloromethylperoxyl radical as a possible intermediate in the conversion of carbon tetrachloride to electrophilic chlorine.** *Arch.Biochem.Biophys.*, 1983, vol.225: p.596-609.

MIYAZONO, K. **TGF-beta signaling by Smad proteins.** *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2000, vol.11: p.15-22.

MUNOZ, T.E., PAZ BOUZA, J.I., LOPEZ, B.A. *et al.* **Experimental thioacetamide-induced cirrhosis of the liver.** *Histol.Histopathol.*, 1991, vol.6: p.95-100.

MURAKAMI, T., MOCHIZUKI, K., NAKAMURA, H. **Imaging evaluation of the cirrhotic liver.** *Semin.Liver Dis.*, 2001, vol.21: p.213-224.

NANJI, A.A., JOKELAINEN, K., FOTOUHINIA, M. *et al.* **Increased severity of alcoholic liver injury in female rats: role of oxidative stress, endotoxin, and chemokines.** *Am.J Physiol Gastrointest.Liver Physiol*, 2001, vol.281: p.G1348-G1356.

NICOLAU, C., BIANCHI, L., VILANA, R. **Gray-scale ultrasound in hepatic cirrhosis and chronic hepatitis: diagnosis, screening, and intervention.** *Semin.Ultrasound CT MR*, 2002, vol.23: p.3-18.

ODA, M., YOKOMORI, H., HAN, J.Y. **Regulatory mechanisms of hepatic microcirculation.** *Clin.Hemorheol.Microcirc.*, 2003, vol.29: p.167-182.

OKUNO, M., MORIWAKI, H., IMAI, S. *et al.* **Retinoids exacerbate rat liver fibrosis by inducing the activation of latent TGF-beta in liver stellate cells.** *Hepatology*, 1997, vol.26: p.913-921.

ONORI, P., MORINI, S., FRANCHITTO, A. *et al.* **Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl4-treated rats.** *J Hepatol.*, 2000, vol.33: p.555-563.

OMS/WHO, **Hepatitis B.** World Health Organization, 2000. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Acesso em: 17 de dez. 2004.

OMS/WHO, **Hepatitis C.** World Health Organization, 2000. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Acesso em: 17 de dez. 2004.

OMS/WHO, **Causes of Death: Global, regional and country-specific estimates of deaths by cause, age and sex (2001)**. World Health Organization, 2003. Disponível em: http://www.who.int/mip/2003/other_documents/en/causesofdeath.pdf. 17 de dez. 2004.

OMS/WHO, **Global Status Report: Alcohol Policy**. World Health Organization, 2004. p.1 Disponível em: http://www.who.int/substance_abuse/publications/en/Alcohol%20Policy%20Report.pdf. Acesso em: 17 de dez. 2004.

OMS/WHO, **The World Health Report 2004: Statistical Annex – Annex Table 2: Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2002**. World Health Organization, 2004. Disponível em: http://www.who.int/whr/2004/annex/topic/en/annex_2_en.pdf. Acesso em: 17 de dez. 2004.

PAROLA, M., LEONARDUZZI, G., ROBINO, G. *et al.* **On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis**. *Free Radic.Biol.Med.*, 1996, vol.20: p.351-359.

PEREZ, T.R. **Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ and adequate model of human cirrhosis?** *Hepatology*, 1983, vol.3: p.112-120.

PINZANI, M., GESUALDO, L., SABBAH, G.M. *et al.* **Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells**. *J Clin.Invest*, 1989, vol.84: p.1786-1793.

PINZANI, M., FAILLI, P., RUOCCO, C. *et al.* **Fat-storing cells as liver-specific pericytes. Spatial dynamics of agonist-stimulated intracellular calcium transients.** *J Clin.Invest*, 1992, vol.90: p.642-646.

PINZANI, M., MILANI, S., GRAPPONE, C. *et al.* **Expression of platelet-derived growth factor in a model of acute liver injury.** *Hepatology*, 1994, vol.19: p.701-707.

PINZANI, M., GENTILINI, P. **Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis.** *Semin.Liver Dis.*, 1999, vol.19: p.397-410.

PLAA, G.L. **Chlorinated methanes and liver injury: highlights of the past 50 years.** *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 2000, vol.40: p.42-65.

PLUMMER, J.L., HALL, P.D., ILSLEY, A.H. *et al.* **Dose-response relationships in hepatic injury produced by alcohol and carbon tetrachloride.** *Alcohol Clin.Exp.Res.*, 1994, vol.18: p.1523-1526.

POPPER, H., SCHAFFNER, F. **Fine structural changes of the liver.** *Ann.Intern.Med.*, 1963, vol.59: p.674-691.

POYER, J.L., MCCAY, P.B., LAI, E.K. *et al.* **Confirmation of assignment of the trichloromethyl radical spin adduct detected by spin trapping during ¹³C-carbon tetrachloride metabolism in vitro and in vivo.** *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 1980, vol.94: p.1154-1160.

PROCTOR, E., CHATAMRA, K. **Standardized micronodular cirrhosis in the rat.** *Eur Surg.Res.*, 1984, vol.16: p.182-186.

