

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA

**Potencial antioxidante da NAC e da SNAC sobre estresse oxidativo e complicações  
da cirrose biliar secundária**

*Rafael Vercelino*

Porto Alegre – RS, 2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA

**Potencial antioxidante da NAC e da SNAC sobre estresse oxidativo e complicações  
da cirrose biliar secundária**

*Rafael Vercelino*

**Orientador(a):** Profa. Dra. Norma Possa Marroni

*Tese de Doutorado apresentada  
ao Curso de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas: Fisiologia  
da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul*

Porto Alegre – RS, 2009.

*O homem de bem exige tudo de si próprio;  
O homem medíocre espera tudo dos outros.  
Confúcio (557-479 AC)*

## **DEDICATÓRIA**

À minha mãe Iolanda, ao meu irmão Carlos Jr, e minha noiva, Vivian Tiemi.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Hepatologia Experimental e Fisiologia do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Laboratório de Fisiologia e Biologia Molecular do Instituto de Biomedicina da Universidade de León – Espanha.

Teve Subvenção da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e da Coordenação de Colaboração Internacional Brasil-Espanha da CAPES e Ciberehd, Espanha.

## **AGRADECIMENTOS**

À Iolanda Maria Vercelino, pela dedicação como mãe e amiga, por me apoiar nos meus sonhos e por estar sempre presente.

Ao meu Irmão, Carlos Jr., pelo seu apoio e sua ajuda em todas as minhas conquistas.

À Profa. Dra. Norma Marroni, por tudo que me ensinou e por me propiciar condições para crescer na área científica e humana.

À minha noiva Vivian Tiemi, pela dedicação e compreensão.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli, por nos proporcionar a possibilidade de novas pesquisas.

A toda equipe do Instituto de Biomedicina da Universidad de León, em especial à Dra. Maria Jesus Tuñon.

À minha amiga e colega Juliana Tieppo, pela ajuda, e por todos os momentos de crescimento mútuo e companheirismo.

À minhas amigas e colegas, Graziella Rodrigues, Gabriela de Souza e Bruna Valliati, pela sua ajuda indispensável na realização deste trabalho.

À Cíntia de David e Lidiane Filippin, pela colaboração, amizade e constante troca de informações que me proporcionou um crescimento na área científica.

Ao Prof. Doutor Alexandre Simões Dias, pelo exemplo e pela amizade.

Aos amigos e colegas Luiz e Nelson, pela sua dedicação à investigação científica e pelos momentos de troca e aprendizado.

À Dra. Themis Reverbel da Silveira, por proporcionar ao nosso grupo de pesquisa uma oportunidade de ouro, que é poder realizar investigações em um centro de excelência, o Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Ao Prof. Dr. Cláudio Augusto Marroni, por suas idéias sempre pertinentes, que contribuíram para a realização desse estudo.

A todos os demais colegas e amigos do Laboratório de Hepatologia e Fisiologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Dra. Marilene, Dra. Maria Isabel, Dr. Henrique, Dr. Brasil, Camila Benfca, Silvia, Camila Marques, Darlan, Felipe, Éder, Franciele e Simone.

A todos do departamento de Fisiologia da UFRGS, GPPG e Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURA.....</b>	<b>xi</b>
<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>xv</b>
<b>RESUMO EXPERIMENTO I.....</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT I.....</b>	<b>xvii</b>
<b>RESUMO EXPERIMENTO II.....</b>	<b>xviii</b>
<b>ABSTRACT II.....</b>	<b>xix</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Referencial Teórico.....</b>	<b>4</b>
1.1 Cirrose Hepática.....	5
1.2 Cirrose Biliar Secundária.....	13
1.3 Síndrome Hepatopulmonar.....	15
1.4 Equilíbrio Redox e Rotas de Sinalização Celular.....	18
1.4.1 Estresse Oxidativo e Nitrosativo.....	18
1.4.2 Proteínas Ativadas por Mitógenos.....	23
1.4.3 Antioxidantes Enzimáticos.....	25
1.4.4 Antioxidantes Não-Enzimáticos.....	27
1.4.5 N-Acetilcisteína.....	29
1.4.6 S-nitrosotióis e a S-Nitroso-N-Acetilcisteína.....	31
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>34</b>
2.1 Objetivo Geral.....	35
2.2 Objetivos Específicos.....	35

2.2.1 Experimento I.....	35
2.2.2 Experimento II.....	36
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>38</b>
3.1 Experimento I.....	39
3.1.1 Delineamento da Pesquisa .....	39
3.1.2 Delineamento Experimental.....	39
3.1.2.1 Animais.....	39
3.1.2.2 Grupos Experimentais.....	39
3.1.3 Procedimentos Experimentais.....	40
3.1.3.1 Ligadura de Ducto Biliar Comum.....	40
3.1.3.2 Administração do Veículo e da NAC.....	41
3.1.3.3 Morte dos Animais e Obtenção das amostras de tecido e sangue.....	41
3.1.3.4 Preparação do Homogeneizado.....	42
3.1.3.5 Dosagem de Proteína.....	43
3.1.3.6 Determinação das Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico.....	43
3.1.3.7 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD).....	44
3.1.3.8 Avaliação dos Metabólitos do Óxido Nítrico.....	44
3.1.3.9 Micronúcelos.....	45
3.1.3.10 Ensaio Cometa.....	45
3.1.3.11 Histologia.....	46
3.1.3.12 Análise Estatística.....	46
3.2 Experimento II.....	47
3.2.1 Delineamento de Pesquisa.....	47
3.2.2 Delineamento Experimental .....	47
3.2.2.1 Animais.....	47
3.2.2.2 Grupos Experimentais.....	<b>48</b>
3.2.3 Procedimentos Experimentais.....	48
3.2.3.1 Ligadura de Ducto Biliar Comum.....	48
3.2.3.2 Administração do Veículo e da SNAC.....	49
3.2.3.3 Morte dos Animais e Obtenção das amostras de tecido e sangue.....	49
3.2.3.4 Avaliação da Histologia.....	50
3.2.3.5 Preparação do Homogeneizado.....	51
3.2.3.6 Dosagem de Proteína.....	51

3.2.3.7 Determinação das Substâncias que Reagem ao ÁcidoTiobarbitúrico.....	51
3.2.3.8 Quimiluminescencia.....	52
3.2.3.9 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD).....	52
3.2.3.10 Avaliação dos Metabólitos do Óxido Nítrico.....	53
3.2.3.11 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR).....	53
3.2.3.12 Western Blot.....	54
3.2.3.13 Análise Estatística.....	54
<b>4. Resultados.....</b>	<b>55</b>
4.1 Artigo Experimento I.....	56
4.2 Artigo Experimento II.....	65
<b>5. Discussão.....</b>	<b>103</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>115</b>
6.1 Experimento I.....	116
6.2 Experimento II.....	117
6.3 Conclusão Geral.....	117
<b>7. Perspectivas.....</b>	<b>119</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>121</b>
<b>9. Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>125</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Arquitetura sinusoidal e localização das células estreladas hepáticas.....	6
Figura 2A	Arquitetura sinusoidal normal com as células estreladas contendo gotículas de retinóides.....	6
Figura 2B	Multiplicação das células estreladas, o acúmulo de matriz extracelular e perda das vilosidades.....	6
Figura 3	Célula Estrelada Hepática em um processo de injúria do fígado.....	7
Figura 4	Endoteliopatia na circulação vascular intra-hepática.....	11
Figura 5	Hepatócito normal e as sucessivas etapas envolvidas para a progressão da cirrose estabelecida.....	12
Figura 6	Modelo de cirrose biliar secundária por ligadura de ducto biliar comum.....	14
Figura 7	Fisiopatologia da SHP.....	16
Figura 8	Esquema de produção das espécies ativas de oxigênio.....	19
Figura 9	Formação de espécies ativas de oxigênio e nitrogênio.....	22
Figura 10	Rota de ativação das MAPKs.....	24
Figura 11	Esquema de interação do sistema glutathiona.....	27
Figura 12	Fórmula química da N-acetilcisteína.....	30
Figura 13	Fórmula química da S-nitroso-N-acetilcisteína.....	32
Figura 14	Histologia de fígado de animais do grupo Sham.....	122
Figura 15	Histologia de fígado de animais do grupo CBDL.....	122
Figura 16	Histologia de fígado de animais do grupo CBDL+NAC.....	123
Figura 17	Valores médios de lipoperoxidação (TBA-RS) no fígado dos diferentes grupos estudados do <b>experimento I</b> .....	123
Figura 18	Valores médios de atividade antioxidante da enzima SOD no fígado dos diferentes grupos estudados do <b>experimento I</b> .....	124

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu$	Micra
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\alpha$ - SMA	Actina Alfa de Músculo Liso
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlet
AKT	Família de proteínas cínases
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BSNO	S-nitrosoalbumina
$\text{Ca}^{+2}$	Íon cálcio
CAT	Catalase
CBDL	Ligadura de Ducto Biliar Comum
cDNA	DNA complementar
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
COX 2	Ciclo-oxigenase-2
$\text{Cu}^{2+}$	Íon cobre
$\text{CuSO}_4$	Sulfato de cobre
CuZnSOD	Sod cobre-zinco
CySH	L-cisteína
CySNO	S-nitroso-L-cisteina
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAO	Espécies Ativas de Nitrogênio
EDRF	Fator Relaxante Derivado do Endotélio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ENC	Eritrócitos normocromáticos
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial

EPC	Eritrócitos policromáticos
ERK	Cínase Reguladora de Sinal Extracelular
ERK1/2	Cínase Reguladora de Sinal Extracelular tipo 1 e 2
ERM	Erro padrão da Média
ERS	European respiratory society
ET-1	Endotelina-1
FA	Fosfatase alcalina
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FC	Frequência de Danos
Fe <sup>2+</sup>	Íon ferroso
FeSOD	SOD ferro
GAPDH	Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSNO	S-nitrosoglutationa
GSSH	Glutatina oxidada
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HOCl	Ácido hipocloroso
IκB	Inibidor kappa B
ID	Índice de Danos
IFN-γ	Interferon gama
IKK	Inibidor kappa kinase
IL1β	Interleucina -1 beta
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
JNK	Cínase do N-Terminal do c-Jun
KCl	Cloreto de Potássio
LO <sup>•</sup>	Radical oxil
LOO <sup>•</sup>	Radical peroxil
LONO	Produto nitrogenado da peroxidação de ácidos graxos
LOONO	Produto nitrogenado da peroxidação de ácidos graxos
LPS	Lipopolissacarideo
MAPK	Proteína Cínase Ativada por Mitógenos

MAP2K	MAPK cínase
MAP3K	MAPK cínase cínase
p38	MAPK p38
MCP-1	Proteína Quimiotática de monócitos 1
MEK	Cínase ativadora da MAPK
MEK4	Cínase ativadora da MAPK 4
MEK7	Cínase ativadora da MAPK 7
mg/mL	Miligrama por Mililitro
MLK	Cínase de Linhagem Mista
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercúrio
MMPs	Metaloproteínases
MMP-9	Metaloproteínase-9
MMP-1	Metaloproteínase-1
MnSOD	SOD manganês
NAC	N-acetilcisteína
NaCl	Cloreto de Sódio
NADP <sup>+</sup>	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida Adenina;
NADPH	Nicotinamida dinucleotídeo fosfato reduzido
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NFκB	Fator de Transcrição kappa B
nm	Nanômetro
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
Nox	Metabólitos do Óxido Nítrico
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical ânion superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxil
ONOO <sup>-</sup>	Peróxinitrito
p50	Subunidade p50 do NFκB
p65	Subunidade p65 do NFκB
PaCO <sub>2</sub>	Pressão Parcial de Gás Carbônico Arterial

PaO <sub>2</sub>	Pressão Parcial de Oxigênio Arterial
PBS	Buffer fosfato
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PDGF- R	Receptores Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PM	Peso molecular
QL	Quimiluminescência
RAC	Cínase específicas de fosforilação de MAPKs
RAF	Cínase específicas de fosforilação de MAPKs
RAS	Cínase específicas de fosforilação de MAPKs
RL	Radical livre
RNA	Ácido ribonucléico
RS <sup>•</sup>	Radical tiila
rpm	Rotações por minuto
RSNOs	S-nitrosotióis
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SatO <sub>2</sub> /Hb	Saturação de Oxigênio da Hemoglobina
SH	Sulfidril
SHP	Síndrome hepatopulmonar
SNAC	S-nitros-N-acetilcisteína
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilina
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias que reagem ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TIMP 1	Inibidor da Metaloproteínase 1
TIMP2	Inibidor da Metaloproteínase 2
TIMPS	Inibidores da Metaloproteínases
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa



## **APRESENTAÇÃO**

Esta tese compõe-se de dois experimentos que utilizam o modelo de cirrose biliar secundária, desenvolvidos a partir da ligadura de ducto biliar comum. No primeiro experimento, avaliou-se o papel do fármaco N-acetilcisteína sobre o pulmão dos animais com ligadura de ducto biliar com o objetivo de verificar seu efeito sobre a complicação da cirrose conhecida como Síndrome Hepatopulmonar. O segundo experimento teve por objetivo avaliar o papel da S-nitroso-N-Acetilcisteína, um doador de óxido nítrico, sobre o fígado dos animais cirróticos por ligadura de ducto biliar comum. Ambos os experimentos tiveram como foco comum o modelo de ligadura de ducto biliar e as complicações sistêmicas ocasionadas por ele.

## **Resumo Experimento I**

O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial antioxidante da N-acetilcisteína (NAC) na síndrome hepatopulmonar, uma complicação da cirrose, usando o modelo experimental de ligadura de ducto biliar comum. Ratos machos Wistar foram divididos em quatro grupos experimentais: Sham (animais submetidos à simulação da ligadura de ducto biliar comum); CBDL (animais submetidos à ligadura de ducto biliar comum); Sham+NAC, e CBDL + NAC. A NAC (10mg/Kg) foi administrada durante duas semanas, iniciando no décimo quarto dia após a cirurgia. Alterações nas enzimas de integridade hepática, tais como, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina. Avaliaram-se as trocas gasosas através da gasometria arterial. Como medida de estresse oxidativo foi avaliada a lipoperoxidação por meio de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico, atividade da enzima superóxido dismutase e a medida de nitratos totais nos homogeneizados de pulmão. Ensaio de micronúcleos na medula óssea e ensaio cometa no pulmão, fígado e sangue foram realizados para avaliar os efeitos genotóxicos ocasionados pelo estresse oxidativo. Os resultados mostraram melhoras nos parâmetros das enzimas séricas avaliadas e nos gases arteriais, redução na lipoperoxidação e nos nitratos totais após o tratamento com NAC. Análise histológica mostrou vasodilatação nos capilares pulmonares, que foi revertida pela NAC. A frequência de micronúcleos e o dano ao DNA no pulmão e fígado foram aumentados no grupo CBDL. A NAC não causou nenhum efeito genotóxico e nenhuma influência na indução de dano na medula óssea e ao DNA do pulmão e do fígado. Os resultados sugerem efeito protetor após o tratamento com a NAC em ratos cirróticos com síndrome hepatopulmonar.

## **Abstract I**

The present study was designed to investigate the potential antioxidant of N-acetylcysteine (NAC) on the hepatopulmonary syndrome, a complication of cirrhosis in the biliary cirrhosis based on bile duct ligation in rats. Male Wistar rats were used and their hepatic integrity was investigated through blood enzymes and arterial blood gases, together with oxidative injury, antioxidant enzymes, total nitrates, as well as histology using hematoxylin-eosin. Micronucleus assay in bone marrow and comet assay in lung, liver and blood were performed to assess the genotoxic effects induced by oxidative stress. Animals were divided in 4 experimental groups: Sham - in which the surgery of the main common biliary duct ligation was simulated; CBDL - in which the surgery of the main biliary duct ligation was performed; Sham + NAC - in which the surgery of the common biliary duct ligation was simulated and in which the animals were treated with NAC on day 14 after surgery; CBDL + NAC - in which the surgery of the common biliary duct ligation was performed and in which the animals were treated with NAC after on day 14 after surgery. The NAC was administered intraperitoneally, at a concentration of 10mg/Kg, during 14 days. Improvement in the enzymatic parameters and arterial blood gases was observed after the treatment with NAC. Reduction of the oxidative damage was evidenced, verifying compounds that react to the thiobarbituric acid (TBARS), as well as antioxidant enzymes, superoxide dismutase, which showed values that are similar to the ones of the control group after the administration of NAC. Evaluation of total nitrate levels resulted in increased values in the production of these metabolites in the lung of the cirrhotic rats, which, after treatment with NAC, equalized with those values of the control group. Micronuclei frequency and DNA damage in lung and liver were increased in the CBDL group. N-Acetylcysteine caused no genotoxic effect and did not influence the induction of micronucleus in bone marrow and DNA damage in lung and liver. The histological analysis demonstrated vasodilatation in the lung, which was reverted after the use of NAC. Based on the results we can conclude that NAC is a promising drug for the investigation of hepatopulmonary syndrome.

## **Resumo Experimento II**

O objetivo desse estudo foi investigar os mecanismos moleculares envolvidos na fibrose hepática e sua prevenção pela S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC), um doador de óxido nítrico que inibe a lipoperoxidação. A cirrose biliar secundária foi induzida por meio de ligadura de ducto biliar comum (CBDL) e os grupos foram divididos em Sham e CBDL que receberam SNAC 1,4 mg/Kg/dia (6,0  $\mu$ mol/Kg/dia) e Sham e CBDL os quais receberam veículo (tampão fosfato pH7,4), duas semanas após a cirurgia por via intragástrica, durante duas semanas. Marcadores de lesão hepática, estresse oxidativo e moduladores da fibrose foram avaliados. O tratamento com SNAC reduziu o aumento da atividade das enzimas séricas (ALT, AST e FA), assim como as mudanças histológicas induzidas pela ligadura de ducto biliar comum. O aumento na concentração das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico e da quimiluminescência foi reduzido pelo tratamento com SNAC. A SNAC foi eficaz em reduzir a expressão de colágeno 1 $\alpha$ , actina-alfa de músculo liso, fator de crescimento tumoral- $\beta$ , metaloproteinase 2, inibidor de metaloproteinase 1, fator de crescimento derivado das plaquetas e do fator de necrose tumoral  $\alpha$  em ratos com CBDL. Esses efeitos foram acompanhados pela inibição da ativação cínase reguladora de sinal extracelular, cínase do N-terminal do c-Jun, proteína cínase ativada por mitógeno p38 e da AKT. A SNAC bloqueia a elevação de marcadores séricos de dano hepático e mostra efeitos antioxidantes e antifibróticos em ratos com cirrose biliar secundária. Os resultados obtidos indicam que a SNAC, pela redução da expressão de muitos genes e pela modulação de rotas de sinalização intracelular que contribuem para o acúmulo de matriz proteica, pode ser um interessante candidato para o tratamento da fibrose e da cirrose em humanos.

## Abstract II

This study was aimed to investigate the molecular mechanisms underlying prevention of hepatic fibrosis by S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC), a nitric oxide donor that inhibits lipid peroxidation. Secondary biliary cirrhosis was induced by 4 weeks of common bile duct ligation (CBDL). The groups were divided in CBDL and Sham in which the the animals were treated with SNAC (6.0  $\mu\text{mol/kg/dia}$ ) during two week (14 days) after surgery and CBDL and Sham which the the animals were treated with phosphate tampon (pH 7.4) during the same period. Markers of liver injury, oxidative stress and key modulators of liver fibrosis were assessed. *Results:* SNAC treatment reduced the increase in blood enzyme activities (ALT, AST and alkaline phosphatase), and the histological changes induced by CBDL. The increase in TBARS concentration and hydroperoxide-induced chemiluminescence were also reduced by SNAC treatment. SNAC down-regulated expression of collagen 1 $\alpha$ , alpha-smooth muscle actin, tumour growth factor- $\beta$ , metalloproteinase-2, metalloproteinase inhibitor 1, platelet derived growth factor and tumour necrosis factor- $\alpha$  in CBDL rats. These effects were accompanied by inhibited activation of extracellular signal-regulated kinases, jun aminoterminal kinases, p38 and AKT. SNAC blocks the elevation of serum markers of hepatic injury and exerts antioxidant and antifibrotic effects in rats with secondary biliary cirrhosis. Results obtained indicate that SNAC, by down-regulating increased expression of several genes and modulating intracellular signaling pathways that contribute to the accumulation of matrix proteins, may be an interesting candidate for the treatment of human fibrosis and cirrhosis.



---

## INTRODUÇÃO

---

## **INTRODUÇÃO**

O fígado tem um papel importante na homeostasia do organismo. Apresenta funções na regulação do metabolismo, incluindo síntese e estoque de glicogênio, gliconeogênese e funções no metabolismo de proteína e lipídios. O fígado é também responsável pela produção de bile, síntese de proteínas plasmáticas e pela detoxificação de drogas (Zimmerman, 1999).

A injúria crônica do fígado leva à cirrose hepática, que é causada pela fibrose difusa, modificadora da arquitetura tecidual, sendo doença com muitas repercussões e complicações. Na sua história natural, há inúmeras complicações que determinam alta morbidade e mortalidade. Essa doença crônica, com suas complicações, necessita de cuidados médicos especiais, com inúmeras hospitalizações e altos custos para os sistemas de saúde. O desenvolvimento de estratégias, como vacinas, diminuição do uso de álcool e diagnóstico precoce, possibilitariam menor prevalência dessa doença crônica e menor custo ao sistema público (Sherlock, 1984; Sikuler, Kravetz *et al.*, 1985).

Estágios finais de doenças hepáticas, como a cirrose, estavam na 12<sup>a</sup> posição entre as causas de morte nos Estados Unidos no ano de 2002 (Anderson e Smith, 2005). Mais de 17500 pacientes aguardam na fila de transplante de fígado nos Estados Unidos, e a maioria aguarda pelo menos dois anos para receber um órgão. Devido à alta prevalência e à incidência da doença, pacientes com doença hepática são frequentemente hospitalizados em unidades de tratamento intensivo de elevado custo de manutenção (Huffmyer e Nemergut, 2007). A reversão desse quadro só ocorreria com transplante hepático, dependendo da etiologia.

No Brasil, o número de transplantes de fígado passou de 486, em 2000, para 564 em 2001, 676 em 2002, 816 em 2003, 966 em 2004, 977 em 2005 e mais de 1000 em 2006, demonstrando o aumento expressivo desse procedimento. No ano de 2005, 6288 pacientes aguardavam em lista de espera para a realização de transplantes de fígado no Brasil. Denota-se uma grave desproporção entre a lista de espera e a realização de



transplantes, o que evidencia a alta taxa de mortalidade dos pacientes que aguardam por esse procedimento. Na cidade de São Paulo, o índice da desproporção superou 20% no ano de 2006 (Ferraz-Neto e Carballo, 2007). Em 2008, foram realizados 1174 transplantes de fígado no Brasil, sendo 102 no estado do Rio Grande do Sul (Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos, 2008).

Observa-se que há crescente demanda de pacientes com hepatite crônica e cirrose em lista de espera de transplante que não é contemplada pela escassa doação de órgão. Essa diferença tende a se perpetuar e a aumentar, tornando necessário medidas que possibilitem a diminuição do número de pacientes crônicos, por meio da profilaxia da infecção viral, da diminuição do alcoolismo e do estudo de fármacos que possam impedir ou prevenir a progressão da fibrose hepática e suas complicações.

Trabalhos científicos na área de fisiopatologia hepática têm demonstrado o envolvimento e a importância do estresse oxidativo na fibrose hepática e suas complicações, como a hipertensão portal, a encefalopatia hepática e a síndrome hepatopulmonar (Svegliati Baroni, D'ambrosio *et al.*, 1998; Moreira, Fraga *et al.*, 2004; Tieppo, J, Vercelino, R *et al.*, 2005; Pereira-Filho, Ferreira *et al.*, 2008; Vercelino, Tieppo *et al.*, 2008).

Tendo em vista a importância do assunto e a crescente demanda de fígado para transplante, nosso estudo visa à análise de complicações da cirrose, da fibrose instalada e do envolvimento do estresse oxidativo, procurando entender os mecanismos moleculares envolvidos, na tentativa de elucidar o processo fisiopatológico e avaliar o efeito dos fármacos N-acetilcisteína e S-nitroso-N-acetilcisteína sobre esses mecanismos, na tentativa de, futuramente, valer-se deles para aumentar a sobrevida dos pacientes até o momento do transplante.