RAMADORI, G., RIEDER, H., KNITTEL, T. *et al.* **Fat storing cells (FSC) of rat liver synthesize and secrete fibronectin. Comparison with hepatocytes.** *J Hepatol.*, 1987, vol.4: p.190-197.

RAMADORI, G., NEUBAUER, K., ODENTHAL, M. *et al.* **The gene of hepatocyte growth factor is expressed in fat-storing cells of rat liver and is downregulated during cell growth and by transforming growth factor-beta.** *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 1992, vol.183: p.739-742.

RAO, P.S., MANGIPUDY, R.S., MEHENDALE, H.M. **Tissue injury and repair as parallel and opposing responses to CCl₄ hepatotoxicity: a novel dose-response.** *Toxicology*, 1997, vol.118: p.181-193.

RECKNAGEL, R.O., GLENDE, E.A., Jr., DOLAK, J.A. *et al.* **Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity.** *Pharmacol.Ther.*, 1989, vol.43: p.139-154.

RICARD-BLUM, S., BRESSON-HADNI, S., GUERRET, S. *et al.* **Mechanism of collagen network stabilization in human irreversible granulomatous liver fibrosis.** *Gastroenterology*, 1996, vol.111: p.172-182.

RILEY, T.R., III, BHATTI, A.M. **Preventive strategies in chronic liver disease: part II. Cirrhosis.** *Am.Fam.Physician*, 2001, vol.64: p.1735-1740.

ROBERTS, S.M., HARBISON, R.D., JAMES, R.C. **Methamphetamine potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice.** *J Pharmacol.Exp.Ther.*, 1994, vol.271: p.1051-1057.

ROCKEY, D.C., HOUSSET, C.N., FRIEDMAN, S.L. **Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and in vivo.** *J Clin.Invest*, 1993, vol.92: p.1795-1804.

ROCKEY, D.C., FOUASSIER, L., CHUNG, J.J. *et al.* **Cellular localization of endothelin-1 and increased production in liver injury in the rat: potential for autocrine and paracrine effects on stellate cells.** *Hepatology*, 1998, vol.27: p.472-480.

ROJKIND, M., GIAMBRONE, M.A., BIEMPICA, L. **Collagen types in normal and cirrhotic liver.** *Gastroenterology*, 1979, vol.76: p.710-719.

ROJKIND, M., GREENWEL, P. **Animal models of liver fibrosis.** *Adv.Vet.Sci.Comp Med.*, 1993, vol.37: p.333-355.

ROJKIND, M., GREENWEL, P. **Pathophysiology of Liver Fibrosis.** In: ARIAS, I.M. ed.chefe, BOYER, J.L. *et al.* ed.assoc. **The Liver: Biology and Pathology.** 4a. ed. *Lippincott Williams & Wilkins*, 2001. Cap. 49, p. 721-38.

ROOM, R., BABOR, T., REHM, J. **Alcohol and public health.** *Lancet*, 2005, vol.365: p.519-530.

RUBIN, E., ROTTENBERG, H. **Ethanol-induced injury and adaptation in biological membranes.** *Fed.Proc.*, 1982, vol.41: p.2465-2471.

SANZGIRI, U.Y., SRIVATSAN, V., MURALIDHARA, S. *et al.* **Uptake, distribution, and elimination of carbon tetrachloride in rat tissues following inhalation and ingestion exposures.** *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 1997, vol.143: p.120-129.

SCHMITT-GRAFF, A., KRUGER, S., BOCHARD, F. *et al.* **Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers.** *Am.J Pathol.*, 1991, vol.138: p.1233-1242.

SCHUPPAN, D., RUEHL, M., SOMASUNDARAM, R. *et al.* **Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis.** *Semin.Liver Dis.*, 2001, vol.21: p.351-372.

SCOTT, C.D., BAXTER, R.C. **Regulation of soluble insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor in hepatocytes from intact and regenerating rat liver.** *Endocrinology*, 1996, vol.137: p.3864-3870.

SETTE, H., Jr., BACCHELLA, T., MACHADO, M.C. **Critical analysis of the allocation policy for liver transplantation in Brazil.** *Rev.Hosp.Clin.Fac.Med.Sao Paulo*, 2003, vol.58: p.179-184.

SHERLOCK, S., DOOLEY, J. **Anatomy and Function.** In: _____. Diseases of The Liver and Biliary System. *Blackwell Publishing Ltd.*, 2002, 11a. ed., Cap. 1, p. 1-17.

SHERLOCK, S., DOOLEY, J. **Assesment of the Liver Funcion.** In: _____. Diseases of The Liver and Biliary System. *Blackwell Publishing Ltd.*, 2002, 11a. ed., Cap. 2, p. 19-334.

SHERLOCK, S., DOOLEY, J. **The Portal Venous System and Portal Hypertension.** In: _____. Diseases of The Liver and Biliary System. *Blackwell Publishing Ltd.*, 2002, 11a. ed., Cap. 10, p. 147-180.