---

## **REFERENCIAL TEÓRICO**

---

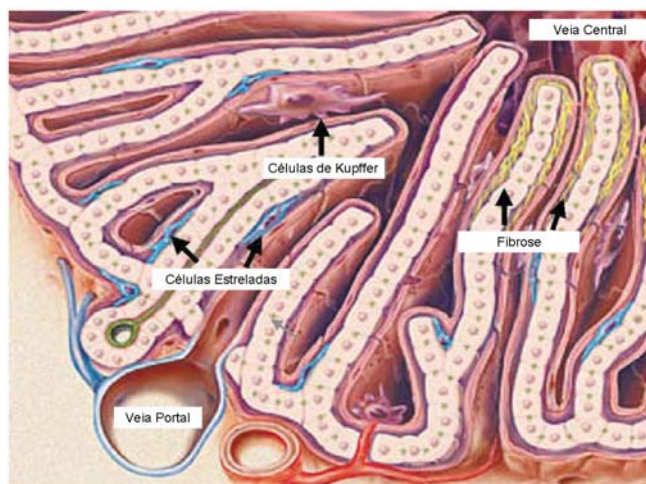
## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 Cirrose Hepática

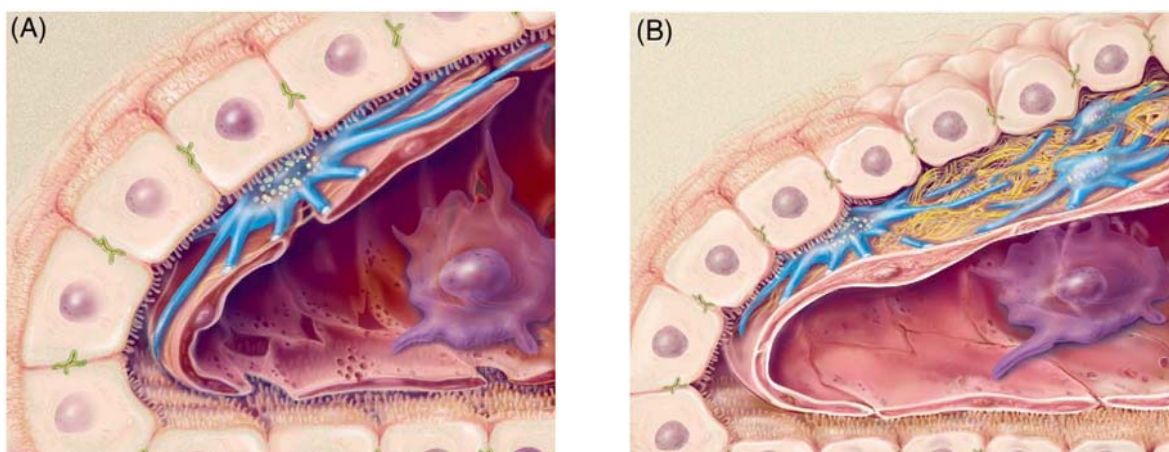
O fígado normal contém um componente epitelial (hepatócito), um revestimento endotelial, macrófagos teciduais (células de Kupffer) e células estreladas perivasculares (Figura 1). Na estrutura sinusoidal, o espaço subendotelial de Disse separa os hepatócitos de endotélio sinusoidal e contém matriz de baixa densidade. Essa matriz subendotelial contém um entrelaçado de matriz extracelular que providencia um suporte celular, impedindo o transporte de solutos e fatores de crescimento (Figura 2A). Durante a injúria hepática, inicia a deposição de matriz extracelular, deteriorando a função do hepatócito (Figura 2B).

A cirrose surge como consequência da fibrose e do acúmulo de matriz extracelular, em resposta ao mecanismo de dano e cicatrização do fígado e envolve uma gama de tipos celulares e outros mediadores acometendo o tecido hepático (Friedman, 2008b).

As hepatites virais, predominantemente B e C, representam as maiores causas de fibrose hepática, juntamente com o consumo crônico de álcool. Muitos outros estímulos podem induzir a fibrose hepática, incluindo sobrecarga de ferro e cobre, consumo de drogas e obstrução biliar. A fibrose hepática é caracterizada pela deposição excessiva de proteínas na matriz extracelular na qual predomina o colágeno tipo I. O excesso de deposição de matriz extracelular rompe a arquitetura normal do fígado, provocando a injúria tecidual e a fibrose (Parsons, Takashima *et al.*, 2007).



**Figura 1:** Arquitetura sinusoidal e localização das células estreladas hepáticas (Friedman, 2003).



**Figura 2:** **A** ilustra a arquitetura sinusoidal normal com as células estreladas contendo gotículas de retinóides. **B** ilustra a multiplicação das células estreladas, o acúmulo de matriz extracelular e a perda das vilosidades e capilarização dos sinusóides (Friedman, 2003).

A cirrose é considerada o estágio mais avançado da fibrose, evidenciada pela a desestruturação do parênquima hepático associada ao aparecimento de septos e nódulos fibróticos, alterações no fluxo sanguíneo hepático, e risco de falência do fígado (Friedman, 2008b).

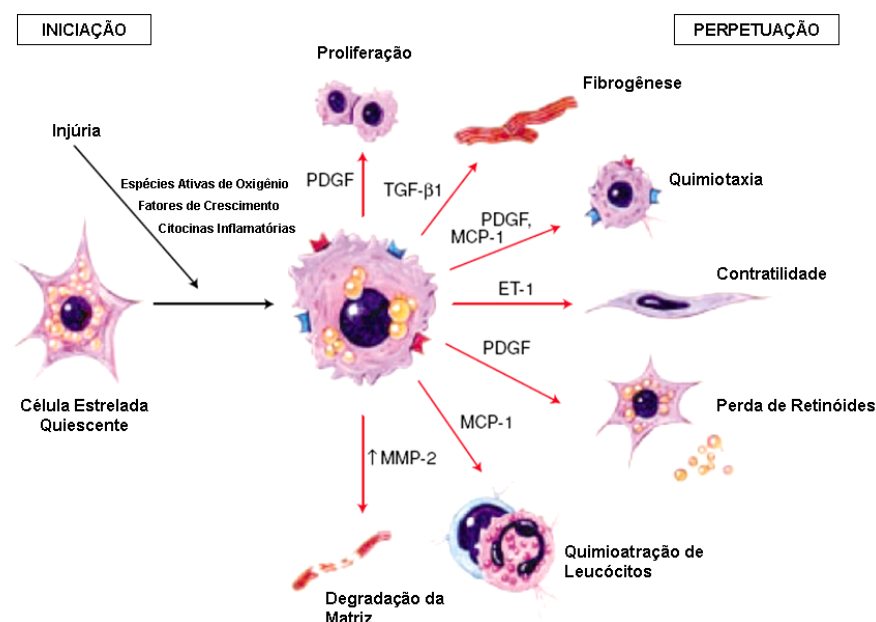
Mesmo considerando que a histopatologia e a fisiopatologia da cirrose variam de acordo com agente etiológico (álcool, vírus, toxinas, defeitos metabólicos, obstrução

biliar) o padrão histológico final do fígado é sempre o mesmo, um processo difuso caracterizado pela presença de fibrose e uma conversão da arquitetura do fígado normal em nódulos estruturais (Schiff, Sorrell *et al.*, 2003).

A resposta aos estímulos inflamatórios conduz a uma cascata de eventos por meio da ativação de células estreladas. Esses eventos favorecem a cicatrização celular através do aumento da proliferação celular, da contratilidade, da fibrogênese, da degradação da matriz e das sinalizações pró-inflamatórias (Friedman, 2008b).

As células estreladas, conhecidas como células de “Ito”, lipocíticas ou persinusoidais específicas do fígado, são encontradas em um estado quiescente no espaço de Disse, (entre os hepatócitos e os sinusóides) (Wake, 1971). Durante a agressão hepática crônica, as células estreladas diferenciam-se de um fenótipo miofibroblástico ativado que se caracteriza por acentuada proliferação e secreção de componentes de matriz extracelular (Blomhoff e Wake, 1991; Bissell, 1992).

A fisiopatologia da fibrose hepática ocorre através da ativação das células estreladas e apresenta duas fases (Figura 3):



**Figura 3:** Célula Estrelada Hepática em um processo de injúria do fígado. (Hui e Friedman, 2003).

**1ª) Fase da Iniciação:** Conhecida também como pré-inflamatória. É a fase em que ocorre mudança na expressão de genes e fenótipos, que levam a célula a produzir citocinas. Nessa fase, ocorre produção de fibronectina pela estimulação parácrina das células endoteliais, as quais ativam as células estreladas, e participam da conversão do fator de crescimento tumoral beta (TGF- $\beta$ ) latente na sua forma ativa. Ocorre também síntese de substâncias da matriz extracelular e proliferação celular a partir da estimulação parácrina das células de Kupffer. Há liberação de retinóides pelas células estreladas através da ação das citocinas (especialmente TGF- $\beta$ ) e formação de espécies reativas de oxigênio e peróxidos lipídios (Bilzer et al., 2006; Friedman, 2008a).

**2ª) Fase da perpetuação:** Nessa fase ocorre a perpetuação da ativação das células estreladas. Nela observam-se seis modificações celulares: proliferação quimiotaxia, fibrogênese, contratilidade, degradação da matriz e redução dos retinóides.

- **Proliferação:** Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é o mais potente mitógeno das células estreladas (Borkham-Kamphorst et al., 2007). Os receptores de PDGF (PDGF-R) possuem atividade intrínseca de tirosina cínase<sup>1</sup> e sua expressão é aumentada com a ativação de células estreladas (Lechuga, Hernández-Nazara *et al.*, 2006). Outros compostos com atividade mitogênica nas células estreladas e com papel potencial na fibrogênese incluem fator de crescimento vascular endotelial e seus receptores entre outros. A AKT, uma proteína com importante função na sinalização celular, é ativada pela estimulação do PDGF na fase de proliferação das células estreladas, favorecendo a expressão gênica de colágeno (Marra et al., 1998; Yoshiji et al., 2003; Parsons, Takashima *et al.*, 2007; Friedman, 2008).
- **Quimiotaxia:** Após o dano agudo ao fígado, o número de células estreladas é aumentado em áreas com infiltrado inflamatório (Geerts, Lazou *et al.*, 1991), e isso provavelmente é consequência tanto da proliferação como da migração de células estreladas. A capacidade de migrar pode ser mostrada nas células

---

<sup>1</sup> De acordo com o *Dicionário de Língua Portuguesa Houaiss*, há três formas de escrever a tradução do termo Kinase, sendo elas, quinase, cínase e cínase, sendo esta última, a forma preferencial para a língua portuguesa (Houaiss e Antonio, 2001).

estreladas quiescentes ou ativadas. Os quimioatraentes identificados são PDGF, proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e receptor CXCR3 (Friedman, 2008a).

- **Fibrogênese:** A fibrogênese surge em decorrência da estimulação das células estreladas pelo aumento da produção dos componentes da matriz extracelular, sendo o TGF- $\beta$  o maior estímulo para a produção do colágeno do tipo I, fibronectina e proteoglicanos, além do TGF- $\beta$ , outros fatores estimulam a produção do colágeno do tipo I, retinoides, interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e acetaldeído (Inagaki e Okazaki, 2007; Friedman, 2008a). A lipoperoxidação também é apresentada como importante indutor de deposição de matriz extracelular que pode estar relacionada à redução das defesas antioxidantes das células estreladas (Svegliati Baroni, D'ambrosio *et al.*, 1998; Pavanato, Tuñón *et al.*, 2003; Pereira-Filho, Ferreira *et al.*, 2008).
- **Contratilidade:** A contratilidade das células estreladas pode ser o maior determinante do aumento da resistência portal durante a fibrose hepática. As células estreladas ativadas impedem o fluxo do sangue portal por restringir os sinusoides, contraindo o fígado fibrótico, por ação da endotelina I (ET-1). A ET-1 e o óxido nítrico (NO) são os maiores reguladores da contratilidade das células estreladas, em adição ao crescimento de uma lista de mediadores que inclui o angiotensinogênio II, peptídeo atrial natriurético, somatostatina, monóxido de carbono, eicosanoides entre outros. As células estreladas ativadas apresentam também maior expressão da actina-alfa de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) a qual confere também maior contratilidade a essas células (Rombouts, Knittel *et al.*, 2002; Rockey, 2003; Friedman, 2008a)
- **Degradação da Matriz:** A fibrose reflete um equilíbrio entre a produção e a degradação da matriz celular. Dessa forma, a degradação da matriz é um evento chave no processo de formação da fibrose hepática. A destruição da matriz hepática normal pelas proteases que degradam a matriz acelera o processo de cicatrização, prejudicando a função celular. Esse processo de degradação da matriz é realizado pelas metaloproteinases (MMPs) que têm função de degradar

o colágeno tipo I, mais especificamente a MMP-1. A regulação da atividade das MMPs ocorre através dos inibidores das metaloproteinases (TIMPs). As células estreladas produzem TIMP-1 e TIMP-2, e a produção contínua dessas proteínas levaria a redução da degradação da matriz durante a injúria hepática. (Iredale, 2001; Murphy, Issa *et al.*, 2002; Friedman, 2008a).

- **Redução dos retinóides:** A ativação das células estreladas é acompanhada pela perda dos retinóides perinucleares. Em cultura, os retinóides são estocados como retinil éster, considerando que a forma de retinoide liberado pela célula é retinol, sugerindo que há hidrólise intracelular de ésteres antes da saída. Se a perda de retinoide é requerida para ativação das células estreladas, o tipo de retinoide que poderia acelerar ou prevenir a ativação não está esclarecido (Friedman, Wei *et al.*, 1993; Friedman, 2008b).

As células de Kupffer são macrófagos dotados de grande mobilidade que estão aderidos ao endotélio, realizam endocitose de micro-organismos e de eritrócitos, secretam uma série de fatores como TNF- $\alpha$ , interleucinas, colagenase e hidrolases lisossômicas (Brouwer, Barelds *et al.*, 1988). A ativação e a infiltração das células de Kupffer também apresentam um papel proeminente no mecanismo da fibrose hepática. O influxo dessas células coincide com a ativação das células estreladas. As células de Kupffer podem estimular a síntese de matriz, a proliferação celular e a liberação de retinóides pelas células estreladas através da ativação de citocinas e espécies ativas de oxigênio (Friedman, 2003).

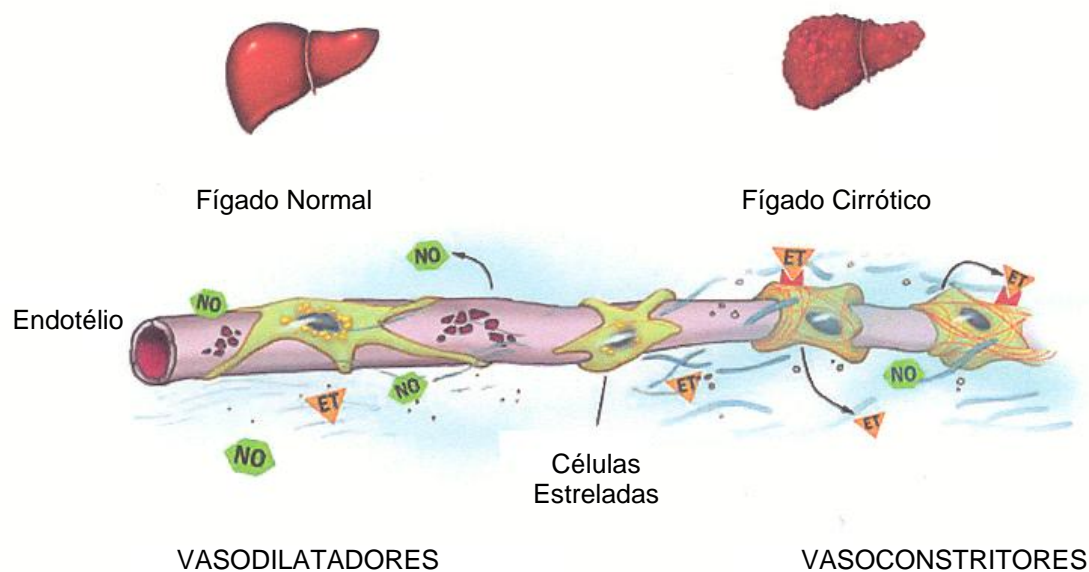
As células de Kupffer podem influenciar as células estreladas através da secreção de metaloproteinase 9 (MMP-9), que ativa o TGF- $\beta$  e, assim, estimula as células estreladas a produzirem o colágeno. A produção de NO pode ser influenciada pelas células de Kupffer e contrabalançar os efeitos das espécies ativas de oxigênio reduzindo a proliferação e a contratilidade das células estreladas (Friedman, 2003; Bilzer, Roggel *et al.*, 2006).

Além das células estreladas e das células de Kupffer, a vasculatura intra-hepática está diretamente relacionada com o processo de fibrogênese, apresentando componentes



celulares envolvidos na resistência vascular. As unidades microvasculares intra-hepáticas são formadas por vênulas portais, arteríolas hepáticas, sinusoides e vênulas centrais. Nesses locais, ocorre a modulação da resistência intra-hepática, assim como do fluxo sanguíneo. Nos sinusoides, as células endoteliais e as células estreladas têm sido identificadas como elementos celulares mais importantes na regulação da resistência. Por exemplo, o NO, liberado pelas células endoteliais, parece ter um efeito de relaxamento sobre as células estreladas (Mccuskey, 2000; Rockey, 2003).

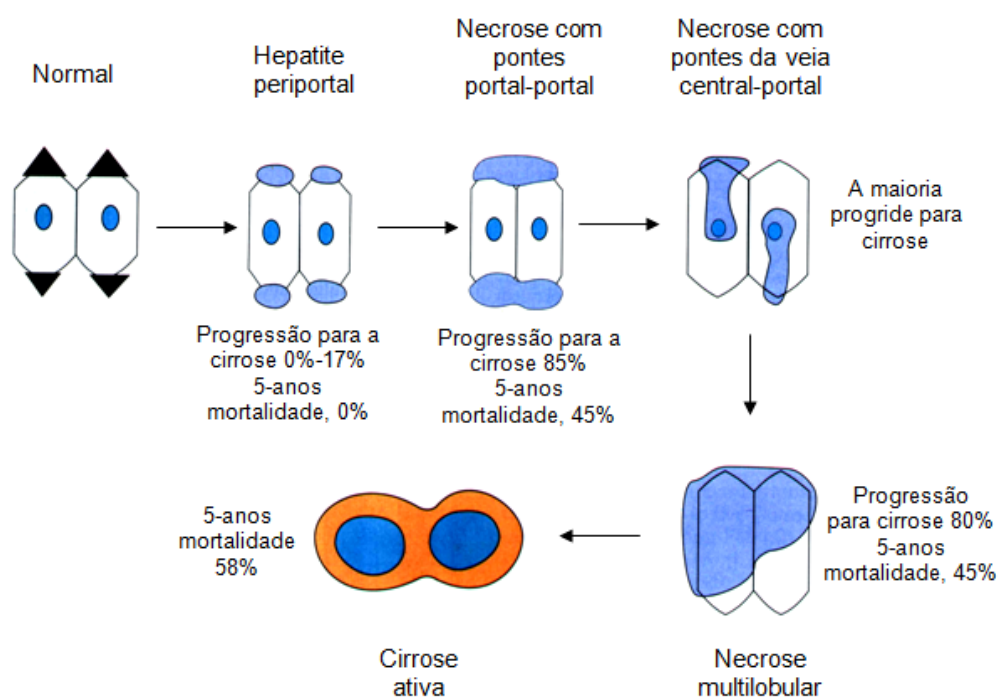
No fígado normal, ocorre equilíbrio entre as substâncias vasoconstritoras (ex: ET-1) e as substâncias vasodilatadoras (ex: NO). No entanto, no fígado injuriado, ocorre desequilíbrio dessas substâncias, com aumento da síntese de ET-1 e diminuição na produção de NO, levando o fígado à endoteliopatia. Nesse contexto, ocorre contratilidade aumentada das células estreladas, constrição sinusoidal, com aumento da resistência intra-hepática ao fluxo sanguíneo. Após a ativação das células estreladas, a expressão das proteínas do músculo liso é aumentada e as vias sinalizadoras são potenciadas. Além dos mediadores citados, existem outros, como a angiotensina II, prostanoídes, e monóxido de carbono, que podem também desempenhar um papel na endoteliopatia encontrada na cirrose. Finalmente, a disfunção endotelial pode estar presente nos compartimentos vasculares intra-hepáticos não sinusoidais (Rockey, 2003; Friedman, 2008a).



**Figura 4:** Endoteliopatia na circulação vascular intra-hepática (Rockey, 2003).

A presença de nódulos formados a partir dos septos de fibrose é condição essencial da cirrose. Os septos de fibrose podem envolver um lóbulo único, formando pontes de uma veia porta à outra, podem também atravessar o lóbulo, unindo a veia central à veia porta, para criar nódulos menores, ou ainda cercar muitos lóbulos para criar um nódulo maior. Na cirrose, são reconhecidas três categorias morfológicas, baseadas no tamanho dos nódulos cirróticos: O micronodular, em que os nódulos apresentam um diâmetro menor que 3 mm de diâmetro; o tipo macronodular, em que os nódulos apresentam tamanho maior que 3 mm de diâmetro e normalmente mostram variações no tamanho. O terceiro tipo, chamado misto, é formado por uma mistura padrão, do tipo micronodular e macronodular (Figura 5) (Schiff, Sorrell *et al.*, 2003).

A cirrose densa, com formação de nódulos e hipertensão portal, é considerada irreversível. A reversibilidade da cirrose pela regressão do processo fibrótico em inúmeros casos tem sido bem documentada (Bonis, Friedman *et al.*, 2001), ocorrendo após a abstinência alcoólica em cirrose desenvolvida por álcool ou em pacientes com hepatite C, que tenham respondido à terapia com interferon (Shiratori, Imazeki *et al.*, 2000).



**Figura 5:** Representação do hepatócito normal e as sucessivas etapas envolvidas para a progressão da cirrose estabelecida, citado por Pavanato, 2004 (Pavanato, 2004).

Pacientes com cirrose e hepatite B, tratados com lamivudina, demonstraram aparente regressão da cirrose (Wanless, Nakashima *et al.*, 2000). A regressão também ocorreu em modelos experimentais com obstrução de ducto biliar e por toxicidade induzida por tetracloreto de carbono quando submetidos ao mesmo tratamento (Zimmermann, Blaser *et al.*, 1994; Peres, Tuñón *et al.*, 2000; Pavanato, Tuñón *et al.*, 2003; Pereira-Filho, Ferreira *et al.*, 2008).

## 1.2 Cirrose Biliar Secundária

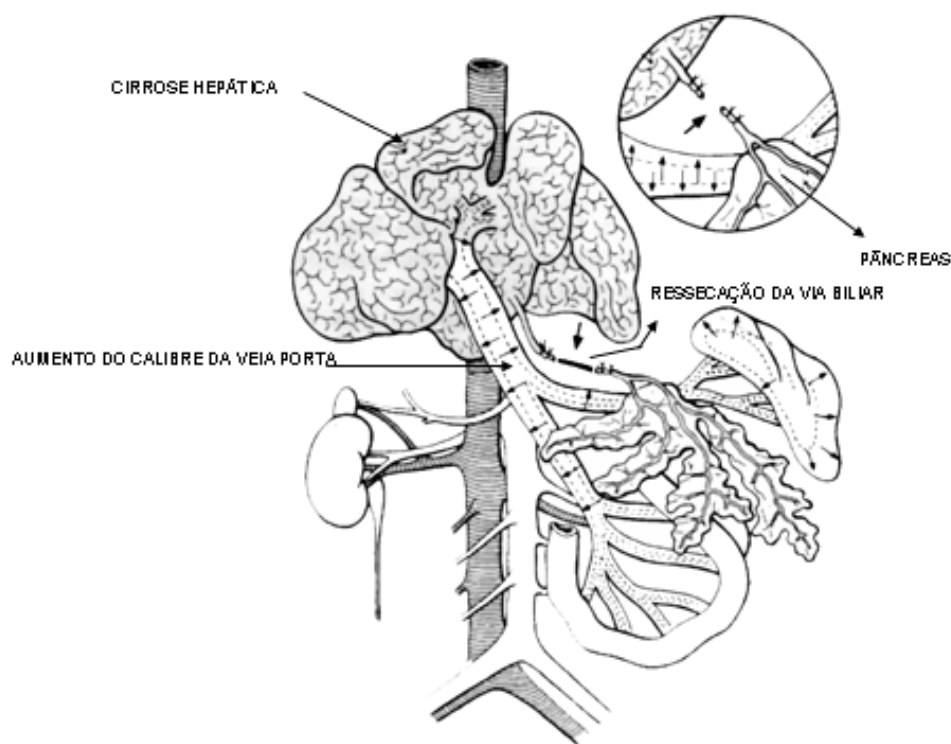
A cirrose biliar secundária é uma complicação tardia da obstrução prolongada das vias biliares extra-hepáticas ocorrendo em menos de um décimo de pacientes. Ocorre mais freqüentemente como consequência de obstrução por lesão benigna do que por neoplasia, em vista da curta sobrevivência dos pacientes no segundo caso. Por outro lado, tem sido mais observada em obstruções benignas não infectadas, talvez em vista do maior grau de obstrução. A infecção das vias biliares, uma vez instalada, parece acelerar a formação da cirrose. A duração da obstrução para o desenvolvimento da cirrose é, em geral, superior a um ano, embora, em circunstâncias menos frequentes, possa ser observada após três a quatro meses apenas (Silva e D'albuquerque, 1986).