SHERLOCK, S., DOOLEY, J. **Hepatic Cirrhosis.** In: _____. Diseases of The Liver and Biliary System. *Blackwell Publishing Ltd.*, 2002, 11a. ed., Cap. 21, p. 368-377.

SHIGA, A., SHIROTA, K., IKEDA, T. *et al.* **Morphological and immunohistochemical studies on porcine serum-induced rat liver fibrosis.** *J Vet.Med.Sci.*, 1997, vol.59: p.159-167.

SMEDSRØD, B., PERTOFT, H., GUSTAFSON, S. *et al.* **Scavenger functions of the liver endothelial cell.** *Biochem.J*, 1990, vol.266: p.313-327.

STUTENKEMPER, R., GEISSE, S., SCHWARZ, H.J. *et al.* **The hepatocyte-specific phenotype of murine liver cells correlates with high expression of connexin32 and connexin26 but very low expression of connexin43.** *Exp.Cell Res.*, 1992, vol.201: p.43-54.

SUZUKI, K., HAYASHI, N., SASAKI, Y. *et al.* **Dependence of ultrasonic attenuation of liver on pathologic fat and fibrosis: examination with experimental fatty liver and liver fibrosis models.** *Ultrasound Med.Biol.*, 1992, vol.18: p.657-666.

SVEGLIATI, B.G., D'AMBROSIO, L., FERRETTI, G. *et al.* **Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells.** *Hepatology*, 1998, vol.27: p.720-726.

SVS/MS, **Saúde Brasil 2004: Análise da situação de saúde.** Secretária de Vigilância Sanitária, 2004, Cap. 3, p.87. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/pub48.htm>. Acesso em: 17 de dez. 2004.

TADIC, S.D., ELM, M.S., LI, H.S. *et al.* **Sex differences in hepatic gene expression in a rat model of ethanol-induced liver injury.** *J Appl.Physiol*, 2002, vol.93: p.1057-1068.

TAKASAKI, S., HANO, H. **Three-dimensional observations of the human hepatic artery (Arterial system in the liver).** *J Hepatol.*, 2001, vol.34: p.455-466.

TAYLOR, K.J., RIELY, C.A., HAMMERS, L. *et al.* **Quantitative US attenuation in normal liver and in patients with diffuse liver disease: importance of fat.** *Radiology*, 1986, vol.160: p.65-71.

TRAIGER, G.J., PLAA, G.L. **Relationship of alcohol metabolism to the potentiation of CCl₄ hepatotoxicity induced by aliphatic alcohols.** *J Pharmacol.Exp.Ther.*, 1972, vol.183: p.481-488.

VAN HOGEZAND, R.A., VERSPAGET, H.W. **New therapies for inflammatory bowel disease: an update on chimeric anti-TNF alpha antibodies and IL-10 therapy.** *Scand.J Gastroenterol.Suppl*, 1997, vol.223: p.105-107.

VOGEL, W., GISH, G.D., ALVES, F. *et al.* **The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen.** *Mol.Cell*, 1997, vol.1: p.13-23.

WANG, X., TANG, X., GONG, X. *et al.* **Regulation of hepatic stellate cell activation and growth by transcription factor myocyte enhancer factor 2.** *Gastroenterology*, 2004, vol.127: p.1174-1188.

WEBER, L.W., BOLL, M., STAMPFL, A. **Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model.** *Crit Rev.Toxicol.*, 2003, vol.33: p.105-136.

WESTERMARCK, J., KAHARI, V.M. **Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion.** *FASEB J*, 1999, vol.13: p.781-792.

WILLIAMS, D.E., CARPENTER, H.M., BUHLER, D.R. *et al.* **Alterations in lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and carcinogen metabolism in liver microsomes of vitamin E-deficient trout and rat.** *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 1992, vol.116: p.78-84.

WISSE, E., KNOOK, D.L. **The investigation of sinusoidal cells: a new approach to the study of liver function.** *Prog.Liver Dis.*, 1979, vol.6: p.153-171.

WISSE, E., DE ZANGER, R.B., CHARELS, K. *et al.* **The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse.** *Hepatology*, 1985, vol.5: p.683-692.

WONG, F.W., CHAN, W.Y., LEE, S.S. **Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression.** *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 1998, vol.153: p.109-118.

YUEN, S.T., GOGO, A.R., Jr., LUK, I.S. *et al.* **The effect of nicotine and its interaction with carbon tetrachloride in the rat liver.** *Pharmacol.Toxicol.*, 1995, vol.77: p.225-230.

ZEISEL, S.H., DA COSTA, K.A., FRANKLIN, P.D. *et al.* **Choline, an essential nutrient for humans.** *FASEB J* , 1991, vol.5: p.2093-2098.

ZINDY, F., LAMAS, E., SCHMIDT, S. *et al.* **Expression of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-II, IGF-I and insulin receptors mRNAs in isolated non-parenchymal rat liver cells.** *J Hepatol.*, 1992, vol.14: p.30-34.

ZOLI, M., CORDIANI, M.R., MARCHESINI, G. *et al.* **Ultrasonographic follow-up of liver cirrhosis.** *J Clin.Ultrasound*, 1990, vol.18: p.91-96.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)