A obstrução crônica da via biliar extra-hepática pode determinar estase biliar e áreas focais de necrose centrolobular, necrose periportal, proliferação e dilatação dos ductos e canaliculos biliares dos espaços porta, colangite estéril ou infecciosa com infiltração de polimorfonucleares e edema e fibrose dos espaços porta (Abdel-Aziz, Lebeau *et al.*, 1990).

O dano hepático colestático é característica da cirrose biliar secundária e se define com critérios histopatológicos específicos e bioquímicos bem estabelecidos. Naquelas condições em que a colestase de longa duração representa a principal causa de dano hepático, a acumulação de ácidos biliares tóxicos exerce papel fundamental na determinação da necrose e, portanto, da fibrose hepática (Parola, Leonarduzzi *et al.*, 1996; Pastor, Collado *et al.*, 1997; Orellana, Rodrigo *et al.*, 2000).

A citotoxicidade dos ácidos biliares é atribuída a diversos mecanismos, incluindo as suas propriedades detergentes, a alteração da homeostase do  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, a depleção de ATP e o dano mitocondrial. Trabalhos recentes sugerem que na patogênese do dano colestático hepático participam espécies ativas de oxigênio e reações de radicais livres (Parola, Leonarduzzi *et al.*, 1996).

A obstrução prolongada do ducto biliar em ratos é um modelo experimental para induzir cirrose biliar secundária e fibrose, sendo que se estabelecem as características próprias da patologia em torno de vinte e oito dias (Figura 6). Nesse período, a obstrução provoca uma dilatação do ducto biliar, edema, reações inflamatórias agudas pelo refluxo biliar e aparecimento de fibrose periportal devido a alterações na síntese e degradação de proteínas matriciais como o colágeno, as glicoproteínas e os proteoglicanos, causando uma desorganização da arquitetura natural do parênquima (Kountouras, Billing *et al.*, 1984; Pastor, Collado *et al.*, 1997; Peres, Tuñón *et al.*, 2000; Rezaei, Ardestani *et al.*, 2008).



**Figura 6:** Modelo de cirrose biliar secundária por ligadura de ducto biliar comum (Fernandes e Mies, 1998).

### 1.3 Síndrome Hepatopulmonar

Os pacientes com doenças crônicas do fígado podem apresentar sinais e sintomas como hemorragia digestiva, encefalopatia portossistêmica, ascite, eritema palmar e esplenomegalia (Agusti, Roca *et al.*, 1989). Alguns deles, 10 a 20%, apresentam complicações do sistema respiratório, como dispneia, platipneia (dispneia em ortostase), ortodéoxia (queda da saturação de oxigênio em ortostase), hipocratismo digital e cianose (Krowka e Cortese, 1994).

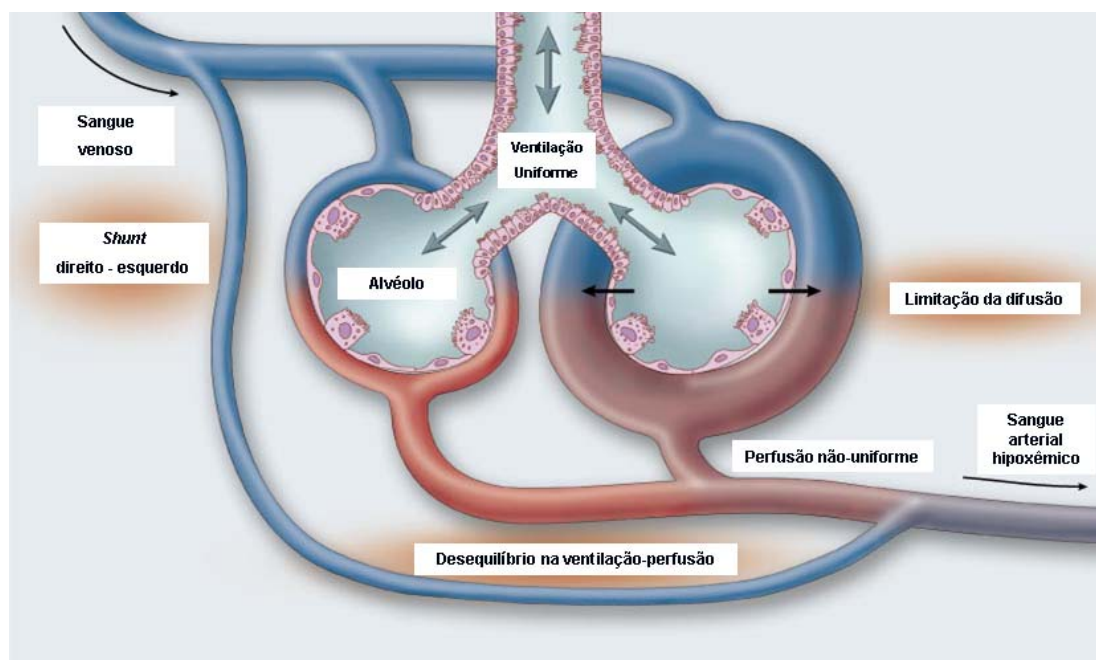
Alterações na função respiratória são achados comuns em pacientes que apresentam doença hepática crônica. As estimativas são tão altas que 50-70% dos pacientes queixam-se de dispnéia (Roberts, Arguedas *et al.*, 2007). O diagnóstico diferencial da dispneia nesses pacientes e suas causas devem ser sempre considerados. Nos últimos quinze anos, as anormalidades vasculares pulmonares foram reconhecidas cada vez mais como entidades clínicas importantes que influenciam a sobrevivência do candidato ao transplante hepático (Fallon e Abrams, 2000; Huffmyer e Nemergut, 2007).

As consequências hemodinâmicas das doenças do fígado, na circulação sistêmica e pulmonar, incluem ainda insuficiência cardíaca, causada por *shunt* arteriovenoso hepático, hipertensão pulmonar plexogênica, cardiomiopatia e síndrome hepatopulmonar. A anormalidade vascular mais comum é a síndrome hepatopulmonar (SHP), que ocorre quando a vasodilatação intrapulmonar prejudica a oxigenação arterial (Naschitz, Slobodin *et al.*, 2000; Rodríguez-Roisin e Krowka, 2008).

O termo “síndrome hepatopulmonar” (SHP) foi usado pela primeira vez no ano de 1977 para descrever o que hoje é reconhecido como dilatação microvascular, resultando no desequilíbrio da oxigenação arterial, em presença de doença hepática (Lange e Stoller, 1995).

A SHP é definida como um defeito na oxigenação arterial, induzida por dilatações vasculares intrapulmonares, associada a doenças hepáticas. O componente vascular característico da SHP inclui capilares pulmonares dilatados, difusos ou

localizados e, menos comumente, comunicações pleurais e comunicações arteriovenosas pulmonares. A fisiopatologia da hipoxemia na SHP é multifatorial. Os mecanismos predominantes incluem *shunt* intrapulmonar, comprometimento da relação ventilação-perfusão, baixa difusão, desequilíbrio da difusão-perfusão ou do gradiente de oxigenação alvéolo-capilar (Figura 7) (Aboussouan e Stoller, 2000; Rodríguez-Roisin e Krowka, 2008).



**Figura 7:** Fisiopatologia da SHP (Rodríguez-Roisin e Krowka, 2008).

A SHP caracteriza-se por uma tríade que consiste em doença hepática ou hipertensão portal, aumento do gradiente alvéolo-capilar no ar ambiente e dilatações vasculares intrapulmonares, na ausência de doença pulmonar ou cardíaca coexistente, as quais podem resultar em concentrações arteriais de oxigênio abaixo da normalidade, levando a alterações sistêmicas (Rodríguez-Roisin e Krowka, 2008).

As anormalidades na troca gasosa são caracterizadas pela desoxigenação. A *European Respiratory Society (ERS) Task Force* propõe o seguinte estagiamento da severidade da SHP baseado na determinação da  $PaO_2$  (Rodríguez-Roisin, Krowka *et al.*, 2004).

1. Média: PaO<sub>2</sub> >80 mmHg
2. Moderada: PaO<sub>2</sub> <80 a 60 mmHg
3. Severa: PaO<sub>2</sub> <60 a 50 mmHg
4. Muito Severa: PaO<sub>2</sub> <50 mmHg

Krowka e colaboradores, em 1993, propuseram dois padrões radiográficos para SHP, baseando-se nas características angiográficas: tipo 1, ou padrão mínimo, caracterizado por microdilatações difusas, e tipo 2, que é caracterizado por discretas e localizadas comunicações arterio venosas. O padrão tipo 1 pode estar associado à hipoxemia severa e à ortodeóxia, porém tem boa resposta à oxigenioterapia a 100%, e o tipo 2 responde pobremente à oxigenioterapia (Krowka, Dickson et al., 1993).

O mecanismo da vasodilatação intrapulmonar não é bem definido. Muitas hipóteses têm sido consideradas, tais como desequilíbrio entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras no pulmão (Aboussouan e Stoller, 2000).

Vários mediadores humorais têm sido propostos como os vasodilatadores circulantes responsáveis pela SHP. Entre eles, estão incluídos prostaglandinas, glucagon, substância P, peptídio atrial natriurético, fator de ativação plaquetário e NO (Panos e Baker, 1996).

Experimentalmente, o modelo de ligadura de ducto biliar é o único modelo que identifica as características da síndrome hepatopulmonar (Fallon, Abrams *et al.*, 1997; Tieppo, Vercelino *et al.*, 2005; Vercelino, Tieppo *et al.*, 2008). Fallon e colaboradores (1997) demonstraram que a ligadura de ducto biliar é modelo ideal para o estudo da SHP, com os animais cirróticos a partir de quatro semanas, quando já apresentam hipoxemia e vasodilatação intrapulmonar. O gradiente alvéolo-capilar apresenta diferença superior a 100% e é acompanhado de hipoxemia, com valores inferiores a 85 mmHg, quando comparado ao grupo controle. Esses achados foram associados à vasodilatação intrapulmonar, atribuída aos elevados valores na expressão eNOS no pulmão de ratos cirróticos (Fallon, Abrams *et al.*, 1997; Tang, Luo *et al.*, 2007)

Um grupo de pesquisadores franceses relacionou o aumento de NO à translocação bacteriana, que ocorre em 45-75% dos animais cirróticos induzidos

experimentalmente. Essa translocação bacteriana favorece a entrada de bactérias e endotoxinas na circulação pulmonar, gerando acúmulo de macrófagos no endotélio, os quais secretam produtos para o meio extracelular, incluindo citocinas e NO, que, em altas quantidades, tornam-se uma fonte altamente tóxica e oxidante (Thannickal e Fanburg, 2000; Rabiller, Nunes *et al.*, 2002). Foi demonstrado que animais cirróticos por ligadura de ducto biliar, que apresentavam hipoxemia e vasodilatação, também apresentavam aumento da lipoperoxidação no tecido pulmonar, provavelmente devido à ação oxidativa de radicais livres e do NO em altas concentrações na circulação pulmonar (Tieppo, Vercelino *et al.*, 2005; Vercelino, Tieppo *et al.*, 2008).

Recentes estudos indicam que a translocação bacteriana aumenta a produção TNF- $\alpha$  em cirrose (Wiest, Das *et al.*, 1999; Genesca, Marti *et al.*, 2003). Experimentos desenvolvidos por Luo e colaboradores (Luo, Liu *et al.*, 2004) evidenciam a participação do TNF- $\alpha$  no desenvolvimento das anormalidades vasculares pulmonares no modelo experimental de SHP. O aumento dessa citocina em plasma de ratos com ligadura de ducto biliar comum está relacionado à redução da *clearance* hepática e ao aumento da translocação bacteriana nesse modelo, provocando, assim, o desenvolvimento da SHP.

## 1.4 Equilíbrio Redox e Rotas de Sinalização Celular

### 1.4.1 Estresse Oxidativo e Nitrosativo

O oxigênio ( $O_2$ ) é um elemento vital e também é potencialmente nocivo. Em certas condições, é responsável por reações químicas muito tóxicas para as células (Boveris e Chance, 1973; Llesuy, 2002).

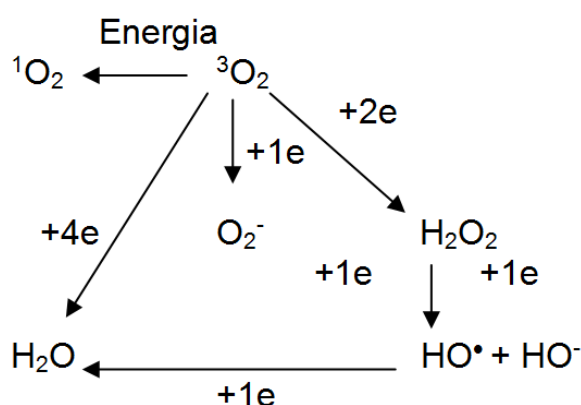
A molécula de oxigênio, em seu estado natural, é um birradical, possui dois elétrons desemparelhados. Além de ser um bom agente oxidante, é capaz de oxidar outros átomos ou moléculas aceitando um par de elétrons (Figura 8) (Llesuy, 2002).

Os intermediários da redução parcial do oxigênio são ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), *oxigênio singlet* ( $^1O_2$ ) e radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ). Todos



são denominados espécies ativas de oxigênio, por serem capazes de existir de forma independente (Llesuy, 2002).

Os efeitos deletérios do oxigênio sobre os organismos aeróbios variam, consideravelmente, com a espécie do organismo, com a idade, com o estado fisiológico e com a dieta. Os diferentes tecidos de um mesmo animal também podem ser afetados de formas diferentes. Esses efeitos ocorrem devido a elevada produção de radicais livres ou de espécies ativas de oxigênio (Farber, Kyle *et al.*, 1990).



**Figura 8:** Esquema de produção das espécies ativas de oxigênio (Llesuy, 2002).

O radical livre de oxigênio é uma espécie química capaz de existir de forma independente e contém um ou mais elétrons desemparelhados. A presença de um elétron desemparelhado confere às espécies caráter paramagnético, alto grau de reatividade química e curta vida média (Halliwell e Gutteridge, 1999; Valko, Leibfritz *et al.*, 2007).

Os radicais podem ser formados durante o metabolismo normal de toda a célula, pela perda de elétrons de um não radical ou pelo ganho de um elétron por não radical. Eles podem também ser formados quando uma ligação covalente é quebrada, se cada um dos átomos ficar com um elétron, em um processo conhecido como fissão homolítica (Halliwell e Gutteridge, 1999).

As espécies ativas de oxigênio (EAO), tais como  $\text{O}_2^{\bullet -}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $^1\text{O}_2$  e  $\text{OH}^{\bullet}$  e outros, podem ter origem endógena e exógena. As principais fontes endógenas de geração das espécies ativas de oxigênio são peroxissomos, NADPH oxidase, xantina oxidase, mito-

côndria e citocromo P-450. Como vias exógenas, podem ser citadas radiação- $\gamma$ , cigarro e solventes orgânicos (Llesuy, 2002).

A excessiva formação endógena de radicais livres pode ser causada por (1) ativação aumentada de fagócitos; (2) interrupção dos processos normais de transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial; (3) aumento da concentração de íons metálicos de transição por escape do grupamento heme de proteínas em locais de lesão ou doenças metabólicas; e (4) por níveis diminuídos das defesas antioxidantes. Entretanto, torna-se difícil determinar se, na doença humana, os radicais livres são a causa ou potencializam o dano patológico (Halliwell e Gutteridge, 1999; Dröge, 2002).

Por outro lado, as EAO são reconhecidas como importantes sinalizadoras intracelulares e estão envolvidas na regulação redox no interior das células do sistema imune (Halliwell, 2007; Oktyabrsky e Smirnova, 2007). Sabe-se que células fagocitárias, como macrófagos e neutrófilos, são ativadas sob condições oxidativas. Essa ativação é mediada pelo sistema da NADPH oxidase que resulta em marcado incremento no consumo de oxigênio e conseqüente produção de  $O_2^{\bullet-}$ . A ativação da NADPH oxidase pode ser induzida por lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e citocinas, como interfeiron-gama ( $IFN-\gamma$ ),  $IL-1\beta$  e  $TNF-\alpha$  (Figura 9) (Dröge, 2002).

O  $O_2^{\bullet-}$  é convertido em  $H_2O_2$  pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Essa enzima possui duas isoformas denominadas cobre-zinco-SOD e manganês-SOD, uma constitutiva e outra induzível, respectivamente (Halliwell, 2007).

Em presença de íons ferro ( $Fe^{2+}$ ) ou outros metais de transição, o  $O_2^{\bullet-}$  e o  $H_2O_2$  são convertidos, via reação de Fenton, o  $HO^{\bullet}$ , que é provavelmente responsável pela toxicidade celular associada às espécies ativas de oxigênio. Quando formado o  $HO^{\bullet}$ , ele rapidamente reagirá com a molécula mais próxima, que pode ser com lipídeos, proteínas ou bases de DNA. Isso acontece porque a taxa constante de reação do  $HO^{\bullet}$ , é bastante alta quando comparada às outras espécies reativas ( $k > 10^9 M^{-1}s^{-1}$ ) (Halliwell, 2007).

O óxido nítrico (NO) é uma espécie radicalar diatômica encontrada endogenamente nos mamíferos, responsável por uma grande gama de ações biológicas

importantes e amplamente estudadas desde a sua descoberta, como fator de relaxamento derivado do endotélio (Ignarro, Buga et al., 1987). Além de desempenhar um papel chave no controle da pressão sanguínea, através da regulação do relaxamento do músculo liso (Wanstall, Jeffery et al., 2001), o NO também regula a adesão plaquetária (Tziros e Freedman, 2006), a agregação de neutrófilos (Forsslund, Nilsson et al., 2000) e a citotoxicidade de macrófagos (Billack, 2006), além de estar envolvido na neurotransmissão (Lüth, Münch et al., 2002).

O NO é sintetizado pela enzima intracelular NO sintase (NOS), através da oxidação da L-arginina, que produz citrulina e NO. As três principais isoformas da NOS até agora identificadas são a NOS1 (também conhecida como nNOS, por ter sido inicialmente isolada de tecido neuronal), NOS2 (ou iNOS), que é induzível por citocinas inflamatórias, endotoxinas, hipóxia e estresse oxidativo, e NOS3 (ou eNOS) predominante no endotélio. A nNOS e a eNOS são expressas constitutivamente e são por isso denominadas como NOS constitutivas (cNOS) (Nathan e Xie, 1994).

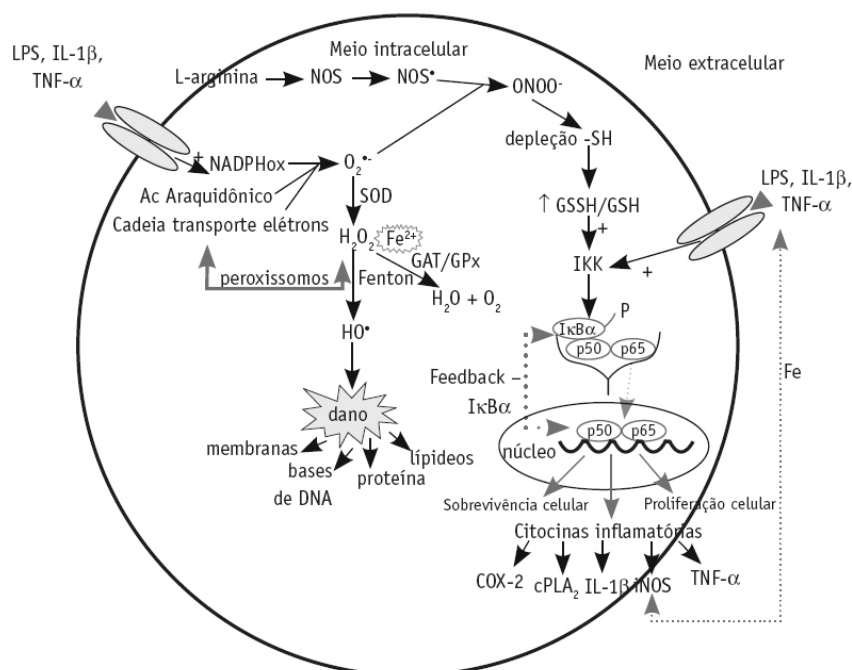
Devido ao fato de o ambiente celular e plasmático conter espécies reativas que podem rapidamente inativar o NO livre, em contraste à meia-vida relativamente longa do fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), foi considerado que o NO é estabilizado por uma molécula transportadora que prolonga a sua meia-vida e conserva sua atividade biológica. Em condições normais, o NO é produzido em baixas concentrações e atua como citoprotetor, podendo interagir com os metais de transição e com outros radicais (Salvemini, Doyle *et al.*, 2006; Halliwell, 2007).

A produção exagerada de espécies ativas de nitrogênio é chamada de estresse nitrosativo. Isso pode ocorrer quando a geração de espécies reativas de nitrogênio em um sistema excede a habilidade do sistema em neutralizá-las e eliminá-las (Valko, Leibfritz *et al.*, 2007).

O  $O_2^{\bullet-}$  pode reagir com NO formando o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), uma espécie ativa de nitrogênio. A adição de  $ONOO^-$  às células, aos tecidos e aos fluidos corporais leva à rápida protonação, podendo resultar depleção de grupos-SH e outros antioxidantes, oxidação e nitração de lipídeos, quebra de DNA, nitração e desaminação de bases de DNA (especialmente a guanina). A nitração em resíduos de tirosina é

amplamente usada como um biomarcador da geração de  $\text{ONOO}^-$  *in vivo*. Nesse sentido, tem sido considerada um importante instrumento para estudo do estresse nitrosativo em doenças humanas, ainda que não seja um biomarcador específico para  $\text{ONOO}^-$  (Dröge, 2002; Salvemini, Doyle *et al.*, 2006; Halliwell, 2007).

Dentre as espécies de oxigênio e nitrogênio, o  $\text{ONOO}^-$  é capaz de depletar os grupamentos -SH e, com isso, alterar o balanço redox da glutatona no sentido do estresse oxidativo. Esse desequilíbrio no estado redox induz por regulação redox o inibidor kappa cínase (IKK) a fosforilar o inibidor kappa-B (I $\kappa$ B), possibilitando a translocação do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B) para dentro do núcleo, levando à transcrição de diversos mediadores inflamatórios (Figura 9) (Bitencoutt, 2007; Filippin, Vercelino *et al.*, 2008).



**Figura 9:** Formação de espécies ativas de oxigênio e nitrogênio (Filippin, Vercelino *et al.*, 2008).

Se, por um lado, altas concentrações de espécies ativas de oxigênio estão envolvidas na ativação do NF- $\kappa$ B com a manutenção do processo inflamatório atuando como agente causal de dano a macromoléculas, por outro, sugere-se que baixas concentrações de espécies ativas de oxigênio participem na regulação de diferentes funções nas células eucarióticas, tais como proliferação, biossíntese de hormônios, quimiotaxia, explosão oxidativa, apoptose e outras (Hwang e Kim, 2007; Oktyabrysky e

Smirnova, 2007). Atualmente, sabe-se que espécies reativas podem contribuir na ativação das caspases, tanto por via intra quanto extracelular, levando à apoptose (Halliwell, 2007).

#### 1.4.2 Proteínas Cínase ativadas por Mitógenos

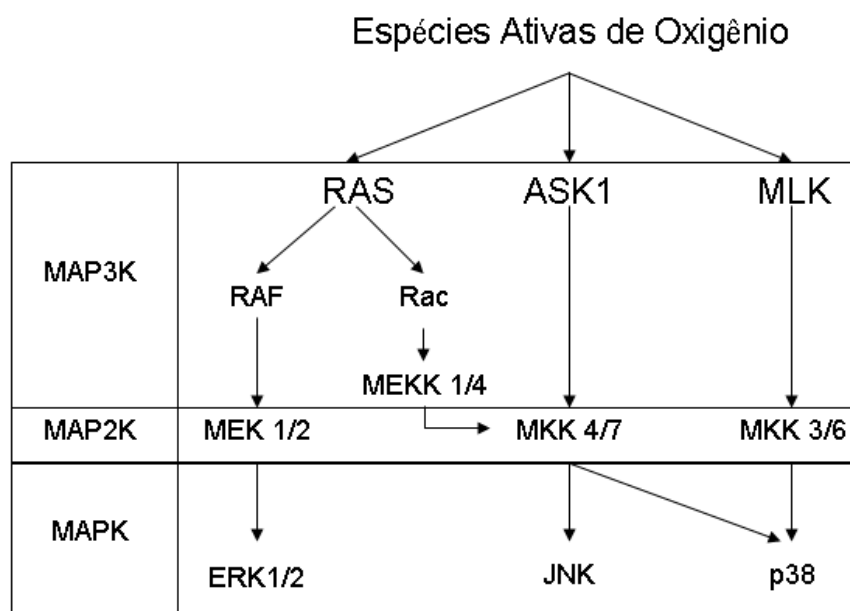
Provavelmente o efeito mais significativo das espécies ativas de oxigênio esta na ativação das rotas de sinalização nas proteínas cínase ativada por mitógenos (MAPKs). As MAPK são subfamília de proteínas específicas de serina/treonina que respondem a estímulos extracelulares e regulam várias atividades celulares, como expressão gênica, mitose, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose (Sun e Oberley, 1996).

São conhecidos três grupos principais de MAPK cínase reguladora de sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2), cínase do N-terminal do c-Jun (JNK) e proteína cínase ativada por mitógeno p38 (p38) (Pearson, Robinson *et al.*, 2001; Kaminska, 2005).

O estímulo inflamatório, causado por citocinas e fatores de crescimento, assim como a produção exagerada de EAO podem desencadear e ativar a cascata das MAPKs. Essa cascata é ativada por cínases que se consistem de uma ou mais cínases em séries: **MAPK kinase kinase** (MAP3K) ativa **MAPK kinase** (MAP2K) que então ativa a MAPK (Figura 10) (Lawrence, Jivan *et al.*, 2008).

Estudos experimentais acerca da regulação positiva das MAPKs através da administração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> têm mostrado que a ativação de cada rota de sinalização depende do tipo específico de estímulo. Por exemplo, é relatado que a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por dano celular induz a ativação tanto da ERK1/2 como p38 (Iles e Forman, 2002). A rota da ERK1/2 está mais comumente associada à regulação da proliferação celular (Valko, Leibfritz *et al.*, 2007). Está bem documentado o envolvimento do estresse oxidativo na ativação da ERK1/2 em diversos tecidos, como cardíaco, hepático, respiratório e outros (Jiménez, Zanella *et al.*, 1997; Xiao, Pimentel *et al.*, 2002; Conde De La Rosa, Schoemaker *et al.*, 2006). A ERK1/2 é ativada pela MEK (**MAP/ERK Kinase**) que fica imediatamente acima dela na rota de sinalização (Crews e Erikson, 1993; Burgering, De Vries-Smits *et al.*, 1993; Mccubrey, Lahair *et al.*, 2006; Ramos, 2008).

A JNK apresenta uma rota similar à da ERK1/2. As MAP2K que resultam na ativação da JNK são a MKK 4/7, que são cínases específicas que fosforilam a JNK (Davis, 1999; Yoshizawa, Ueda, Masutani *et al.*, 2002; Mccubrey, Lahair *et al.*, 2006; Matsuzawa e Ichijo, 2008).



**Figura 10:** Rota de ativação das MAPKs. MAPK: proteína cínase ativada por mitógenos; MAP2K: MAPK cínase; MAP3K: MAPK cínase cínase; RAS, RAF e Rac: proteínas de sinalização celular; ASK1: cínase-1 reguladora do sinal de apoptose; MLK: cínase de linhagem mista; MEKK1/4: proteína cínase ativada por mitógenos *cínase cínase cínase* 1 e 4; MEK1/2: MAP/ERK cínase 1 e 2; MKK3/6: proteína cínase ativada por mitógenos *cínase cínase* 3 e 6; MKK4/7: proteína cínase ativada por mitógenos *cínase cínase* 4 e 7; ERK1/2: cínase reguladora de sinal extracelular 1 e 2, JNK : cínase do N-terminal do c-Jun e p38: proteína cínase ativada por mitógeno p38 (Valko, Leibfritz *et al.*, 2007).

O mecanismo de ativação da p38 é muito similar ao mecanismo da JNK, porque os mesmos sinais podem ativar tanto a rota da p38 como da JNK. As espécies ativas de oxigênio podem estimular também a cínase de linhagem mista (MLK), que ativa MKK 3/6, ativando a p38 (Guyton, Liu *et al.*, 1996; Lander, Jacovina *et al.*, 1996; Schieke, Briviba *et al.*, 1999; Zhuang, Demirs *et al.*, 2000; Mccubrey, Lahair *et al.*, 2006).

A ERK, a JNK e a p38 demonstram ser ativadas em resposta ao estado redox intracelular e ao estresse oxidativo e potencialmente contribuem para sobrevivência ou morte celular (Matsuzawa e Ichijo, 2008).

### **1.4.3 Antioxidantes Enzimáticos**

O organismo, a fim de proteger-se contra os danos oxidativos, desenvolveu inúmeras estratégias, como a prevenção da formação dos radicais livres através dos antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos) capazes de neutralizar o estresse oxidativo (Llesuy, 2002).

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações – comparadas àquelas de um substrato oxidável – atrasa significativamente ou impede a oxidação daquele substrato (o termo oxidável inclui macromoléculas tais como proteínas, lipídios, hidrato de carbono e DNA). A função desses compostos é manter os níveis intracelulares de espécies ativas de oxigênio em baixas concentrações e, para isso, atuam prevenindo a formação dessas espécies ou combatendo-as uma vez que tenham sido formadas (Repetto e Llesuy, 2002)

Os antioxidantes enzimáticos compreendem agentes que cataliticamente removem os radicais livres e outras espécies ativas, como as enzimas SOD, catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx); proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes, como íons ferro e cobre ou como transferinas e hepatoglobinas; proteínas que protegem biomoléculas contra dano por outros mecanismos, como proteínas de choque térmico; e substâncias de baixo peso molecular que combatem espécies ativas de oxigênio e espécies ativas de nitrogênio como glutathione,  $\alpha$ -tocoferol, ácido úrico, bilirrubina e outros (Halliwell, 2007).

O sistema antioxidante é constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos, que atuam conjuntamente na proteção celular. O sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do  $O_2^{\bullet-}$  e do  $H_2O_2$ ,

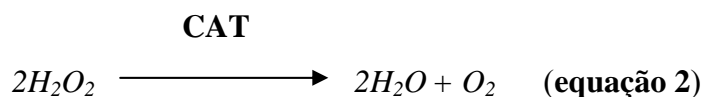
Existem, também, as defesas secundárias que impedem a propagação da lipoperoxidação e as terciárias, enzimas de reparo de danos já instalados (Yu, 1994).

Quando a substância age neutralizando as espécies ativas de oxigênio na fase de iniciação ou propagação da lipoperoxidação, levando à formação de um composto menos reativo, é chamada de *scavenger*. Ao passo que, se a substância antioxidante tiver a propriedade de absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os, é denominada de *quencher* (Sies e Murphy, 1991).

A SOD tem por principal função atuar na dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , sendo que o primeiro é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas (**equação 1**). Essa enzima pode ser classificada em três grandes grupos, segundo o metal que se encontra presente no sítio ativo: a Cu-ZnSOD, localizada no citosol; a SOD-mangânês, presente na matriz mitocondrial e a FeSOD existente somente nos procariontes e plantas (Chance, Sies *et al.*, 1979).



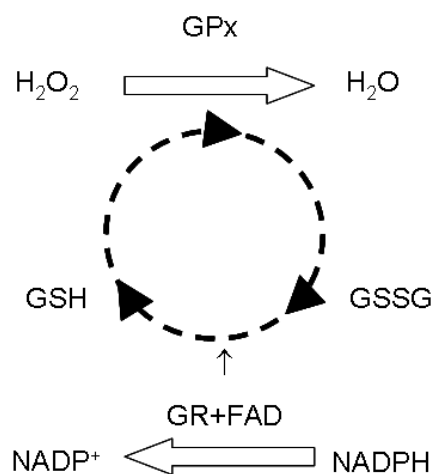
Os produtos finais da dismutação são o peróxido de hidrogênio e o oxigênio. O  $H_2O_2$ , apesar de não ser um radical, facilmente reage, originando o radical hidroxila. A remoção dos peróxidos ocorre por meio das enzimas CAT e da GPx, tendo a CAT mais afinidade ao peróxido de hidrogênio, de metila e etila, enquanto a GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos (Llesuy, 2002). A ação da CAT sobre o peróxido é apresentada na **equação 2**.



Entre as peroxidases, que geralmente usam o grupo heme, sobressai-se a atividade da GP<sub>x</sub>, que se localiza no citosol e na matriz mitocondrial. Ela catalisa a redução do peróxido de hidrogênio, através da oxidação da glutationa reduzida (GSH). Para reestabelecer a glutationa oxidada (GSSH) à reduzida, é necessário que a



glutationa redutase (GR) promova a regeneração da GSSH, consumindo NADPH (Figura 11)(Halliwell e Gutteridge, 1999).



**Figura 11:** Esquema adaptado de interação do sistema glutatona. GPx: glutatona peroxidase;  $H_2O_2$ : peróxido de hidrogênio;  $H_2O$ : água; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; GR: glutatona redutase; FAD: flavina-adenina dinucleótido;  $NADP^+$ : fosfato de dinucleótido de nicotinamida-adenina; NADPH: fosfato de dinucleótido de nicotinamida-adenina reduzido (Halliwell, 1999).

#### 1.4.4 Antioxidantes Não Enzimáticos

O sistema de defesa não-enzimático é formado pelos antioxidantes hidrossolúveis e antioxidantes lipossolúveis. Os antioxidantes hidrossolúveis são compostos que têm alta afinidade por água, podemos citar, entre eles, a glutatona (GSH), o ácido úrico e o ácido ascórbico (vitamina C). Os antioxidantes lipossolúveis são compostos que têm alta afinidade com lipídios e podemos citar, entre eles, os carotenóides, o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e a bilirrubina.

A glutatona é um tripeptídeo,  $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina é um tiol de peso molecular baixo (PM= 307,3), sendo mais abundante nas células de mamíferos. A concentração intracelular é, aproximadamente, 0,5 mM, mas, às vezes, alcança níveis tão altos como 10 mM. A concentração intracelular de GSH pode manter-se em estado

reduzido pela ação da enzima glutathiona redutase (GR) que requer a presença de NADPH (Yu, 1994).

O GSH tem várias funções no metabolismo, no transporte, na catálise (atuando como cofator para a família de enzimas do tipo peroxidase). Está envolvido no metabolismo do ácido ascórbico, na comunicação intercelular, prevenindo a oxidação e as ligações cruzadas dos grupos-SH das proteínas, da cisteína e da coenzima A. Parece participar no transporte intracelular de cobre, quelando os íons  $\text{Cu}^{2+}$  e diminuindo a sua disponibilidade para gerar radicais livres. É um agente radioprotetor e cofator para várias enzimas em diferentes rotas metabólicas, incluindo as enzimas envolvidas na síntese dos leucotrienos. Intervém também em vias enzimáticas (GSH-S-transferases) e não enzimáticas de detoxificação de xenobióticos. É importante também na degradação de proteínas que contêm pontes S-S, como a insulina. A sua função mais importante é a proteção que exerce frente ao dano oxidativo, causado pelas espécies reativas de oxigênio, geradas durante o metabolismo normal das células. O GSH pode reagir por via não enzimática com essas espécies. *In vitro*, o GSH pode reagir com o radical  $\text{HO}^\bullet$ , o  $\text{HOCl}$ , o radical  $\text{RO}^\bullet$ , o radical  $\text{RO}_2^\bullet$  e  $^1\text{O}_2$  (Halliwell, 2007).

O ácido ascórbico apresenta muitas propriedades antioxidantes, entre elas, a capacidade de neutralizar o  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$ ,  $\text{HO}^\bullet$  e de regenerar a vitamina E. Além disso, pode atuar como pró-oxidante quando se encontra em concentrações aproximadamente iguais a 1mM. Nessa concentração, o ácido ascórbico pode reduzir o  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , sendo esse último um potente indutor da reação de Fenton. A concentração e a localização intracelular do ácido ascórbico pode ser fator decisivo na atividade dessa vitamina como oxidante ou antioxidante (Halliwell, 2007).

Os  $\beta$ -carotenos têm sido considerados como antioxidantes porque apresentam a capacidade de neutralizar radicais. Protegem os lipídios da peroxidação porque neutralizam as espécies ativas de oxigênio, principalmente o  $^1\text{O}_2$ . *In vivo*, apresentam uma atividade antioxidante eficiente porque podem inibir a peroxidação lipídica induzida pelo sistema da xantina oxidase. *In vitro* podem atuar também como oxidantes, dependendo da pressão parcial de  $\text{O}_2$  (Krinsky, 1989).

O  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) encontra-se em altas concentrações em muitos tecidos, em nível intracelular, está associado às membranas ricas em lipídios, como nas membranas mitocondriais e do retículo endoplasmático. Pode reagir tanto com lipoperóxidos como com radicais alcoxil, sendo um protetor efetivo da peroxidação lipídica de membranas biológicas. A vitamina E neutraliza o  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ou o  $\text{HO}_2^{\bullet}$  e reage com o  $\text{HO}^{\bullet}$  (Landvik, Diplock *et al.*, 2002).

A bilirrubina é o produto do catabolismo das hemoproteínas, está presente no sangue e nos tecidos. É um antioxidante que bloqueia as reações em cadeia, reagindo com radicais peroxil, neutralizando os oxidantes (Halliwell, 2007).

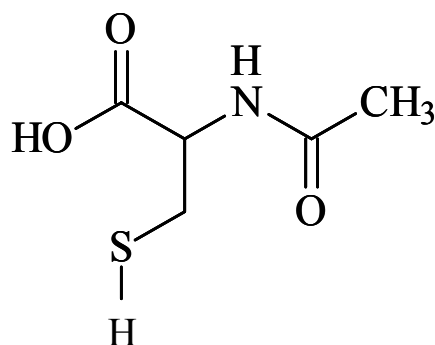
#### 1.4.5 N-Acetilcisteína

A N-acetilcisteína (NAC) é um composto tiólico que contém um grupo sulfidril formado pela seguinte fórmula química  $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}$  (Figura 12). Seu peso molecular é igual a 163,2 e é amplamente usado na clínica médica (Ziment, 1988).

A NAC é um mucolítico que teve suas primeiras aplicações no tratamento de doenças congestivas e obstrutivas pulmonares associadas à hipersecreção. A NAC também é usada no tratamento de intoxicação aguda por acetoaminofen e, atualmente, é utilizada no tratamento da síndrome da angústia respiratória no adulto e, em casos de imunodeficiência adquirida, na infecção por HIV (Särnstrand, Tunek *et al.*, 1995). Além destas aplicações, a NAC também é utilizada no câncer, doenças cardiovasculares e na intoxicação por metais (Kelly, 1998; Zafarullah, Li *et al.*, 2003).

Sua atividade antioxidante é dada principalmente por dois mecanismos:

- 1 – reduzir diretamente o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a espécies menos reativas formando radicais sulfúricos ou cisteína;
- 2 – promover a biossíntese de GSH que funciona como *scavenger* de radicais livres ou como substrato no ciclo redox da glutatona (Aruoma, Halliwell *et al.*, 1989).



**Figura 12:** Fórmula química da N-acetilcisteína.

Sua ampla utilização é justificada pelo fato de que NAC possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Cotgreave, 1997) e oferece proteção contra endotoxemia mediada pela administração de lipossacarídeo (LPS), observando diminuição de  $H_2O_2$ , e isso estaria diretamente relacionado à sua capacidade de reduzir espécies ativas de oxigênio, mais do que à sua função de promover a biossíntese de glutatona (Sprong, Winkelhuyzen-Janssen *et al.*, 1998).

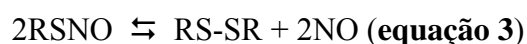
Muitos trabalhos têm demonstrado os efeitos da NAC, principalmente modulando a atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), reduzindo a formação de citocinas inflamatórias e inibindo a ação de neutrófilos (Bakker, Zhang *et al.*, 1994; Cuzzocrea, Mazzone *et al.*, 2000; Bergamini, Rota *et al.*, 2001).

Estudos que avaliam o papel da NAC na cirrose mostram que ela apresenta efeitos positivos na redução do estresse oxidativo, atuando sobre a atividade de enzimas antioxidantes e também sobre a lipoperoxidação. Pereira-Filho *et al.* (2008) demonstraram que NAC reduz a fibrose hepática em ratos cirróticos, assim como reduz a lipoperoxidação quando comparado com os animais que não receberam tratamento com NAC (Pereira-Filho, Ferreira *et al.*, 2008). Em outro estudo, foi verificado que a NAC apresentou papel na manutenção das enzimas antioxidantes, assim como redução da lipoperoxidação em ratos cirróticos e esses dados estão diretamente relacionados à redução da ativação do TGF- $\beta$ , citocina que estimula o mecanismo de fibrose (Galicia-Moreno, Rodríguez-Rivera *et al.*, 2009).

A NAC também apresenta um papel favorável na regulação do NO e citocinas inflamatórias. O TNF- $\alpha$  e outras citocinas, assim como algumas EAO, alteram a atividade da NOS, o que provoca as alterações hemodinâmicas no modelo de hipertensão portal pelo aumento da produção de NO. Antioxidantes contendo grupo tiol, como a NAC, inibem a indução de NOS pelo TNF- $\alpha$ , prevenindo o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica provocada pelo aumento da produção de NO mediada por citocinas (Fernando, Marley *et al.*, 1998). Um outro estudo demonstrou o aumento de metabólitos de NO no pulmão, assim como de outras citocinas inflamatórias no modelo animal de embolismo pulmonar, que foram reduzidos com a administração da NAC (Liu, Kao *et al.*, 2008).

#### 1.4.6 S-nitrosotióis e a S-Nitroso-N-Acetilcisteína

Os S-nitrosotióis (RSNOs) são tioésteres de nitrito cuja estrutura geral é dada por R-S-N=O e são considerados transportadores endógenos de NO nos mamíferos (Wang, Zhang *et al.*, 2000). As propriedades dos RSNOs são similares às do NO livre e incluem a vasodilatação, antiagregação plaquetária (Stamler, Simon *et al.*, 1992; Simon, Stamler *et al.*, 1993) e o relaxamento da musculatura lisa (Gaston, Drazen *et al.*, 1994). Os RSNOs participam também de reações de S-transnitrosação, levando a modificações pós-translacionais em várias proteínas (Richardson e Benjamin, 2002) e sofrem decomposição térmica em solução, produzindo NO livre e um dissulfeto de acordo com a equação 3:

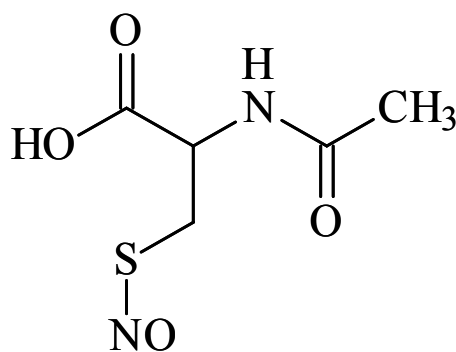


Essa reação é catalisada por íons metais (especialmente por íons  $\text{Cu}^{2+}$ ) e é acelerada fotoquimicamente por irradiação com luz ultravioleta ou visível (Sexton, Muruganandam *et al.*, 1994; Shishido e De Oliveira, 2000).

Foi demonstrado que os RSNOs são potentes relaxantes dos músculos lisos e inibidores da agregação plaquetária e são os melhores candidatos para o transporte e armazenamento endógeno de NO (Clancy, Levartovsky *et al.*, 1994; Askew, Butler *et al.*, 1995; Kaye, Wiviott *et al.*, 1997; Hogg, 2000). Alguns desses compostos, tais como

S-nitrosoalbumina (BSNO), S-nitroso-L-cisteína (CySNO), e S-nitrosoglutationa (GSNO), ocorrem naturalmente *in vivo*, e outros como S-nitroso-N-acetilpenicilina (SNAP), S-nitrosocaptopril, e S-nitrosomercaptoetilamina, são sintetizados. A sua síntese pode ser realizada pela reação da S-nitrosação de peptídeos contendo sulfidril, os quais são muito reativos às espécies nitrosativas (Stamler, Simon *et al.*, 1992; Wink, Nims *et al.*, 1994). L-cisteína (CySH) e glutatona (GSH) são naturalmente peptídeos contendo um grupo sulfidril no resíduo cisteína encontrado em quase todas as células. S-Nitrosoglutationa (GSNO), formado na S-nitrosação da GSH, é considerado um carreador endógeno de NO envolvido em muitas funções biológicas (Clancy, Levartovsky *et al.*, 1994; Wink, Nims *et al.*, 1994; Askew, Butler *et al.*, 1995).

CySH é o precursor da GSH e tem sido demonstrado que está envolvido como intermediário em várias reações de transnitrozação com outros carreadores de NO (Park, Billman *et al.*, 1993; Liu, Rudd *et al.*, 1998). A NAC é também um precursor muito efetivo e estimulador da síntese da glutatona e pode ser prontamente nitrosado, produzindo S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) (Figura 13)(Shishido e De Oliveira, 2000).



**Figura 13:** Fórmula química da S-nitroso-N-acetilcisteína.

Complicações vasculares da cirrose hepática, como a hipertensão portal e a síndrome hepatopulmonar, são as principais causas do aumento do índice de mortalidade de pacientes com doenças crônicas hepáticas (Jensen, 2002). Apesar de anormalidades anatômicas serem a causa principal do aumento de resistência ao fluxo sanguíneo portal através do fígado, um componente não estrutural da resistência intra-hepática aumentada tem sido identificado e atribuído ao desbalanço multifatorial entre mediadores vasoconstritores e vasodilatadores (Rockey e Weisiger, 1996; Bilzer,

Roggel *et al.*, 2006). Enquanto uma produção aumentada e/ou uma resposta exagerada do fígados cirrótico a vasoconstritores endógenos tem sido documentada em roedores (Rockey e Weisiger, 1996), redução a atividade óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) na células endoteliais sinusoidais tem sido documentada (Rockey e Chung, 1998). Apesar de os níveis da proteína eNOS parecerem inalterados, células endoteliais sinusoidais de fígados cirróticos apresentam aumento proeminente na proteína inibitória caveolina ligada à eNOS, com uma concomitante diminuição da ligação com calmodulina, o que pode contribuir para a disfunção da NOS (Shah, Toruner *et al.*, 1999).

A produção endotelial de NO reduzida contribui para o aumento dos tónus vascular observado na cirrose. Um tratamento farmacológico em potencial seria a modulação do relaxamento intra-hepático com NO, utilizando para isso agentes doadores de NO (Yokomori, Oda *et al.*, 2003).

A SNAC constitui um exemplo de RSNO que pode ser empregado como fonte exógena de NO e, quando utilizada para o tratamento da doença não alcoólica do fígado gorduroso em ratos, foi observado redução da lipoperoxidação e melhora dos aspectos histológicos e bioquímicos (De Oliveira, Simplicio *et al.*, 2006; Laleman, Van Landeghem *et al.*, 2007). Dessa forma, é importante que se avalie o efeito de doadores de óxido no tratamento da cirrose hepática e suas complicações.

---

## **OBJETIVOS DO ESTUDO**

---



## **2. OBJETIVOS DO ESTUDO**

### **Objetivo Geral**

Este trabalho tem por objetivo geral avaliar o efeito da NAC e da SNAC sobre o estresse oxidativo em ratos com cirrose biliar secundária, induzida pela ligadura de ducto biliar comum, na tentativa de elucidar a ação desses fármacos sobre as complicações desse modelo experimental.

### **Objetivos Específicos**

#### **Experimento I**

Respondido no artigo I - *N-Acetylcysteine Effects on Genotoxic and Oxidative Stress Parameters in Cirrhotic Rats with Hepatopulmonary Syndrome.*

- 1) Verificar a integridade hepática de ratos submetidos à ligadura de ducto biliar através da análise das enzimas séricas Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), Fosfatase Alcalina (FA) e verificar as alterações na difusão de gases através de gasometria arterial, avaliando a pressão parcial de oxigênio arterial ( $\text{PaO}_2$ ), a pressão parcial de gás carbônico arterial ( $\text{PaCO}_2$ ) e a saturação de oxigênio da hemoglobina ( $\text{SatO}_2/\text{Hb}$ ) dos animais tratados e não tratados com NAC.
- 2) Avaliar as alterações das relações hepatossomática e pneumossomática dos animais tratados e não tratados com NAC.
- 3) Avaliar a lipoperoxidação no tecido pulmonar através da determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos animais tratados e não tratados com NAC.
- 4) Quantificar a atividade enzimática antioxidante da SOD dos animais tratados e não tratados com NAC.

- 5) Avaliar os metabólitos do Óxido Nítrico (nitritos e nitratos) no tecido pulmonar dos animais tratados e não tratados com NAC.
- 6) Avaliar os danos ao DNA no modelo de cirrose biliar secundária e a ação da NAC como agente genotóxico/antigenotóxico, utilizando o teste de micronúcleos e o ensaio cometa dos animais tratados e não tratados com NAC.
- 7) Analisar pela histologia o diâmetro dos capilares pulmonares através da coloração hematoxilina e eosina dos animais tratados e não tratados com NAC.

## **Experimento II**

Respondido no artigo II - *S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates oxidative stress, MAPK activation and fibrosis in cirrhotic rats.*

- 1) Verificar a integridade hepática de ratos submetidos a ligadura de ducto biliar comum e tratados e não tratados com SNAC através da análise das enzimas séricas Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT) e Fosfatase Alcalina (FA).
- 2) Avaliar o efeito da ligadura de ducto biliar comum sobre a histologia hepática, através da coloração de hematoxilina e eosina, e picrossírius dos animais tratados e não tratados com SNAC.
- 3) Avaliar a lipoperoxidação no hepático através por meio da determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da quimiluminescência (QL) nos animais tratados e não tratados com SNAC.
- 4) Quantificar a atividade enzimática antioxidante da SOD dos animais tratados e não tratados com SNAC.
- 5) Avaliar os metabólitos do Óxido Nítrico nos tecido hepático dos animais tratados e não tratados com SNAC.

- 
- 6) Avaliar a expressão gênica através da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) das proteínas  $\alpha$ -SMA, colágeno tipo I, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PDGF, TIMP-1, MMP-2 no tecido hepático dos animais tratados e não tratados com SNAC.
  
  - 7) Avaliar a expressão através de Western Blot das proteínas MAPKs (p38, ERK e JNK) e AKT no tecido hepático dos animais tratados e não tratados com SNAC.

---

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Experimento I**

##### **Delineamento da Pesquisa**

Este estudo tem caráter experimental qualitativo e quantitativo e, para isso os animais sofreram tanto a simulação da cirurgia de ligadura de ducto biliar comum como também foram induzidos à cirrose biliar secundária através da cirurgia de ligadura de ducto biliar comum.

##### **Delineamento Experimental**

###### **3.1.2.1 Animais**

Foram utilizados seis ratos machos Wistar para cada grupo experimental, peso médio de 250 gramas, provenientes do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos, durante o experimento, na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em caixas plásticas individuais, de 47x34x18cm, forradas com maravalha, em ciclo de doze horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas) e temperatura de  $22 \pm 2$  °C. A água e a ração Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil) foram fornecidos livremente. O número de animais utilizados no estudo foi baseado em cálculo amostral, o qual referia que para detectar uma diferença entre as médias das variáveis em estudo de 1,5 de desvio padrão (magnitude de grande efeito), considerando  $\alpha=0,05$  e poder de confiança de 90%, são necessários, no mínimo, seis animais por grupo.

Os procedimentos com os animais realizaram-se de acordo com as normas preconizadas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação de Clínicas de Porto Alegre (Goldin e Raymundo, 1997).

###### **3.1.2.2 Grupos Experimentais**

O modelo utilizado foi o de cirrose biliar secundária, de acordo com o estabelecido por Kountouras, Billing *et al.*, 1984, através de ligadura de ducto biliar comum. Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- Grupo 1 - *Sham Operated* + Veículo (**Sham**) - Grupo submetido à simulação da cirurgia de ligadura de ducto biliar comum e a administração de Veículo (NaCl 0,9%) por via intraperitoneal;
- Grupo 2 - Ligadura de Ducto Biliar Comum + Veículo (**CBDL**) - Grupo submetido à cirurgia de ligadura de ducto biliar comum e à administração de Veículo (NaCl 0,9%) por via intraperitoneal;
- Grupo 3 - *Sham Operated* + NAC (**Sham + NAC**) Grupo submetido à simulação da cirurgia de ligadura de ducto biliar comum e à administração de NAC (10mg/Kg) por via intraperitoneal;
- Grupo 4 - Ligadura de Ducto Biliar Comum + NAC (**CBDL + NAC**) – Grupo submetido à cirurgia de ligadura de ducto biliar comum à administração de NAC (10mg/Kg) por via intraperitoneal.

### 3.1.3 Procedimentos Experimentais

#### 3.1.3.1 Ligadura de ducto biliar comum

O processo iniciou com a anestesia do animal mediante a administração de fármacos anestésicos e posicionamento para cirurgia. Foi utilizada uma mistura de Cloridrato de Xilazina 2% 50mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Cetamina 100mg/Kg de peso corporal intraperitonealmente. A intervenção cirúrgica iniciou com realização de tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida de uma laparotomia ventral média, seguida de dissecação do ducto biliar comum na altura da desembocadura dos ductos pancreáticos, ligando-se por meio de dois nós para posterior secção entre eles. A cavidade abdominal foi fechada com pontos individuais em “U” no plano cutâneo, e o peritônio e a camada muscular abdominal foram fechados com pontos contínuos. Os animais recuperaram-se da anestesia em caixas individuais forradas com maravalha em incubadora para recém-nascidos (FANEM - SP), antes de serem devolvidos às condições padrão da Unidade de Experimentação.

Os animais dos grupos 1 (Sham) e 3 (Sham + NAC) não foram submetidos a ligadura de ducto biliar comum, sendo realizada somente a manipulação do ducto mediante o estresse cirúrgico. Após 28 dias, os animais foram mortos por exsanguinação (American Veterinary Medical Association, 2007a; b).

### **3.1.3.2 Administração do Veículo e da NAC**

O tratamento com veículo ou NAC iniciou a partir do 14º dia após o procedimento cirúrgico, diariamente, durante quatorze. A NAC (Sigma Chemical, St. Louis, M) foi administrada por via intraperitoneal, na dose de 10mg/Kg, diluídos em 0,6 mL de NaCl 0,9%. Os animais *Sham* receberam o veículo (NaCl 0,9%) no volume de 0,6 mL por via intraperitoneal.

### **3.1.3.3 Morte dos Animais e Obtenção das amostras de tecido e sangue**

Transcorridos os quatorze dias do desenvolvimento do modelo e mais quatorze dias de administração de Veículo ou NAC, conforme o grupo, os animais foram novamente pesados e anestesiados com uma mistura de Cloridrato de Xilazina 2% 50mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Cetamina 100mg/Kg de peso corporal intraperitonealmente.

Primeiramente foi coletado sangue pela técnica da punção de plexo veno retro-orbital com tubo capilar de vidro (Halpern e Pacaud, 1951). Esse material foi utilizado para avaliar integridade hepática por meio das análises das enzimas séricas aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e, por meio do ensaio cometa, o dano ao DNA.

Para a determinação da AST (aspartato-aminotransferase EC 2.6.1.1) e da ALT (alanina-aminotransferase EC 2.6.1.2) no plasma, foi utilizado o método enzimático comercial (Boehringer Mannheim, Alemanha). Assim, a atividade enzimática da AST e ALT foi obtida através da medição cinética a 567 nm.

A atividade da fosfatase alcalina no plasma foi determinada através do método enzimático automatizado. Para isso, utiliza-se como substrato o para-nitrofenilfosfato

mais água, que formou para-nitrofenol, composto intensamente amarelo, com o máximo de absorvância de 400nm.

Posteriormente, realizaram-se tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida da intervenção cirúrgica, que iniciou com laparotomia ventral média, exposição das alças intestinais para visualização da artéria aorta abdominal, da qual foi coletado sangue para realização de gasometria arterial. A análise dos gases arteriais foi feita através do analisador ABL 700 (RADIOMETER COPENHAGEN), pelo método de eletroiontoforese.

Dando continuidade, foram retirados o fígado e os pulmões, sendo esses pesados para realização das relações hepatossomática e pneumossomática, respectivamente, e, posteriormente, separados em partes:

1º) Um pequeno fragmento da porção anterior do lobo inferior do pulmão direito foi imergido em solução de formolaldeído 10% durante doze horas para posterior análise histológica;

2º) Um pequeno fragmento do fígado e da porção anterior do lobo inferior do pulmão esquerdo foram emergidos em *eppendorfs* no gelo com solução tampão, sendo abrigados da luz, para posteriores análises de dano ao DNA através de Ensaio Cometa;

3º) O restante do pulmão foi pesado e congelado a - 80°C, para posteriores análises de lipoperoxidação, enzimas antioxidantes e avaliação de nitritos e nitratos.

Por fim, foi coletado o osso fêmur da pata direita dos animais para posteriores análises de Micronúcleos.

#### **3.1.3.4 Preparação do Homogeneizado**

Para homogeneizar o pulmão, foram colocados 9 mL de tampão fosfato (KCL 140 mM, fosfato 20 mM; pH 7,4) por grama de tecido. A homogeneização foi realizada em um aparelho Ultra-Turrax (IKA-WERK) durante quarenta segundos, à temperatura de 0 a 4° C. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado em uma centrífuga



refrigerada (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) durante dez minutos a 3000 rpm (1110 x g). O precipitado foi desprezado, e o sobrenadante retirado e congelado em freezer, à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posteriores dosagens.

### **3.1.3.5 Dosagem de Proteína**

A concentração de proteínas no homogeneizado de pulmão foi determinada, utilizando, como padrão, uma solução de albumina bovina 1mg/mL (utilizaram-se volumes de 50, 100 e 150  $\mu\text{L}$ ). Colocou-se uma alíquota do homogeneizado (20 $\mu\text{L}$ ) em 780  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2,0 mL do reativo C que foi preparado com 50 ml de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,5 mL do reativo B1 ( $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1%) e 0,5 mL do reativo B2 (tartarato de sódio e potássio 2%). Após a adição do reativo C, aguardaram-se dez minutos e colocou-se 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteu diluído na proporção 1:3 em água destilada. Após trinta minutos, realizou-se a medida em espectrofotômetro a 625 nm (Lowry, Rosebrough et al. 1951).

### **3.1.3.6 Determinação das Substâncias que reagem ao Ácido Tiobarbitúrico**

Foi determinada a lipoperoxidação através do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). A técnica de TBA-RS consiste no aquecimento do material homogeneizado na presença de ácido tiobarbitúrico e consequente formação de um produto de coloração rósea, medido em espectrofotômetro a 535nm. O aparecimento de coloração ocorre devido à presença do malondialdeído e de outras substâncias provenientes da peroxidação lipídica no material biológico. Foram colocados em tubo de ensaio, nesta ordem de adição, 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%, 0,25mL de água destilada, 0,75mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 0,25mL do homogeneizado. O TBA reagiu com produtos da lipoperoxidação formando uma base de Schiff, e o TCA teve função de desnaturar as proteínas presentes, além de acidificar o meio de reação. A seguir, agitaram-se os tubos, os quais foram aquecidos à temperatura de  $100^{\circ}\text{C}$  durante quinze minutos. Posteriormente, os tubos foram resfriados, e acrescentou-se 1,5 mL de álcool n-butílico, para extrair o pigmento formado. Os tubos foram colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos e centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (1110 x g). Por último, o produto corado foi retirado e realizada a leitura em espectrofotômetro (CARY 3E – UV – Visible

Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 535nm. A concentração de TBA-RS foi expressa em nmoles/mg de proteína (Buege & Aust 1978).

### **3.1.3.7 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)**

A atividade dessa enzima é definida por sua capacidade para inibir um sistema de detecção que reage com o  $O_2^{\bullet-}$ . A técnica de medida da SOD foi baseada na inibição dessa reação. Para isso, utilizou-se adrenalina que, no meio alcalino, transformou-se em adrenocromo, produzindo  $O_2^{\bullet-}$  que é o substrato da enzima. Antes de realizar a determinação com o homogeneizado, fez-se a medida do meio de reação (glicina-NaOH 50 mM, pH 9,6) com 50  $\mu$ L de adrenalina (60 mM, pH 2,0). Essa mistura foi agitada e lida a 480 nm. Posteriormente, adicionaram-se diferentes volumes do homogeneizado e mediu-se a inibição da reação. A atividade enzimática foi expressa em unidades SOD/g de tecido (quantidade de SOD que inibe em 50% a velocidade de redução da adrenalina) (Misra e Fridovich, 1972).

### **3.1.3.8 Avaliação dos Metabólitos do Óxido Nítrico**

O NO é substância extremamente lábil, com meia-vida de apenas alguns segundos em sistemas biológicos. Dessa forma a medida pode ser feita por meio de forma indireta pela medida de nitritos e nitratos.

Esse método consiste na transformação de nitratos e nitritos por meio da nitrato redutase. Para isso, utiliza-se, posteriormente, o reativo de Griess.

Para realizar a técnica foram necessários 500  $\mu$ L de amostra, 100  $\mu$ L NADPH (0,2 mM), 70  $\mu$ L Tris Buffer 1M, pH 7,5, 230  $\mu$ L de uma mistura formada por 6P (50 mM) e glicose 6-fosfato desidrogenase (100 U/mL), 100  $\mu$ L de nitrato redutase (10/mL), essa mistura foi incubada a temperatura ambiente durante trinta minutos.

Posteriormente utilizaram-se 750  $\mu$ L dessa mistura e adicionaram-se 750  $\mu$ L do reativo de Griess, incubando-a novamente, à temperatura ambiente, durante dez minutos. A leitura foi realizada a 550 nm e feita uma curva padrão para a determinação de nitritos e nitratos (Granger, Anstey *et al.*, 1999).

### 3.1.3.9 Micronúcleos

Após o sacrifício do animal, uma amostra de medula óssea foi coletada de um dos fêmures. A extremidade final proximal do fêmur, depois de feita a assepsia do local, foi cortada para expor o canal da medula. Uma agulha histológica foi inserida firmemente – na abertura do fêmur – para possibilitar que a medula fosse extraída e misturada a uma gota de soro fetal bovino, previamente colocada sobre uma das extremidades de uma lâmina de microscopia codificada.

A amostra de medula óssea foi homogeneizada no soro, obtendo-se uma suspensão de células, com a qual foi realizado esfregaço celular sobre a lâmina com auxílio de uma outra lâmina inclinada. Foram preparadas duas lâminas para cada animal. Após secagem da preparação, à temperatura ambiente, as lâminas foram tratadas com metanol para fixação do material biológico. Posteriormente foi realizada a coloração, utilizando corante de Giemsa (Merck) em tampão fosfato 0.2M, pH 5.8 (proporção de 1:9). Após sete minutos nessa solução de coloração, as lâminas foram enxaguadas em água destilada, secadas e guardadas em caixas de lâminas até a análise. Para contagem dos eritrócitos normocromáticos (ENC), eritrócitos policromáticos (EPC) e micronúcleos no EPC, foi utilizado microscópio ótico com objetiva de imersão. Pelo menos 2000 EPC foram analisados por animal. A relação EPC/ENC também foi determinada pela avaliação da frequência de EPC em 1000 eritrócitos de cada animal (Macgregor, Heddle *et al.*, 1987; Mavournin, Blakey *et al.*, 1990; Picada, Flores *et al.*, 2003).

### 3.1.3.10 Ensaio Cometa

Foi utilizada a versão alcalina do ensaio cometa, utilizando sangue total, fígado e pulmão dos animais tratados e controles. Um pedaço de cada tecido foi colocado em *ependorff* contendo solução tamponada (PBS) pH 7,4, gelada, e fragmentado com auxílio de uma pinça para obtenção de suspensão celular. O sangue foi coletado em *ependorfs* heparinizados. As amostras de tecido em suspensão e o sangue foram misturados com uma fina camada de agarose *low melting* 0,75% e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%; estas lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% DMSO na hora do uso), por, no mínimo, uma hora até, no máximo, 72 horas, à 4°C, para o rompimento das membranas celulares. A lise celular

permitiu a migração dos fragmentos de DNA que foi realizada após a incubação das lâminas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13) e subsequente aplicação de uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) às células lisadas sobre as lâminas para microscopia em uma cuba de eletroforese de DNA. As lâminas foram neutralizadas, logo após a eletroforese, com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5 e coradas com solução de coloração com prata. Os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD). O ID foi obtido pela avaliação visual das classes de dano (de 0 – 4), extraindo-se um índice que expressa o dano geral sofrido por uma população de células; os núcleos intactos aparecem redondos (classe 0 – sem dano), já nas células lesadas, o DNA livre migra do núcleo em direção ao ânodo, durante a eletroforese, mostrando uma “cauda” de fragmentos sedimentados, semelhante a um cometa os quais são classificados entre classes 1 (dano mínimo) a 4 (dano máximo). A FD foi calculada embaseada no número de células com cauda versus aquelas sem cauda (Speit e Hartmann, 1999; Tice, Agurell *et al.*, 2000; Picada, Flores *et al.*, 2003).

#### **3.1.3.11 Histologia**

O tecido pulmonar permaneceu durante doze horas em formolaldeído 10% e após a amostra de pulmão foi embebida em parafina. Na etapa seguinte, os blocos de parafina foram fixados ao Micrótomo (Leitz<sup>®</sup>1512) no qual se realizavam cortes com três micra (3 $\mu$ ). Na fase de coloração, as lâminas foram mergulhadas nos corantes hematoxilina-eosina durante cinco minutos cada uma, intermediadas por um banho de água corrente. Na fase de desidratação, as estruturas passaram por três recipientes com álcool absoluto e por dois de xilol. Colocou-se a lamínula sobre a lâmina utilizando-se Bálsamo do Canadá ou Entellan, finalizando, assim, o processo de preparação. As lâminas foram analisadas por um patologista do Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que desconhecia os grupos experimentais. Os capilares selecionados foram avaliados morfometricamente em um microscópio equipado com uma câmera digital e conectado a um programa de captura de imagem (Image-Pro Plus by Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA).

#### **3.1.3.12 Análise Estatística**

Os dados foram calculados e analisados utilizando ANOVA. A análise estatística dos dados de ensaio cometa e micronúcleos foram calculados com teste de Tukey. *Post*

*hoc* de múltiplas comparações foi executado com teste de *Student Newman-Keuls*.. Os valores foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ . Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa estatístico SPSS versão 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## **3.2 Experimento II**

### **3.2.1 Delineamento da Pesquisa**

Este estudo tem caráter experimental qualitativo e quantitativo. Para isso os animais sofreram tanto a simulação da cirurgia de ligadura de ducto biliar comum, como a indução à cirrose biliar secundária através da cirurgia de ligadura de ducto biliar comum.

### **3.2.2 Delineamento Experimental**

#### **3.2.2.1 Animais**

Foram utilizados seis ratos machos Wistar para cada grupo experimental, peso médio de 250 gramas, provenientes do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos durante o experimento na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em caixas plásticas individuais, de 47x34x18cm, forradas com maravalha, em ciclo de doze horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas) e temperatura de  $22 \pm 2$  °C. A água e a ração Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil) foram fornecidos livremente. O número de animais utilizados no estudo foi embasou-se em cálculo amostral, o qual referia que, para detectar uma diferença entre as médias das variáveis em estudo de 1,5 de desvio padrão (magnitude de grande efeito), considerando  $\alpha = 0,05$  e poder de confiança de 90%, seriam necessários, no mínimo, seis animais por grupo.

Os procedimentos com os animais ocorreram conforme o preconizado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação de Clínicas de Porto Alegre (Goldin e Raymundo, 1997).

### 3.2.2.2 Grupos Experimentais

O modelo utilizado foi o de cirrose biliar secundária, de acordo com o estabelecido por Kountouras, Billing *et al.*, 1984, através de ligadura de ducto biliar comum. Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- Grupo 1 - *Sham Operated* + Veículo (**Sham**) - Grupo submetido à simulação da cirurgia de ligadura de ducto biliar comum e à administração de Veículo (tampão fosfato pH 7,4) por via intragástrica;
- Grupo 2 - *Sham Operated* + SNAC (**Sham** + **SNAC**) – Grupo submetido à simulação da cirurgia de ligadura de ducto biliar comum e à administração de SNAC (1,14mg/Kg) por via intragástrica;
- Grupo 3 - Ligadura de Ducto Biliar Comum + Veículo (**CBDL**) - Grupo submetido à cirurgia de ligadura de ducto biliar comum e à administração de Veículo (tampão fosfato pH 7,4) por via intragastrica;
- Grupo 4 - Ligadura de Ducto Biliar Comum + SNAC (**CBDL** + **SNAC**) – Grupo submetido à cirurgia de ligadura de ducto biliar comum e à administração de SNAC (1,14mg/Kg) por via intragástrica.

### 3.2.3 Procedimentos Experimentais

#### 3.2.3.1 Ligadura de ducto biliar comum

O processo iniciou com a anestesia do animal, mediante a administração de fármacos anestésicos, e posicionamento para cirurgia. Foi utilizada uma mistura de Cloridrato de Xilazina 2% 50mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Cetamina 100mg/Kg de peso corporal intraperitonealmente. A intervenção cirúrgica iniciou com a realização de tricotomia e a desinfecção da região abdominal, seguida de laparotomia ventral média, seguida de dissecação do ducto biliar comum na altura da desembocadura dos ductos pancreáticos, ligando-se por meio de dois nós para posterior secção entre eles. A cavidade abdominal foi fechada com pontos individuais em “U” no plano cutâneo, e o peritônio e a camada muscular abdominal foram fechados com

pontos contínuos. Os animais recuperaram-se da anestesia em caixas individuais, forradas com maravalha em incubadora para recém-nascidos (FANEM - SP), antes de serem devolvidos às condições padrão da Unidade de Experimentação.

Os animais dos grupos 1 (Sham) e 2 (Sham+SNAC) não foram submetidos à ligadura de ducto biliar comum, sendo realizada somente a manipulação do ducto mediante o estresse cirúrgico. Após 28 dias, os animais foram mortos por exsanguinação (American Veterinary Medical Association, 2007a; b).

### **3.2.3.2 Administração do Veículo e da SNAC**

O tratamento diário iniciou com veículo ou SNAC a partir do 14º dia após o procedimento cirúrgico, durante quatorze dias consecutivos. A SNAC foi administrada por via intragástrica, na dose de 1,14mg/Kg (6,0 µmol/kg) diluídos em tampão fosfato,. A SNAC foi sintetizada através da S-nitrosação da NAC (Sigma Chemical, St. Louis, MO) em uma solução de ácido nitroso diluído em tampão fosfato (pH 7,4) antes da administração. Os animais *Sham* receberam o veículo (tampão fosfato pH 7,4) no volume de 0,6 mL por via intragástrica.

### **3.2.3.3 Morte dos Animais e Obtenção das amostras de tecido e sangue**

Transcorridos os quatorze dias do desenvolvimento do modelo e mais quatorze dias de administração de Veículo ou SNAC, conforme o grupo, os animais foram novamente pesados e anestesiados com mistura de Cloridrato de Xilazina 2% 50mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Cetamina 100mg/Kg de peso corporal intraperitonealmente. Primeiramente foi coletado sangue pela técnica da punção de plexo veno retro-orbital com tubo capilar de vidro (Halpern e Pacaud, 1951). Esse material foi utilizado para avaliar integridade hepática por meio das análises das aminotransferases aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT), da fosfatase alcalina (FA).

Para a determinação da AST (aspartato-aminotransferase EC 2.6.1.1) e da ALT (alanina-aminotransferase EC 2.6.1.2) no plasma foi utilizado o método enzimático comercial (Boehringer Mannheim, Alemanha). Assim, a atividade enzimática da AST e ALT foi obtida através da medição cinética a 567 nm.

A atividade da fosfatase alcalina no plasma foi determinada através do método enzimático automatizado. Para isso, utilizou-se como substrato o para-nitrofenilfosfato mais água, que formou para-nitrofenol, com um máximo de absorbância de 400nm.

Posteriormente, realizou-se tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida da intervenção cirúrgica, que iniciou com laparotomia ventral média e exposição das alças intestinais para retirada do fígado.

1º) Um pequeno fragmento do fígado foi imergido em solução de formolaldeído 10% durante doze horas para posterior análise histológica;

2º) Um pequeno fragmento do fígado foi imergidos em *eppendorfs* em nitrogênio líquido para análises bioquímicas;

3º) O restante do fígado foi congelado a -80°C para posteriores análises de lipoperoxidação, enzima antioxidante, avaliação de nitritos e nitratos, reação em cadeia da polimerase em tempo real e *Western Blot*.

#### **3.2.3.4 Avaliação da Histologia**

O tecido hepático permaneceu durante doze horas em formolaldeído 10% ,e, depois disso, a amostra de fígado foi embebida em parafina. Na etapa seguinte, os blocos de parafina foram fixados ao Micrótopo (Leitz®1512) no qual se realizavam cortes com 3 micra (3µ). Na fase de coloração, as lâminas foram mergulhadas nos corantes hematoxilina-eosina e picrossírios vermelho durante cinco minutos cada uma, intermediadas por banho de água corrente. Na fase de desidratação, as estruturas passaram por três recipientes com álcool absoluto e por dois de xilol. Colocou-se a lamínula sobre a lâmina, utilizando-se Bálsamo do Canadá ou Entellan, finalizando, assim, o processo de preparação. A análise qualitativa foi realizada em microscópio binocular *Nikon Labophot (Tokyo, Japan)*. A porcentagem de fibrose no tecido hepático foi determinada por análise histomorfométrica em microscópio equipado com câmera digital e conectado a um programa de captura de imagem (Image-Pro Plus by Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Depois de analisar vinte campos randomizados por imagem, as razões do tecido conjuntivo em relação a todo o fígado foram calculadas. O



exame histológico foi executado por um patologista que desconhecia os grupos experimentais.

### **3.2.3.5 Preparação do Homogeneizado**

Para homogeneizar o fígado, foram colocados 9 mL de tampão fosfato (KCL 140 mM, fosfato 20 mM; pH 7,4) por grama de tecido. A homogeneização foi realizada em um aparelho Ultra-Turrax (IKA-WERK) durante quarenta segundos, à temperatura de 0 a 4° C. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado em uma centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) durante dez minutos a 3000 rpm (1110 x g). O precipitado foi desprezado, e o sobrenadante retirado e congelado em freezer, à temperatura de -80 °C, para posteriores dosagens.

### **3.2.3.6 Dosagem de Proteína**

A concentração de proteínas no homogeneizado de fígado foi determinada, utilizando, como padrão, uma solução de albumina bovina 1mg/mL (utilizaram-se volumes de 50, 100 e 150 µL). Colocou-se uma alíquota do homogeneizado (20µL) em 780 µL de água destilada e 2,0 mL do reativo C que foi preparado com 50 ml de NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 mL do reativo B1 (CuSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 1%) e 0,5 mL do reativo B2 (tartarato de sódio e potássio 2%). Após a adição do reativo C, foram aguardados dez minutos e colocou-se 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteau diluído na proporção 1:3 em água destilada. Após trinta minutos, realizou-se a medida em espectrofotômetro a 625 nm (Lowry, Rosebrough et al. 1951).

### **3.2.3.7 Determinação das Substâncias que reagem ao Ácido Tiobarbitúrico**

Foi determinada a lipoperoxidação por meio do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). A técnica de TBA-RS consiste no aquecimento do material homogeneizado na presença de ácido tiobarbitúrico e consequente formação de um produto de coloração rósea, medido em espectrofotômetro a 535nm. O aparecimento de coloração ocorre devido à presença do malondialdeído e outras substâncias provenientes da peroxidação lipídica no material biológico. Foram colocados em tubo de ensaio, nesta ordem de adição, 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%, 0,25mL de água destilada, 0,75mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 0,25mL do

homogeneizado. O TBA reagiu com produtos da lipoperoxidação formando uma base de Schiff, e o TCA teve função de desnaturar as proteínas presentes, além de acidificar o meio de reação. A seguir, agitaram-se os tubos, os quais foram aquecidos à temperatura de 100° C durante 15 minutos. Após, os tubos foram resfriados, e acrescentou-se 1,5 mL de álcool n-butílico, para extrair o pigmento formado. Os tubos foram colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos e centrifugados por dez minutos a 3000 rpm (1110 x g). Por último, o produto corado foi retirado e realizada a leitura em espectrofotômetro (CARY 3E – UV – Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 535nm. A concentração de TBA-RS foi expressa em nmoles/mg de proteína (Buege & Aust 1978).

### 3.2.3.8 Quimiluminescência

O método consistiu em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (hidroperóxido de tert-butil) ao homogeneizado de tecido. Avalia-se a capacidade de resposta mediante a determinação da quimiluminescência (QL) produzida pela reação. Em tecidos expostos ao estresse oxidativo, o valor da QL iniciado por hidroperóxido de tert-butila (t-BOOH) foi maior que o valor correspondente ao tecido em condições basais. A QL foi medida em um contador com o circuito de coincidência desconectado, utilizando-se o canal de trítio (*Liquid Scintillation Correnter*, 1209 Rack beta, LKB WALLAR). Os homogeneizados de tecido (0,5 mL) foram colocados em vials de vidro de 25 mm de diâmetro por 50 mm de altura. Para evitar a fosforescência dos vials, ativada pela luz fluorescente, foram conservados na obscuridade até o momento do uso e as mensurações foram realizadas em sala escura. As condições da reação, consistiam em solução reguladora de KCl 120 mM; fosfato 40 mM, pH 7,4, cuja concentração de proteínas do homogeneizado foi, aproximadamente, 1mg/mL, na concentração de t-BOOH 3mM (30µL). Os resultados foram expressos em contas por segundo por mg de proteína (cps/MG prot) (Gonzalez Flecha, Llesuy *et al.*, 1991).

### 3.2.3.9 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi definida por sua capacidade para inibir um sistema de detecção que reage com o  $O_2^{\bullet-}$ . A técnica de medida dessa enzima baseou-se na inibição dessa reação. Para isso, utilizou-se adrenalina que, no meio alcalino, transformou-se em adrenocromo, produzindo  $O_2^{\bullet-}$  que é o substrato da enzima. Antes de realizar a

determinação com o homogeneizado, fez-se a medida do meio de reação (glicina-NaOH 50 mM, pH 9,6) com 50 µL de adrenalina (60 mM, pH 2,0). Essa mistura foi agitada e lida a 480 nm. Posteriormente, adicionaram-se diferentes volumes do homogeneizado e mediu-se a inibição da reação. A atividade enzimática foi expressa em unidades SOD/g de tecido (quantidade de SOD que inibe em 50% a velocidade de redução da adrenalina) (Misra e Fridovich, 1972).

### **3.2.3.10 Avaliação dos Metabólitos do Óxido Nítrico**

A concentração de metabólitos de óxido nítrico nos homogenizado de fígado foi medida através do método de quimiluminescência, utilizando-se o aparelho NO analyzer (Model 280 NOA; Sievers Instruments, Boulder, Colorado, USA). Alíquotas de homogenizado foram injetadas no frasco de purga do aparelho, contendo cloreto de vanádio (III) em HCl 1 mol L<sup>-1</sup> (97 °C), sob atmosfera de nitrogênio. Nessas condições, nitritos e nitratos são reduzidos a NO gasoso. Um fluxo de nitrogênio foi continuamente borbulhado através do frasco de purga e o NO gasoso formado foi arrastado para a câmara de reação do aparelho, onde o NO reagiu com o ozônio para produzir um sinal quimiluminescente. A quantidade de luz produzida, proporcional à concentração de NO, foi calculada através de uma curva de calibração obtida com concentrações conhecidas de nitrato de sódio (Yang, Troncy et al., 1997). Essa técnica foi realizada no Laboratório de Físico-Química da Universidade Estadual de Campinas - Unicamp.

### **3.2.3.11 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)**

Primeiramente foi realizada a extração e purificação do RNA da amostra mediante uso de um kit comercial (Promega Corporation, Madison, USA). Posteriormente, o RNA foi quantificado por meio de espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Products, Wilmington, USA). O RNA foi eluído em água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC). Para verificar a presença de RNA de alta qualidade, 1µL da amostra foi separada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Posteriormente realizou-se a conversão a cDNA através do sistema High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA), baseado na capacidade da transcriptase reversa em sintetizar uma cadeia complementar de DNA (cDNA) a partir de uma seqüência molde de RNA.

Posteriormente foi realizada a técnica de PCR em tempo real de acordo com o descrito por Mullis e Faloona em 1987 e por Saiki e colaboradores em 1988, baseando-se no processo natural de replicação do DNA com amplificação cíclica. O método constou de três etapas, sendo elas a desnaturação, anelamento e alongamento, efetuados de forma sucessiva em condições controladas de temperatura e tempo (Mullis e Faloona, 1987; Saiki, Gelfand *et al.*, 1988).

Sondas da TaqMan e sonda para os genes de **TIMP-1** (GenBank L31883.1 e Rn00587558\_m1), **TGF- $\beta$ 1** (GenBank X52498.1 e Rn00572010\_m1), **colágeno, tipo I, alfa 2** (GenBank AF121217.1 e Rn01526721\_m1), **MMP-2** (GenBank U65656.1 e Rn01538170\_m1),  **$\alpha$ -SMA** (GenBank X06801.1 e Rn01759928\_g1), **TNF- $\alpha$**  (GenBank AJ002278.1 e Rn99999017\_m1), **gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH)** (GenBank X02231.1 e Rn99999916\_s1) foram obtidos da TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Mudanças relativas na expressão do níveis foram obtidos usando método  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  (Livak, 2001).

Cada ensaio foi incluído um controle vazio e um controle negativo. O número de ciclos em que a transcrição foi detectada (CT) normalizadas pelo número de ciclos do gene constitutivo GAPDH e referida como  $\Delta CT$ . A amplificação foi realizada em termociclador StepOne Plus, real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, USA).

### 3.2.3.12 Western Blot

Foi usada a técnica de Western Blot para determinar a expressão das proteínas **ERK1/2**, **AKT**, **p38**, **JNK** nas suas formas totais e fosforiladas. Os homogenizados de fígado foram preparados em 0.25 mM sacarose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, e 1% de inibidor de protease (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). O homogeneizado foi incubado durante trinta minutos, a 4°C, e centrifugado a 13.000 xg durante trinta minutos, a 4°C, retirando o sobrenadante e alicotando a amostra. As proteínas (25-50 $\mu$ g) foram separadas por gel de poliacrilamida 10-12% e transferidas eletricamente para membranas de difluorido de polivinilideno (Millipore, Bedford, MA, USA). Posteriormente as membranas foram colocadas na solução de bloqueio Tris/salina-tamponada/Tween-20 (TBST - 5% de leite em pó desnatado em tampão

fosfato salina-Tris contendo 0,05% Tween 20) durante 30 minutos, a 37° C. A membrana ficou incubada durante toda a noite a 4°C com anticorpo policlonal **ERK1/2**, **fosfo-ERK1/2**, **AKT**, **fosfo-AKT** (1:200 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), **p38**, **fosfo-p38**, **JNK1**, **fosfo-JNK1** (1:1000 Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Depois disso as membranas foram lavadas com TBST e incubadas durante uma hora em temperatura ambiente com um anticorpo anti-imunoglobulina de coelho, unido a HRP (DAKO, Glostrup, Dinamarca). As proteínas foram detectadas mediante quimiluminescência, utilizando o kit comercial ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) e a densidade das bandas específicas foi quantificada com um densitômetro de imagen (Scion Image, Maryland, MA, USA).

### **3.2.3.13 Análise Estatística**

Os dados foram calculados e analisados utilizando ANOVA. *Post hoc* de múltiplas comparações foi executado com teste de *Student Newman-Keuls*.. Os valores foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ . Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa estatístico SPSS versão 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## **RESULTADOS**

## **4. RESULTADOS**

---

### **4.1 Artigo Experimento I**

Artigo publicado no periódico:

*Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 102, n. 4, p. 370-6, 2008.

#### **N-Acetylcysteine Effects on Genotoxic and Oxidative Stress Parameters in Cirrhotic Rats with Hepatopulmonary Syndrome**

Rafael Vercelino, Juliana Tieppo, Alexandre Simões Dias, Cláudio Augusto Marroni,  
Eduardo Garcia, Luise Meurer, Jaqueline Nascimento Picada, Norma Possa Marroni

## N-Acetylcysteine Effects on Genotoxic and Oxidative Stress Parameters in Cirrhotic Rats with Hepatopulmonary Syndrome

Rafael Vercelino<sup>1</sup>, Juliana Tieppo<sup>1</sup>, Alexandre Simões Dias<sup>1,2</sup>, Cláudio Augusto Marroni<sup>3</sup>, Eduardo Garcia<sup>3</sup>, Luise Meurer<sup>4</sup>,  
Jaqueline Nascimento Picada<sup>5</sup> and Norma Possa Marroni<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Experimental Hepatology and Physiology, Porto Alegre Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, <sup>2</sup>Methodist University Center, Porto Alegre, <sup>3</sup>Laboratory of Hepatology and Pneumology, Federal Faculty of Medical Sciences of Porto Alegre, <sup>4</sup>Department of Pathology, Clinical Hospital of Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre,

<sup>5</sup>Laboratory of Genetic Toxicology, Lutheran University of Brazil, Canoas, and <sup>6</sup>Laboratory of Oxidative Stress, Lutheran University of Brazil, Canoas, Brazil

(Received June 18, 2007; Accepted September 18, 2007)

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate the potential antioxidant effects of N-acetylcysteine in hepatopulmonary syndrome, a complication of cirrhosis, using an experimental model of common bile duct ligation in rats. Male Wistar rats were divided into four experimental groups: CBDL (animals submitted to common bile duct ligation); Sham (animals submitted to simulated common bile duct ligation); Sham + N-acetylcysteine, and CBDL + N-acetylcysteine. N-acetylcysteine (10 mg/kg, intraperitoneally) was administered for 2 weeks starting on day 14 after surgery. Some alterations in the liver integrity were investigated by evaluation of serum enzymes aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, and arterial blood gases. Lipoperoxidation by thiobarbituric acid-reactive substances assay, superoxide dismutase activity and total nitrates was measured as parameters of oxidative stress, performed on lung homogenates. Micronucleus assay in bone marrow and comet assay in lung, liver and blood were performed to assess the genotoxic effects by oxidative stress. The results showed an improvement in the enzymatic parameters and arterial blood gases, a reduction of lipoperoxidation and in the total nitrates after treatment with N-acetylcysteine. Histological analysis showed vasodilatation in the lung, which was reversed by N-acetylcysteine. Micronuclei frequency and DNA damage in lung and liver were increased in the CBDL group. N-Acetylcysteine caused no genotoxic effect and did not influence the induction of micronucleus in bone marrow and DNA damage in lung and liver. The results suggest protective effects after treatment with N-acetylcysteine in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome.

Changes in gas diffusion and gas exchanges are common in patients with chronic liver diseases. The principal pulmonary alteration is reduced arterial oxygenation seen in liver disease and/or portal hypertension that characterize the hepatopulmonary syndrome (HPS) [1–3]. The mechanism of hypoxaemia in HPS is described as a combination of the following factors: intrapulmonary shunt, ventilation/perfusion ratio imbalance and low oxygen diffusion due to disseminated intrapulmonary vasodilatation, even in normal lung tissue [4,5].

Hepatopulmonary syndrome occurs in at least 15% of patients with end-stage liver disease [2,5]. The anomalies found in vascular and lung tissues usually are considered complications or consequences of hepatic dysfunctions in the HPS [5]. Thus, new therapeutic approaches should be evaluated with the aim of diminishing liver injury and increasing the survival of patients with HPS.

Chang and Ohara [6] reported that biliary cirrhosis induced by common bile duct ligation (CBDL) in rats result in a decrease in pulmonary vascular resistance and gas exchange abnormalities analogous to those found in human disease, and thus provided a model system to study HPS [6].

The pulmonary vasodilatation observed in the CBDL model has been related to increased pulmonary nitric oxide, a potent vasodilator. Bacterial translocation is found in 45–75% of animals with CBDL, which favours the entry of cytokines and endotoxins into the pulmonary circulation [7]. In large amounts, cytokines and nitric oxide become toxic and are major oxidative sources. Phagocytic cells that generate the superoxide anion radical, a free radical that can oxidize the plasma membrane, produce a large quantity of reactive oxygen species (ROS) [8,9].

N-acetylcysteine is a thiolic compound that contains a sulfhydryl group donor, serving as a precursor of glutathione synthesis and inhibits the formation of ROS [10]. N-acetylcysteine is currently investigated in clinical trials and experimental models of various respiratory conditions, such as chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis. It has also been used in acetaminophen poisoning and in experimental models of cirrhosis and portal hypertension [11].

In addition, N-acetylcysteine has been shown to be an antigenotoxic agent, exhibiting protective effects against DNA oxidative damage by its antioxidant properties [12–14]. Furthermore, it may decrease cytogenetical damage produced by exposure to cigarette smoke [15], and mutagenic agents as urethane and 2-acetylaminofluorene [16] in rodents, suggesting chemopreventive effects.

Author for correspondence: Norma Possa Marroni, Laboratory of Oxidative Stress, Lutheran University of Brazil, Av. Farroupilha, 8001, Canoas 92420-280, RS, Brazil (fax +55-51-34771313, e-mail nmarroni@terra.com.br).



In a previous study, administration of N-acetylcysteine at 8.2 mg/kg in biliary-obstructed rats normalized glutathione concentration to levels comparable to those in control animals [17]. This study suggested that N-acetylcysteine may be a useful agent to preserve liver function in patients with biliary obstruction. However, the pulmonary anomalies were not evaluated in that study.

The present study was undertaken to investigate whether treatment with 10 mg/kg of N-acetylcysteine might improve pulmonary and hepatic functions, preventing oxidative stress in CBDL-induced cirrhosis in rats. The N-acetylcysteine-antioxidant potential was evaluated by superoxide dismutase (SOD) activity, lipoperoxidation and quantification of nitrite and nitrate from cirrhotic and non-cirrhotic rats 14-day treated or untreated with N-acetylcysteine. Bone marrow micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis assay (or comet assay) in blood, and in the target tissues (lung and liver) were performed, in order to investigate the effects of N-acetylcysteine on genotoxic parameters in this model. Complementary assays were used to evaluate the integrity of liver and lung tissues.

### Materials and Methods

**Animals.** Twenty-four male Wistar rats (mean weight = 250 g) were obtained from the Laboratory Animals Breeding Center, UFRGS, Brazil. The animals were kept in plastic boxes (47 × 34 × 18 cm) lined with wood shavings on a 12-hr light:dark cycle and at temperatures between 20–25°. Water and food were provided *ad libitum*. All experimental procedures were performed in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and with the consent of the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

**Experimental model.** Secondary biliary cirrhosis was induced by CBDL, according to recommendations described in Kountouras *et al.* [18] and reviewed in Chang and Ohara [6]. The animals were randomized and divided into four groups with six animals per group. Group 1 (Sham), group 2 (CBDL), group 3 (Sham + N-acetylcysteine) and group 4 (CBDL + N-acetylcysteine). The animals of groups 1 and 3 were submitted to simulated CBDL and the animals of groups 2 and 4 were submitted to CBDL. Briefly, after the animals were anaesthetized (ketamine hydrochloride 100 mg/kg, and xylazine 10 mg/kg, intraperitoneally), they underwent mid-ventral laparotomy, dissection of the common bile duct at the exit from the pancreatic ducts and ligation by means of two knots and later sectioning between them.

Starting on the day 14 after surgery, 10 mg/kg of N-acetylcysteine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; CAS registry number 616-91-1) dissolved in 0.6 ml of 0.9% NaCl were administered once a day, in animals of groups 3 and 4, by intraperitoneal injection. The animals of groups 1 and 2 were treated with saline solution (0.9% NaCl, by intraperitoneal injection). On day 28, the animals were anaesthetized and killed by exsanguinations, due to the fact that in prior experiments, after 28 days from CBDL, they had a high mortality; thus, a 14-day treatment with N-acetylcysteine was considered as the most suitable.

The mortality among cirrhotic animals treated with saline increased after day 28. Thus, a 14-day treatment with N-acetylcysteine was considered as the most suitable.

**Liver enzymes and arterial gasses.** On day 28, blood was collected from the retro-ocular sinus for the analysis of serum enzymes:

aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) [19]. Next, the abdominal region was shaved for mid-ventral laparotomy, and blood was collected from the abdominal aorta to measure arterial gases. An ABL 700 analyser (Radiometer, Copenhagen, Denmark) and the electrophoresis method were used for the analyses.

**Micronucleus assay.** The micronucleus assay was performed according to the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program [20,21]. Bone marrow from both femurs was suspended in foetal calf serum and smears on clean glass slides were made according to MacGregor *et al.* [22]. Slides were air-dried, fixed in methanol, stained in 10% Giemsa and coded for a 'blind' analysis. To avoid false negative results and as a measure of toxicity on bone marrow, the polychromatic erythrocytes (PCE):normochromatic erythrocytes (NCE) ratio was scored in 1000 cells. The incidence of micronuclei (MN) was observed in 2000 PCE for each animal [23].

**Comet assay.** The alkaline comet assay was carried out as described by Tice *et al.* [24] with minor modifications by Picada *et al.* [25]. Each lung and liver specimen was placed in 0.5 ml of cold phosphate-buffered saline solution, and minced into fine pieces in order to obtain a cell suspension. The lung, liver and peripheral blood cell suspensions (5 µl) were embedded in 95 µl low melting point agarose at 0.75% (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) and spread on agarose-precoated microscope slides. After solidification, slides were placed in lysis buffer solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 10.0), with freshly added 1% Triton X-100 (Sigma Chemical Co.) and 10% dimethyl sulfoxide for a minimum of 1 hr and a maximum 1 week at 4°C. Subsequently, the slides were incubated in freshly prepared alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) for 20 min., at 4°C. An electric current of 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) was applied for 15 min. to induce DNA electrophoresis. The slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), stained with silver as described by Nadin *et al.* [26] and analysed using a microscope. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analysed from each animal. Cells were also visually scored according to tail size into five classes ranging from undamaged (0), to maximally damaged (4), resulting in a single DNA damage score for each animal, and consequently for each studied group. Therefore, the damage index could range from 0 (completely undamaged, 100 cells × 0) to 400 (with maximum damage, 100 × 4). The damage frequency (%) was calculated based on number of cells with tail versus those with no tail [27].

**Biochemical analysis.** The lung and liver of the animals were removed and weighed; the anterior portion of the lower right lobe of the lung was reserved for histological analysis and the rest was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80° for later analyses. The frozen tissue was homogenized in Ultra-Turrax (IKA-WERK) in phosphate buffer solution (KCl 140 mmol/l, phosphate 20 mm/l, pH 7.4) and centrifuged at 2195 ×g for 10 min. Lipoperoxidation was measured using the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assay and 3 mg of sample/protein [28]. Cytosolic SOD (EC 1,15,11) was assayed by rate of epinephrine auto-oxidation, which is progressively inhibited by amounts of SOD in the homogenate [29]. The Griess reaction was used for the quantification of nitrite (NO<sub>2</sub>) and nitrate (NO<sub>3</sub>) [30].

**Histological analysis.** Lung tissue was collected and kept for 12 hr in 10% formaldehyde solution. After routine processing, tissue was embedded in paraffin and haematoxylin and eosin staining slides were obtained. The histological examination was performed in the Laboratory of Pathology at Hospital de Clínicas de Porto Alegre by a pathologist blinded to study groups. The alveolar capillaries were selected for computed morphometric evaluation, which was conducted with a microscope equipped with a digital camera and connected to an image capture board of a computer running the Image-Pro Plus by Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA.

372

RAFAEL VERCELINO ET AL.

Table 1.

Serum enzymes and liver-to-body and lung-to-body weight ratios from rats cirrhotic and non-cirrhotic treated or untreated with N-acetylcysteine.

Groups	Serum enzymes			Weight ratios	
	AST (U/l)	ALT (U/l)	ALP (U/l)	Liver-to-body	Lung-to-body
1	98.4 ± 13.5	56.7 ± 4.6	138.8 ± 18.4	2.8 ± 0.1	0.4 ± 0.02
2	674.8 ± 38.1	158.0 ± 8.8	407.0 ± 34.0	6.0 ± 0.5	0.6 ± 0.04
3	85.9 ± 7.4	48.0 ± 2.8	146.3 ± 17.9	3.0 ± 0.2	0.4 ± 0.05
4	371.5 ± 63.8	103.8 ± 21.6	309.0 ± 75.3	3.5 ± 0.3	0.4 ± 0.04
P-values					
2 versus 1 and 3	0.001	0.001	0.01	0.001	0.001
2 versus 4	0.001	0.01	–	0.001	0.001
4 versus 1 and 3	0.001	0.01	0.05	–	–

Group 1: Sham; group 2: CBDL (common bile duct ligation); group 3: Sham + N-acetylcysteine; group 4: CBDL + N-acetylcysteine. Data are expressed as mean ± S.E.M. AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase.

*Statistical analysis.* Data were analysed using ANOVA. The statistical evaluation of data from comet assay and micronucleus assay were carried out using Tukey's test. *Post hoc* comparisons were carried out using the Student–Newman–Keuls test. In all comparisons, P-value of <0.05 was considered as statistically significant.

### Results

Table 1 shows the values of serum enzymes and liver-to-body and lung-to-body weight ratios of the different groups. There was a significant increase in AST, ALT and ALP enzymes of animals in group 2 (CBDL) in the comparison with group 1 (Sham). In group 4 (CBDL + N-acetylcysteine), these enzymes decreased in comparison with group 2 (CBDL). The liver-to-body and lung-to-body weight ratios were significantly increased in group 2 in comparison with groups 1, 3 and 4.

Table 2 shows the values of arterial gasses. Partial pressure of oxygen, partial pressure of carbon dioxide, and haemoglobin saturation were evaluated in all groups. A reduction in haemoglobin saturation was found in group 2 (CBDL); an increase was found in group 4 (CBDL + N-acetylcysteine) in comparison with group 2.

The evaluation of lipoperoxidation in lung homogenates using TBARS (table 2) revealed an increase in group 2 (CBDL) in comparison with the other groups. TBARS

values detected in group 4 (CBDL + N-acetylcysteine) were close to those of groups 1 (Sham) and 3 (Sham + N-acetylcysteine). The total nitrate values in lung tissue in group 2 (CBDL) were higher than in the other groups (table 2).

Superoxide dismutase activity in lung homogenates (fig. 1) was lower in group 2 (CBDL) than in the other groups. SOD activity in group 4 (CBDL + N-acetylcysteine) was greater than in group 2 (CBDL) but lower than in groups 1 (Sham) and 3 (Sham + N-acetylcysteine).

As shown in table 3, a similar PCE/NCE ratio was detected in all groups, indicating no toxicity in bone marrow of the animals. The groups 1 (Sham) and 3 (Sham + N-acetylcysteine) showed comparable frequency of micronucleus. Besides, there was an increase in the frequency of micronucleus in group 2 (CBDL) in comparison with group 1. However, the frequency of micronucleus was not altered by the treatment with N-acetylcysteine (group 4; CBDL + N-acetylcysteine), showing value like CBDL-untreated animals (group 2).

In the comet assay, data showed a significant increase in baseline DNA damage in lung and liver, but not in blood from group 2 (CBDL), as measured by damage index and damage frequency, in comparison with group 1 (Sham) (table 4). Measurement of DNA damages of blood, lung and liver from group 3 (Sham + N-acetylcysteine) showed no significant

Table 2.

Blood gasses, TBARS and nitric oxide metabolites from rats cirrhotic and non-cirrhotic treated or untreated with N-acetylcysteine.

Groups	Blood gasses			LPO	Nitric oxide metabolites
	PO <sub>2</sub> (mmHg)	PCO <sub>2</sub> (mmHg)	SatO <sub>2</sub> /Hb (%)	TBARS (nmol/mg protein)	Total nitrate (µmol/l)
1	93.3 ± 8.9	45.3 ± 4.0	95.8 ± 0.8	0.56 ± 0.12	92.6 ± 6.9
2	47.5 ± 4.5	70.2 ± 3.2	54.7 ± 5.8	1.01 ± 0.35	163.8 ± 7.0
3	94.0 ± 4.7	51.3 ± 7.3	92.5 ± 3.0	0.62 ± 0.19	104.5 ± 9.3
4	76.4 ± 3.3	55.5 ± 3.0	87.7 ± 1.3	0.63 ± 0.07	109.2 ± 6.6
P-values					
2 versus 1 and 3	0.001	0.01	0.001	0.05	0.001
2 versus 4	0.01	0.05	0.001	0.05	0.001

Group 1: Sham; group 2: CBDL (common bile duct ligation); group 3: Sham + N-acetylcysteine; group 4: CBDL + N-acetylcysteine. Data are expressed as mean ± S.E.M. PO<sub>2</sub>, partial pressure of oxygen; PCO<sub>2</sub>, partial pressure of carbon dioxide; SatO<sub>2</sub>/Hb, haemoglobin saturation; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; LPO, lipoperoxidation.

## N-ACETYL-CYSTEINE EFFECTS IN CIRRHOTIC RATS

373

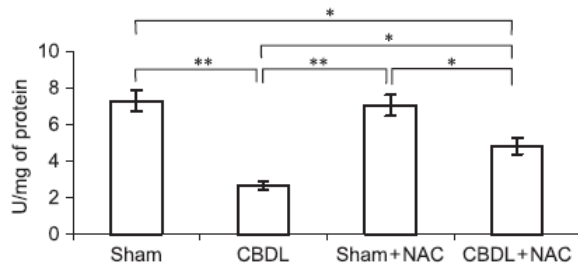


Fig. 1. Superoxide dismutase (SOD) activity in lung homogenates of the different groups. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (\* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ ). CBDL, common bile duct ligation; NAC, N-acetylcysteine.

difference in damage index or damage frequency in comparison with group 1 (Sham) (table 4). There was no significant reduction on DNA damage by the treatment with N-acetylcysteine (group 4), in comparison with the N-acetylcysteine-untreated CBDL animals (group 2). However, it may be observed that the DNA damage from group 4 were less pronounced than from group 2, when both were compared to group 1 (table 4).

The histological analysis of lung tissues from animals in group 1 (Sham) showed normal architecture of pulmonary parenchyma, and vessels with normal diameters (fig. 2). Figure 3 is a photomicrograph of a sample in group 2 (CBDL) showing increased diameter of vessels. Figure 4 is a photomicrograph of a sample in group 4 (CBDL + N-acetylcysteine) showing reduced vasodilatation.

## Discussion

Hepatopulmonary syndrome is a complication caused by cirrhosis, portal hypertension or both, and is characterized by vascular dilatations that lead to changes in the arterial diffusion of gases [4,5]. The ligation of the biliary duct in rats leads to secondary biliary cirrhosis. This model reproduces the main characteristics of HPS, in which oxidative stress may play the main role [31,32].

Table 4.

Comet assay in the blood, lung, and liver from rats cirrhotic and non-cirrhotic treated or untreated with N-acetylcysteine.

Tissue	Groups	Damage index	Damage frequency
Blood	1	6.1 $\pm$ 3.9	5.9 $\pm$ 3.5
	2	6.4 $\pm$ 3.0	5.4 $\pm$ 3.5
	3	6.3 $\pm$ 4.6	5.5 $\pm$ 4.7
	4	5.7 $\pm$ 2.3	5.4 $\pm$ 2.1
Lung	1	31.2 $\pm$ 16.2	22.6 $\pm$ 12.2
	2	93.1 $\pm$ 39.0**	60.0 $\pm$ 20.6***
	3	51.3 $\pm$ 24.6	33.7 $\pm$ 9.5
	4	70.6 $\pm$ 27.7	47.6 $\pm$ 13.5*
Liver	1	15.6 $\pm$ 3.7	11.2 $\pm$ 2.8
	2	116.3 $\pm$ 38.8***	65.9 $\pm$ 21.4***
	3	32.3 $\pm$ 24.3	19.0 $\pm$ 10.6
	4	96.4 $\pm$ 45.6**	48.4 $\pm$ 18.9**

Group 1: Sham; group 2: CBDL (common bile duct ligation); group 3: Sham + N-acetylcysteine; group 4: CBDL + N-acetylcysteine. Damage index can range from 0 (completely undamaged, 100 cells  $\times$  0) to 400 (with maximum damaged 100  $\times$  4); Damage frequency (%) was calculated based on number of cells with tail versus those with no tail. Different from the group 1; significant difference: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  (ANOVA, Tukey's test).

The antioxidant properties of N-acetylcysteine interfere with the oxidative stress at the genesis of chronic obstructive pulmonary disease [33]. In animal models, it seems to reduce the inflammatory response to antigens, and it has been administered to animals with bronchial asthma [19]. N-Acetylcysteine has been shown to improve tissue oxygenation in patients with fulminant hepatic failure [34] and in animal model [35], to exert a protective effect against hepatic ischaemia-reperfusion injury [36] and to improve hepatic microcirculation after orthotopic liver transplantation [37]. In this study, damage to liver tissue was similar to that seen in other models of induced cirrhosis [17,38,39]. The activity of serum enzymes (AST, ALT and ALP) was reduced in the animals that underwent CBDL and received N-acetylcysteine, which demonstrates the hepatoprotective

Table 3.

Micronucleus test in bone marrow of cirrhotic and non-cirrhotic rats, treated or untreated with N-acetylcysteine.

Groups	Ratio (PCE/NCE)							Per group (mean $\pm$ S.D.)
	Individual values							
1	2.8	2.6	1.6	2.0	1.9	2.1	–	2.1 $\pm$ 0.5
2	2.5	2.2	1.7	1.7	1.5	2.6	2.5	2.1 $\pm$ 0.5
3	1.9	1.5	1.4	1.9	1.6	1.3	2.8	1.8 $\pm$ 0.5
4	1.4	2.6	2.4	2.4	1.4	1.8	–	2.0 $\pm$ 0.5

Groups	Micronucleated polychromatic erythrocytes in 2000 PCE							Per group (mean $\pm$ S.D.)
	Individual values							
1	12	16	11	12	16	12	–	13.2 $\pm$ 2.2
2	42	30	56	50	42	28	29	39.6 $\pm$ 11.0*
3	16	13	13	12	24	18	23	17.0 $\pm$ 4.8
4	61	32	44	42	30	32	–	40.2 $\pm$ 12.0*

Group 1: Sham; group 2: CBDL (common bile duct ligation); group 3: Sham + N-acetylcysteine; group 4: CBDL + N-acetylcysteine. Different from the group 1. \* $P < 0.001$  (ANOVA, Tukey's test). NCE, normochromatic erythrocytes; PCE, polychromatic erythrocytes.

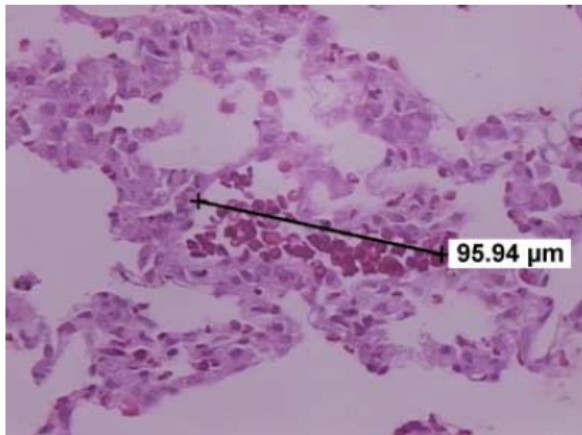


Fig. 2. Photomicrograph of normal pulmonary tissue of animal in group 1 (Sham), showing normal architecture of pulmonary parenchyma and vessels of normal diameter (magnification  $\times 200$ ).

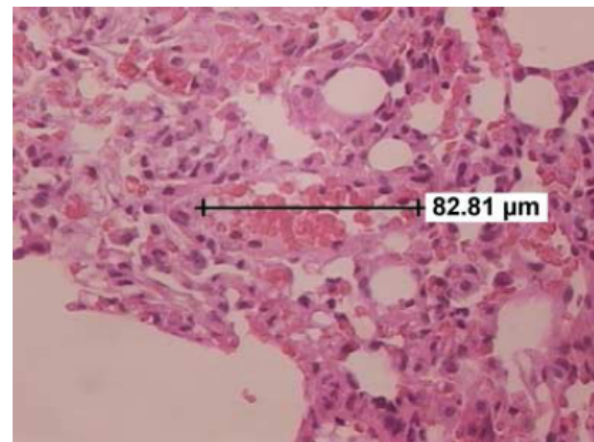


Fig. 4. Photomicrograph of pulmonary tissue of animal in group 4 (CBDL + N-acetylcysteine), showing reduced vasodilatation (magnification  $\times 200$ ).

effect of this drug (table 1). These findings are in agreement with the results reported by Pastor *et al.* [17], who used the same experimental model. In models of liver cirrhosis induced by CBDL or by carbon tetrachloride in association with treatment with flavonoids, similar effects were observed on the values of these enzymes [39–41].

A significant increase in liver-to-body and lung-to-body weight ratios was found in the CBDL group in the comparison with the other groups. The increased liver-to-body weight ratio may be a response to acute hepatocellular damage and to the progressive fibrogenesis in the interstitial space [6]. The reduced lung-to-body weight ratio after N-acetylcysteine administration is conceivably related to a reduction in vascular filtration and a reduced pressure in pulmonary vascular filtration, although this explanation needs to be proven.

A significant reduction in partial pressure of oxygen and haemoglobin saturation was observed in the CBDL group (table 2), which demonstrates a change in gas diffusion in

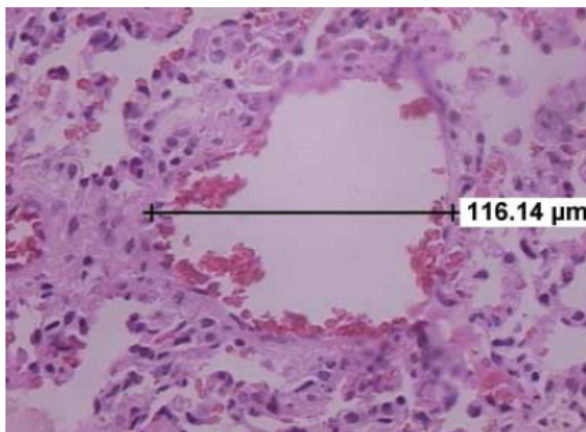


Fig. 3. Photomicrograph of pulmonary tissue of animal in group 3 (CBDL), showing vessels of increased diameter (magnification  $\times 200$ ).

this model. This hypoxaemia may be related to the intrapulmonary vasodilatation caused by the increased production of vasodilating compounds in the pulmonary endothelium, particularly nitric oxide [5,9].

In the CBDL + N-acetylcysteine group, lipoperoxidation values remained close to those in the Sham group (table 2), which may be related to the antioxidant and anti-inflammatory actions of N-acetylcysteine. This action can inhibit the release of the chemotactic factors of neutrophils, hence, decreasing the formation of superoxide anion radicals [42,43].

Besides leading to lipoperoxidation, ROS may induce oxidation of DNA and protein [24]. Oxidative DNA damage is the most common threat to genomic stability. There is strong evidence implicating the generation of ROS and the corresponding responses to oxidative stress as key factors in the pathogenesis of several human diseases. In this study, a significant increase in the frequency of micronucleus in bone marrow (table 3) and an increased DNA damage in target lung and liver tissues (table 4) were observed in the cirrhotic group (CBDL), suggesting increased genomic instability. Probably, these effects were induced by ROS, which are implicated in the pathogenesis of HPS. However, the animals of CBDL + N-acetylcysteine group exhibited almost the same frequency of micronucleus as observed in CBDL animals (group 2) (table 3), demonstrating that N-acetylcysteine can not prevent cytogenetical damage in this model. The DNA damage from the CBDL + N-acetylcysteine group was lower than from the CBDL group, suggesting a tendency for protective effects by N-acetylcysteine treatment of cirrhotic animals, although the data were not statistically significant (table 4). Other studies using comet assay have shown an N-acetylcysteine protective role as scavenger of ROS by decreasing DNA strand breaks and oxidized bases [12–14].

Evaluation of the total nitrate production in lung homogenates revealed greater production of these metabolites in the CBDL group than in the other groups (table 2).

Intrapulmonary vasodilatation (fig. 3) was noted in the CBDL group, probably due to the high level of nitric oxide in pulmonary tissue [44,45]. According to Nunes *et al.* [9] the excessive production of nitric oxide may be associated with endotoxaemia, primarily caused by the activity of pulmonary intravascular macrophages and inducible nitric oxide synthase expression in lung tissue. The total nitrate values in the CBDL + N-acetylcysteine group remained close to those in the Sham group, demonstrating that N-acetylcysteine may have an inhibitory effect on the production of nitric oxide.

A reduction in SOD activity in the lung tissue was observed in the cirrhotic group (CBDL) in comparison with the other groups (fig. 1). Probably, this effect occurs by increased inactivation of this enzyme due to the large amount of superoxide anion radicals in that tissue. Several studies relate to reduction in SOD activity due to the increased oxidative stress [46,47]. The accumulation of cytokines and defense cells in the pulmonary endothelium increase the formation of ROS. Superoxide anion radical ( $O^{\cdot -}$ ) in the lung tissue may associate with nitric oxide, producing peroxynitrite (ONOO $^{\cdot}$ ), a potent oxidant, which may denature protein [8,48]. In the CBDL + N-acetylcysteine group the value of SOD activity in the lung remained close to that in the Sham group (fig. 1), suggesting a protective effect by N-acetylcysteine against lung damages in the CBDL model. N-acetylcysteine can reduce the formation of peroxynitrite by inhibiting production of nitric oxide metabolites. The combination of the thiol component of N-acetylcysteine with nitric oxide produces a compound called nitrothiol [48]. This compound can preserve and accumulate nitric oxide in its biologically active form, and, when it does, may act as an antioxidant by inhibiting the action of ROS in lung tissue. As an antioxidant, nitric oxide may react to the metalloproteinases in cytosol, and thus prevent oxidative reactions and limit cell damage mediated by oxidative stress [33,48].

Lung histological examination revealed an increased diameter of the vessels in the CBDL group (fig. 3), a phenomenon that characterizes the HPS. This finding is in agreement with those reported in other studies that used the same model to investigate HPS [17,39,41]. The CBDL + N-acetylcysteine group showed reduction of the pulmonary vasodilatation (fig. 4) and hepatic injury, probably due to the antioxidant potential of N-acetylcysteine, which reduces oxidative damage in animals with CBDL, improves liver function, and, consequently, reduces endotoxaemia and the amount of nitric oxide and ROS in the lung tissue.

The present study is the first to report the use of N-acetylcysteine in animals with common bile duct ligation to reverse the harmful effects on lung tissue. Clearly, these results warrant further studies to characterize the benefits of this drug in the hypoxaemia found in cirrhosis.

#### Acknowledgements

We thank the Research Incentive Fund of Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA) and the staff at Laboratory

of Experimental Hepatology and Physiology of HCPA for their excellent scientific support.

#### References

- 1 Krowka MJ, Dickson ER, Cortese DA. Hepatopulmonary syndrome. Clinical observations and lack of therapeutic response to somatostatin analogue. *Chest* 1993;104:515–21.
- 2 Fallon MB, Abrams GA, McGrath JW, Hou Z, Luo B. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol* 1997;272:G779–84.
- 3 Aboussouan LS, Stoller JK. The hepatopulmonary syndrome. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;14:1033–48.
- 4 Rodriguez-Roisin R, Roca J, Agusti AG, Mastai R, Wagner PD, Bosch J. Gas exchange and pulmonary vascular reactivity in patients with liver cirrhosis. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:1085–92.
- 5 Fallon MB. Mechanisms of pulmonary vascular complications of liver disease: hepatopulmonary syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2005;39 (4 Suppl 2):S138–42.
- 6 Chang SW, Ohara N. Pulmonary circulatory dysfunction in rats with biliary cirrhosis. An animal model of the hepatopulmonary syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:798–805.
- 7 Rabiller A, Nunes H, Lebrec D *et al.* Prevention of gram-negative translocation reduces the severity of hepatopulmonary syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:514–7.
- 8 Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271:C1424–37.
- 9 Nunes H, Lebrec D, Mazmanian M *et al.* Role of nitric oxide in hepatopulmonary syndrome in cirrhotic rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:879–85.
- 10 Lauterburg BH, Corcoran GB, Mitchell JR. Mechanism of action of N-acetylcysteine in the protection against the hepatotoxicity of acetaminophen in rats *in vivo*. *J Clin Invest* 1983;71:980–91.
- 11 Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:6–20.
- 12 Farombi EO. Genotoxicity of chloroquine in rat liver cells: protective role of free radical scavengers. *Cell Biol Toxicol* 2006;22:159–67.
- 13 Zhao J, Liu XJ. Antioxidative and immunomodulatory role of melatonin, sodium selenite, N-acetyl-L-cysteine and quercetin on human umbilical blood. *Pharmazie* 2005;60:683–8.
- 14 Morley N, Curnow A, Salter L, Campbell S, Gould D. N-acetyl-L-cysteine prevents DNA damage induced by UVA, UVB and visible radiation in human fibroblasts. *J Photochem Photobiol B* 2003;72:55–60.
- 15 Balansky RB, D'Agostini F, Zancchi P, De Flora S. Protection by N-acetylcysteine of the histopathological and cytogenetical damage produced by exposure of rats to cigarette smoke. *Cancer Lett* 1992;64:123–31.
- 16 Balansky RM, De Flora S. Interactions between N-acetylcysteine and sodium selenite in modulating the clastogenicity of urethane and 2-acetylaminofluorene in mice. *Int J Cancer* 2004;108:158–61.
- 17 Pastor A, Collado PS, Almar M, Gonzalez-Gallego J. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *J Hepatol* 1997;27:363–70.
- 18 Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984;65:305–11.
- 19 Blesa S, Cortijo J, Mata M *et al.* Oral N-acetylcysteine attenuates the rat pulmonary inflammatory response to antigen. *Eur Respir J* 2003;21:394–400.

- 20 Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1990;239:29–80.
- 21 Miller B, Potter-Locher F, Seelbach A, Stopper H, Utesch D, Madle S. Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. *Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung. Mutat Res* 1998;410:81–116.
- 22 MacGregor JT, Heddle JA, Hite M *et al.* Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res* 1987;189:103–12.
- 23 Picada JN, da Silva KV, Erdtmann B, Henriques AT, Henriques JA. Genotoxic effects of structurally related beta-carboline alkaloids. *Mutat Res* 1997;379:135–49.
- 24 Tice RR, Agurell E, Anderson D *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:206–21.
- 25 Picada JN, Flores DG, Zettler CG, Marroni NP, Roesler R, Henriques JA. DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;114:80–5.
- 26 Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem* 2001;49:1183–6.
- 27 Viana CC, de Oliveira PA, Brum LF, Picada JN, Pereira P. Gamma-decanolactone effect on behavioral and genotoxic parameters. *Life Sci* 2007;80:1014–9.
- 28 Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973;134:707–16.
- 29 Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170–5.
- 30 Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol* 1999;301:49–61.
- 31 Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Marroni CA, Marroni N. [Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress]. *Arq Gastroenterol* 2005;42:244–8.
- 32 Tieppo J, Marroni N. Efeito da Quercetina no Pulmão de Ratos com Ligadura de Ducto Biliar Comum-Um modelo de Síndrome Hepatopulmonar. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, 2006.
- 33 Dekhuijzen PN. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2004;23:629–36.
- 34 Harrison PM, Wendon JA, Gimson AE, Alexander GJ, Williams R. Improvement by acetylcysteine of hemodynamics and oxygen transport in fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* 1991;324:1852–7.
- 35 San-Miguel J, Blade J. Perspective on the current use of bortezomib in multiple myeloma. *Haematologica* 2006;91:871–2.
- 36 Nakano H, Boudjema K, Alexandre E *et al.* Protective effects of N-acetylcysteine on hypothermic ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Hepatology* 1995;22:539–45.
- 37 Koeppel TA, Lehmann TG, Thies JC *et al.* Impact of N-acetylcysteine on the hepatic microcirculation after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1996;61:1397–402.
- 38 Montero EF, Quireze C Jr, d'Oliveira DM. Bile duct exclusion from selective vascular inflow occlusion in rat liver: role of ischemic preconditioning and N-acetylcysteine on hepatic reperfusion injury. *Transplant Proc* 2005;37:425–7.
- 39 Peres W, Tunon MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, Gonzalez-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol* 2000;33:742–50.
- 40 Pavanato A, Tunon MJ, Sanchez-Campos S *et al.* Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2003;48:824–9.
- 41 Tieppo J, Vercelino R, Dias AS *et al.* Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food Chem Toxicol* 2007;45:1140–6.
- 42 Tsuji F, Miyake Y, Aono H, Kawashima Y, Mita S. Effects of buccillamine and N-acetyl-L-cysteine on cytokine production and collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol* 1999;115:26–31.
- 43 Okay E, Karadenizli A, Muezzinoglu B, Zeybek U, Arzu Ergen H, Isbir T. N-acetylcysteine attenuates bacterial translocation after partial hepatectomy in rats. *J Surg Res* 2005;127:164–70.
- 44 Titheradge MA. Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:437–55.
- 45 Zhang XJ, Katsuta Y, Akimoto T, Ohsuga M, Aramaki T, Takano T. Intrapulmonary vascular dilatation and nitric oxide in hypoxemic rats with chronic bile duct ligation. *J Hepatol* 2003;39:724–30.
- 46 Warner AE, Brain JD. The cell biology and pathogenic role of pulmonary intravascular macrophages. *Am J Physiol* 1990;258:L1–12.
- 47 Santiard D, Ribiere C, Nordmann R, Houee-Levin C. Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by free radicals derived from ethanol metabolism: a gamma radiolysis study. *Free Radic Biol Med* 1995;19:121–7.
- 48 Failli P, Palmieri L, D'Alfonso C *et al.* Effect of N-acetyl-L-cysteine on peroxynitrite and superoxide anion production of lung alveolar macrophages in systemic sclerosis. *Nitric Oxide* 2002;7:277–82.

## **4.2 Artigo Experimento II**

**Artigo submetido à publicação ao periódico:**

*Journal of Molecular Medicine*

**S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates oxidative stress, MAPK  
activation and fibrosis in cirrhotic rats**

Rafael Vercelino, Irene Crespo, Gabriela F. P. de Souza, Maria Jose Cuevas, Marcelo,  
G. de Oliveira, Norma Possa Marroni, Javier González-Gallego, María Jesús Tuñón

## **S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates oxidative stress, MAPK activation and fibrosis in cirrhotic rats**

**Rafael Vercelino<sup>a</sup>, Irene Crespo<sup>b</sup>, Gabriela F. P. de Souza<sup>c</sup>, Maria Jose Cuevas<sup>b</sup>, Marcelo G. de Oliveira<sup>c</sup>, Norma Possa Marroni<sup>a,d</sup>, Javier González-Gallego<sup>b</sup>, María Jesús Tuñón<sup>b\*</sup>**

*<sup>a</sup>Laboratory of Experimental Hepatology and Physiology, Porto Alegre Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, 90035-903, Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, Brazil.*

*<sup>b</sup>Institute of Biomedicine, University of León and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Campus of Vegazana s/n, PC 24071, León, Spain.*

*<sup>c</sup>Institute of Chemistry, University of Campinas, UNICAMP, PC 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.*

*<sup>d</sup>Laboratory of Oxidative Stress, Lutheran University of Brazil, ULBRA, 92420-280, Av. Farroupilha, 8001, Bairro São José, Canoas, RS, Brazil.*

Short Title: S-nitroso-N-acetylcysteine in cirrhotic rats

\* Corresponding author. Tel.: +34 987 291261; fax: +34 987 291267.

E-mail-adress: [mjtung@unileon.es](mailto:mjtung@unileon.es) .



## ABSTRACT

*Background/aims:* This study was aimed to investigate the molecular mechanisms underlying prevention of hepatic fibrosis by S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC), a nitric oxide donor that inhibits lipid peroxidation.

*Methods:* Secondary biliary cirrhosis was induced by 4 weeks of common bile duct ligation (CBDL). Both sham-operated and CBDL animals received SNAC (6.0  $\mu\text{mol/kg/day}$ ) starting 2 weeks after surgery. Markers of liver injury, oxidative stress and key modulators of liver fibrosis were assessed.

*Results:* SNAC treatment reduced the increase in blood enzyme activities (ALT, AST and alkaline phosphatase), and the histological changes induced by CBDL. The increase in TBARS concentration and hydroperoxide-induced chemiluminescence were also reduced by SNAC treatment. SNAC down-regulated expression of collagen 1 $\alpha$ , alpha-smooth muscle actin, tumour growth factor- $\beta$ , metalloproteinase-2, metalloproteinase inhibitor 1, platelet-derived growth factor and tumour necrosis factor- $\alpha$  in CBDL rats. These effects were accompanied by inhibited activation of extracellular signal-regulated kinases, jun amino-terminal kinases, p38 and Akt.

*Conclusion:* SNAC blocks the elevation of serum markers of hepatic injury and exerts antioxidant and antifibrotic effects in rats with secondary biliary cirrhosis. Results obtained indicate that SNAC, by down-regulating increased expression of several genes and modulating intracellular signaling pathways that contribute to the accumulation of matrix proteins, may be an interesting candidate for the treatment of human fibrosis and cirrhosis.

*Keywords:*

Fibrosis

Oxidative stress

S-nitroso-N-acetylcysteine

Cytokines

MAPK

## 1. Introduction

Liver fibrosis is a common response to chronic liver injury characterized by an accumulation of extracellular matrix proteins that impairs normal liver function with increasing severity [1]. Although even acute injury will activate mechanisms of fibrogenesis, the sustained signals associated with chronic liver disease caused by infection, drugs, metabolic disorders, or immune attack are required for significant fibrosis to accumulate [2]. Without an effective treatment in the early stages, reversible hepatic fibrosis progresses to irreversible cirrhosis, which is one of the leading causes of death worldwide [3]. Since the therapeutic options for cirrhosis complications are often poorly effective, new approaches to the prevention and treatment of hepatic fibrosis are clearly needed [4]. Hepatic fibrosis is typically initiated by hepatocyte damage, leading to recruitment of inflammatory cells and activation of hepatic stellate cells (HSC) [5]. It is widely accepted that the proliferation and activation of HSCs is a key mechanism of fibrogenesis [6]. HSCs exist in the normal liver as quiescent retinoid-storing cells which, in response to liver injury, initially undergo a phenotypic transformation and express  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). A hallmark of HSC activation is altered collagen synthesis, with a marked increase in type I collagen, associated to changes in matrix-degrading metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) [1]. The most potent profibrogenic cytokine known for activated HSCs is transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), and blockade of TGF- $\beta$  signaling by multiple methods prevents progression of liver fibrosis in experimental animals [7]. TGF- $\beta$  stimulates collagen I synthesis and stimulation of extracellular matrix is further enhanced by its inhibitory effect on matrix degradation, increasing the levels of proteases inhibitors [8]. It has been recently shown that tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) has a significant role in the pathophysiological process in the BDL model through up-regulation of TGF- $\beta$  [9]. Another

key cytokine is platelet-derived growth factor (PDGF). PDGF is the most potent mitogen for HSCs and is up-regulated in the fibrotic liver [10]. Its inhibition has been reported to attenuate experimental liver fibrogenesis [11].

The activation and proliferation of HSCs may be regulated by various signal transduction pathways. Among them, recent research has shown that the mitogen-activated protein kinases (MAPK) may play an important role in the development of hepatic fibrogenesis and in mediating cytokine signaling. MAPKs are a family of serine/threonine kinases with three major types in mammalian cells, extracellular signal-regulated protein kinase (ERK1/2), p38 and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK), which represent a group of proteins involved in the signal transduction of a variety of cellular stimuli [12]. It has been demonstrated that TGF- $\beta$  can activate p38 kinases and Jun amino-terminal kinases (JNK) [13,14], and p38 or ERK inhibition significantly inhibit TGF- $\beta$  mediated induction of 1 $\alpha$  collagen gene expression [8,15]. PDGF is also known to activate MAPK signaling [16,17]. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway is also activated following stimulation of HSC [18]. PDGF-induced Akt phosphorylation has been reported to occur in CBDL rats [17], and a cross-talk appears to occur between the PI3K-Akt and MAPK pathways [2].

Reactive oxygen species (ROS) are oxygen-based molecules that can be generated in damaged tissues. ROS production is counterbalanced by antioxidants such as superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) or glutathione peroxidase to maintain an appropriate redox balance [19]. Oxidative stress, appearing when there is a loss of the equilibrium due to increased production and/or decreased antioxidants, has been documented in cirrhotic patients and in animals [5], and an increasing volume of literature suggests that ROS are involved in the development of hepatic fibrosis and that they induce HSC proliferation and collagen synthesis [20] through complex processes involving modulation of the expression and activity of different fibrogenic mediators and lipid peroxidation-derived reactions [21,22]. Moreover,

there is an interaction between TGF- $\beta$  and ROS formation, with the first increasing the production of ROS, which in turn induce the expression of  $\alpha 1$  procollagen [23]. Different studies have shown that down-regulation of ROS and inhibition of oxidative stress could be a potential and effective therapeutic strategy for treatment and prevention of liver fibrogenesis [24-26]. It has been reported that the antioxidant thiol, N-acetylcysteine (NAC), decreases nitrotyrosilation of proteins, increases expression of superoxide dismutase and inhibits over-expression of type III procollagen in rats with biliary cirrhosis [27,28]. S-nitrosation of NAC originates the S-nitrosothiol S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC). This molecule is a potent nitric oxide donor [29], which compared to the free thiol (NAC), can be a more powerful terminator of radical chain propagation reactions by reacting with ROO $\cdot$  radicals, yielding nitro derivatives and end-products as well as dimmers RS-SR [30]. Previous studies have shown that SNAC prevents nonalcoholic fatty liver disease induced by a choline-deficient diet in rats [31] and promotes down regulation of several genes linked to glutathione synthesis and fatty acid metabolism [32,33]. The aim of this research was to evaluate the effects of SNAC administration on oxidative stress and fibrosis reduction in rats with biliary cirrhosis, a well-described experimental model of liver cirrhosis [34].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male Wistar rats (mean weight = 250 g) were obtained from the Laboratory Animals Breeding Center, UFRGS, Brazil. The animals were kept in plastic boxes (47 $\times$ 34 $\times$ 18 cm) lined with wood shavings on a 12-hr light: dark cycle and at temperatures between 20-25 $^{\circ}$ . Water and food were provided *ad libitum*. The procedures with animals were performed

according to National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and with the consent of the Ethics Committee of the Porto Alegre Clinical Hospital, Brazil.

## 2.2. *Experimental model*

Secondary biliary cirrhosis was induced by common bile duct ligation (CDBL), according to recommendations described in Kountouras et al. [34]. The animals were randomized and divided into four groups with ten animals per group. Group 1 (Sham), group 2 (Sham + SNAC), group 3 (CDBL) and group 4 (CDBL + SNAC). The animals of groups 1 and 2 were submitted to simulated CDBL and the animals of groups 3 and 4 were submitted to CDBL. Briefly, after the animals were anaesthetized (ketamine hydrochloride 100 mg/kg, and xylazine 10 mg/kg, intraperitoneally), they underwent midventral laparotomy, dissection of the common bile duct at the exit from the pancreatic ducts and ligation by means of two knots and later sectioning between them. Starting on the day 14 after surgery, 6.0  $\mu\text{mol/kg}$  of SNAC were administered daily by gavage to animals of groups 2 and 4. The animals of groups 1 and 2 were treated with saline solution (0.9% NaCl by gavage). All animals were treated by 14 days after CDBL. On day 28, the animals were anaesthetized using ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and blood was collected from the retro-ocular sinus for the analysis of serum enzymes. The livers were removed, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}$  for later analyses.

## 2.3. *SNAC synthesis*

SNAC was synthesized as described elsewhere [29] from the S-nitrosation reaction of NAC (Sigma Chemical, St. Louis, MO) with equimolar sodium nitrite solution. The final

solution was stirred at room temperature for 15 min protected from light with aluminum foil. Stock SNAC solutions were further diluted in PBS solution at pH 7.4, before administration.

#### *2.4. Histological analysis*

Liver samples from each rat, including sham-operated animals, were collected and kept for 12 h in 10% formaldehyde solution, cleared with xylene and embedded in paraffin. In the next stage, 3  $\mu\text{m}$  sections were cut through the blocks of paraffin embedded tissue with a microtome (Leitz® 1512, Ernst Leitz, Vienna, Austria). After routine processing, the histological cuts were stained with hematoxylin and eosin and picosirius red stain. The cuts were dehydrated with increasing alcohol graduation and clarified in xilol. After the staining procedure, slides were covered with glass coverslips using Entellan (Merck, Darmstadt, Germany) as an adhesive. Qualitative analysis was carried out using a Nikon Labophot optical microscope (Tokyo, Japan). Percentage of fibrosis in the liver tissue was determined by histomorphometric analysis using a microscope equipped with a digital camera and connected to an image capture board of a computer running the Image-Plus software. After analyzing twenty random fields per slide, the ratios of connective tissue to the whole liver area were calculated. The histological examination was performed by a pathologist blinded to study groups.

#### *2.5. Biochemical analysis*

Blood was collected into a heparinized glass capillary from the retro-ocular sinus for the analysis of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and alkaline phosphatase (ALP), which were determined by commercial kits (Boehringer Mannheim,

Mannheim, Germany). The hepatic frozen tissue from each rat was homogenized in ice-cold phosphate buffer (KCl 140 mM, phosphate 20 mM, pH 7.4) and centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. Cytosolic superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) was assayed according to Misra and Fridovich [35] at 30 °C. The rate of auto-oxidation of epinephrine, which is progressively inhibited by increasing amounts of SOD in the homogenate, was monitored spectrophotometrically at 560 nm. The amount of enzyme that inhibits epinephrine auto-oxidation at 50% of the maximum inhibition was defined as 1U of SOD activity. Oxidative stress was determined by measuring the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) [36] and the hydroperoxide-initiated chemiluminescence (QL) [37]. The amount of aldehydic products generated by lipid peroxidation was quantified by the thiobarbituric acid reaction using 3 mg of protein per sample. Results were referred as TBARS. The samples were incubated at 90 °C for 30 min after adding 500 µl of 0.37% thiobarbituric acid in 15% trichloroacetic acid, then centrifuged at 4 °C at 2,000 g for 15 min. Spectrophotometric absorbance was determined in the supernatant at 535 nm. For the QL determination, 0.5 ml of homogenate were added to 120 mM KCl, 30 mM phosphate buffer (pH 7.4), and 3 mM tert-butyl hydroperoxide at 30 °C and assayed for chemiluminescence in a liquid scintillation counter in the out-of-coincidence mode.

Nitrite/nitrate concentrations ( $\text{NO}_x^-$ ) in samples of liver homogenates were measured using an ozone chemiluminescence-based NO analyzer (Model 280 - NOA - Sievers Instruments, Boulder, Colorado, USA). Briefly, liver homogenates prepared as described in “Western Blot analysis” were deproteinized by adding zinc sulphate and sodium hydroxide, centrifuged at 10,000 g for 12 min and the supernatants were collected for analysis. Aliquots of supernatants were injected in a glass purge vessel containing vanadium (III) chloride in 1 molL<sup>-1</sup> HCl solution at 97 °C, under a nitrogen atmosphere. In these conditions, nitrites and nitrates were chemically reduced to NO gas. A nitrogen stream was continuously bubbled



through the purge vessel and the NO gas formed was carried into the NOA reaction chamber, where it reacted with ozone to produce a chemiluminescent signal. The amount of emitted light is proportional to the NO concentration which was calculated from a standard calibration curve of nitrate solutions. The  $\text{NO}_x^-$  concentrations were corrected for total the protein contents.

## 2.6. Western blot analysis

For Western blot analysis of ERK1/2, phospho-ERK1/2, Akt, phospho Akt, p38, phospho-p38, JNK, and phospho-JNK, liver homogenates were prepared in 0.25 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, and 1% protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The mixture was incubated for 30 min at 4° C and centrifuged 30 min at 13,000 g and 4° C [38,39]. Protein concentration was measured by the Bradford assay. Protein extracts (25-50 µg) were separated by 10-12% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred electrically to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). The membranes were then blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBST) for 30 min at 37° C and probed overnight at 4° C with polyclonal anti-ERK1/2, phospho-ERK1/2, TGF-β (1:200 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), p38, phospho-p38, JNK1, and phospho-JNK1 (1:1,000 Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). After washing with TBST, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with secondary HRP conjugated antibody (Dako, Glostrup, Denmark), and visualized using ECL detection kit (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden). Polyclonal anti-β-actin antibody was used to confirm equal loading of protein (1:1,000 Sigma, St Louis, MO, USA). The density of the

specific bands was quantified with an imaging densitometer (Scion Image, Maryland, MA, USA).

### 2.7. Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted and reverse transcribed using High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) [40]. cDNA was amplified using TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) on a Step One Plus (Applied Biosystems). TaqMan primers and probes for TIMP-1 (GenBank accession No L31883.1 and Rn00587558\_m1), TGF- $\beta$  1 (GenBank accession no X52498.1 and Rn00572010\_m1), collagen, type I, alpha 2 (GenBank accession no AF121217.1 and Rn01526721\_m1), MMP-2 (GenBank accession no U65656.1 and Rn01538170\_m1),  $\alpha$ -SMA (GenBank accession no X06801.1 and Rn01759928\_g1), TNF- $\alpha$  (GenBank accession no AJ002278.1 and Rn99999017\_m1), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GenBank accession no X02231.1 and Rn99999916\_s1) genes were derived from the commercially available TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Relative changes in expression levels were determined using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [41]. The cycle number at which the transcripts were detectable (CT) was normalized to the cycle number of GAPDH gene detection, referred to as  $\Delta CT$ .

### 2.8. Statistical analysis

Results were expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM.) of the mean. Data were analyzed using ANOVA. Post-hoc comparisons were carried out by the Newman-Keuls test. A value of  $p < 0.05$  was regarded as significant. All calculations were performed by using the SPSS 14.0 statistical software (SPSS Inc., Chicago, IL).

### 3. Results

#### *3.1. SNAC treatment reduces the increase in blood enzyme activities and the histological changes induced by CBDL*

Table 1 shows that blood AST, ALT and ALP activities were similar in the untreated sham-operated group and SNAC-treated sham-operated group. Values were significantly higher in untreated CBDL animals, and significantly reduced in the SNAC-treated CBDL group (Table 1). Histological findings demonstrated that the untreated CBDL group had evidence of biliary cirrhosis and nodular liver with intense ductular proliferation and fibrotic bridges, whereas cirrhotic rats treated with SNAC showed a marked reduction in fibrosis and ductular proliferation (Fig. 1). As expected CBDL operation induced a significant increase in the area of liver fibrosis. This effect was markedly reduced in cirrhotic animals receiving SNAC (Table 1).

#### *3.2. SNAC treatment ameliorates oxidative stress and SOD activity changes in the liver of CBDL rats*

TBARS concentration and hydroperoxide-induced chemiluminescence were significantly increased in rats with cirrhosis when compared with sham-operated animals, confirming the presence of oxidative stress in liver tissue associated to cirrhosis. Values were significantly reduced in the SNAC-treated CBDL group. The significant increase in SOD activity observed in CBDL animals was partially abolished by SNAC treatment (Table 2).

### *3.3. SNAC treatment does not significantly change nitrite/nitrate concentration in liver tissue*

Table 2 shows the liver  $\text{NO}_x^-$  concentrations in the different experimental groups. Although there was a tendency of increase in the CBDL group, no significant differences were observed among the four groups. Data indicate that SNAC administration does not lead to a local increase of nitric oxide metabolites in the liver.

### *3.4. SNAC treatment influences HSC activation and down-regulates the expression of genes involved in fibrogenesis in the liver of CBDL rats*

To confirm the activation of HSCs, we assessed by RT-PCR gene expression of  $\alpha$ -SMA and collagen 1 $\alpha$ . mRNA levels for both  $\alpha$ -SMA and collagen  $\alpha$ 1 increased significantly in CBDL rats when compared to sham-operated animals, and these effects were partially prevented by SNAC treatment (Fig. 2). Expression of the profibrogenic cytokines TGF- $\beta$  and PDGF, and TNF- $\alpha$  was also significantly increased in rats with cirrhosis and inhibited by SNAC treatment, with a significant decrease in comparison to untreated CBDL rats (Fig. 3). Bile duct ligation resulted in a significant over-expression of the matrix-degrading metalloproteinases MMP-2 and the tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP-1 which were partially abolished by SNAC (Fig. 4).

### *3.5. SNAC treatment down-regulates the expression of MAPKs and Akt in the liver of CBDL rats*

Mitogen-activated protein kinases have been shown to be implicated in mediating TGF- $\beta$  signal transduction and in collagen  $\alpha$ 1 expression. Western blotting demonstrated a significant increase in phospho-JNK, phospho-p38, and phospho-ERK in the untreated

cirrhotic animals, compared to sham-operated rats. Administration of SNAC to cirrhotic rats significantly decreased the expression of phosphorylated MAPKs when compared to the CBDL untreated group (Fig. 5). Akt is another downstream kinase contributing to cell proliferation. Data obtained indicate that Akt expression significantly increased in the liver of cirrhotic rats, compared with sham-operated animals. Administration of SNAC resulted in a significant decrease of Akt expression in comparison to the untreated CBDL animals (Fig. 5).

#### 4. Discussion

Evidence that fibrosis and even cirrhosis are reversible has intensified the interest in understanding the regulation of matrix degradation and fibrosis resolution, in hopes that therapies might exploit those endogenous pathways that reverse this disease [1]. In this study, the CBDL model [34] was used for evaluating the effect of SNAC on oxidative stress and hepatic fibrosis in rats. Blood levels of liver enzymes (AST, ALT and ALP) were significantly higher in CBDL rats than in sham-operated animals, similarly to previous studies [19,24]. The reduction in enzyme activities observed in animals which underwent CBDL and which received SNAC, suggest a hepatoprotective effect for this S-nitrosothiol molecule. It is also important to note that no significant differences in enzyme levels were observed between the sham and sham + SNAC groups, what indicates an absence of adverse effects due to SNAC administration.

Increased ROS production and oxidative stress have an important role in the pathogenesis of liver fibrosis by inducing HSC proliferation and collagen synthesis [20]. Previous studies have shown that hydroxyl radical and superoxide increase in the blood and liver of CBDL rats [42] and that markers for lipid peroxidation and oxidative DNA damage are also significantly elevated [43], while antioxidant enzyme activities decrease [19]. In the

present work, TBARS concentration and hydroperoxide-induced chemiluminescence indicated, in accordance with those previous studies, the presence of a marked oxidative stress in animals with secondary biliary cirrhosis. This effect was partially abrogated by SNAC treatment, confirming its antioxidant properties. Results are in accordance with the expected ability of SNAC in directly inactivating lipid oxides/peroxides ( $LO^{\bullet}/LOO^{\bullet}$ ) species with the formation of nitrated (LONO/LOONO) products [31]. Scavenging properties of SNAC further arise from the fact that there is a dimerization of thiyl radicals ( $RS^{\bullet}$ ) through the formation of a thermodynamically stable disulphide bond. Therefore, no further propagating radical species arises from the inactivation of oxyl and peroxy radicals [30,31]. During acute and chronic inflammations, superoxide radical is produced at high rates. The biological reactivity of superoxide is tightly controlled by SOD enzyme, which plays an important role in the cell redox balance, since it dismutates the generated free radicals in an attempt to protect the tissue against injury [19]. In the present study, the activity of SOD was increased in the CBDL group in response to oxidative damage. This effect was partially prevented in SNAC-treated rats, which may be related to the antioxidant actions of SNAC. It is significant that the SNAC protective effect was obtained without detectable increase in the levels of nitric oxide, metabolites ( $NO_x^{\bullet}$ ) as measured by chemiluminescence. This result indicates that possible toxic side-effects associated with increased levels of  $NO_x^{\bullet}$  in tissues are absent at the administered SNAC dose. It also reinforces the proposal that SNAC acts as an intact molecule, inactivating radical species in bimolecular reactions not associated with the previous release of nitric oxide from the molecule, once nitrite and nitrate are formed after the reaction of free nitric oxide with oxygen.

So far, the antifibrotic effects of oxygen free radical scavengers have been mainly found *in vitro* using mainly HSC, and very few studies have tested their application *in vivo* in animal models [5,44]. We here explored the potential effects of SNAC on different molecular

pathways involved in the fibrogenic process. It was found that the lower accumulation of histologically detectable fibrosis in SNAC-treated animals was accompanied by a down-regulation of collagen 1 $\alpha$ . This is the prototype constituent of the fibril-forming matrix in fibrotic liver, and the synthesis of large amounts of type I collagen is the most prominent feature of the transformation of activated HSCs [45]. In addition, we observed a decreased expression of  $\alpha$ -SMA, a characteristic cytoskeletal protein markedly expressed by activated HSCs and myofibroblasts [46]. Results are similar to those very recently obtained for HSCs incubated with the nitric oxide donor SIN-1 [47]. Other reports have also shown that myocardial collagen deposit is prevented by SNAC in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice [48].

The role of profibrogenic cytokines is central for the development of liver fibrosis, with progression greatly depending on TGF- $\beta$  production [49]. Previous studies have demonstrated that the antifibrotic effect of different drugs in CBDL rats is associated to their capacity for substantially abrogating TGF- $\beta$  up-regulation in the liver [4]. Of particular interest is the interaction between TGF- $\beta$  and ROS formation. TGF- $\beta$  is a redox-sensitive gene whose expression is up-regulated by ROS and blocked by catalase [25]. In addition, TGF- $\beta$  increases the production of hydrogen peroxide [50] which in turn has been reported to have a direct profibrogenic effect in co-cultures of HSCs with HepG2 cells [51]. In the present study, SNAC treatment inhibited both oxidative stress and TGF- $\beta$  overexpression. This was accompanied by down-regulation of TNF- $\alpha$ , which has been shown to increase in response to oxidative stress and to lead to enhanced TGF- $\beta$  expression in the BDL model [9]. The expression of PDGF is also influenced by extracellular redox changes [21] and nitric oxide donors have been observed to efficiently inhibit PDGF-dependent proliferation and chemotaxis in activated human HSCs [52]. Data here obtained confirm that SNAC also inhibited the PDGF over-expression in rats with secondary biliary cirrhosis.

Our study has shown that bile duct ligation resulted in a marked expression of MMP-2. MMPs are a family of metalloendopeptidases which participate in the activations of HSCs, but may also contribute to regression of liver fibrosis through cleavage of the fibrillar extracellular matrix and promotion of apoptosis [53]. Thus, MMPs play dual roles in liver fibrosis, depending on the timing, and MMP-2 over-expression may be important in the remodeling of matrix during tissue repair process [54]. Different previous studies have documented increased MMP-2 activity in the liver of CBDL rats [4]. Regulation of extracellular matrix synthesis and degradation by MMPs and their inhibitors (TIMPs) is a complex process, and we have found that TIMP-1 was also overexpressed in cirrhotic rats whilst this effect was abolished by SNAC treatment. These results confirm previous data demonstrating a significant MMP and TIMP over-expression after HSC activation and their inhibition by antioxidant supplementation [6,20]. As TIMP-1 has antiapoptotic effects in HSCs [55], decreased expression can be beneficial for liver fibrosis resolution.

Although the exact role of MAPKs in hepatic fibrosis has not been fully elucidated, it is known that at least fifteen genes predominantly associated with the MAPK signal transduction pathway are up-regulated in the fibrotic liver [56]. MAPK signaling by JNK and p38 has been implicated in mediating TGF- $\beta$  signal transduction [13,14], and there is evidence for cross-talk between the ERK signaling pathway and TGF- $\beta$  [8,15]. Increased expression of MAPKs has been previously reported in the liver of CBDL rats [57], a fact confirmed in the present study. We also examined the influence of SNAC in MAPK activation and demonstrated a significant down-regulation of ERK, JNK and p38, suggesting that SNAC can inhibit cellular processes downstream of TGF- $\beta$  signaling. In fact, there is a recent report that in renal tubular epithelial cells ROS mediate TGF- $\beta$ -induced extracellular matrix deposition directly through activation of MAPKs and that this effect may be effectively prevented by antioxidants such as NAC or catalase [58]. The PI3K-Akt pathway is



also important for HSC proliferation in rats subjected to the fibrogenic stimulus, and inhibition of Akt by adenoviral-mediated transduction with a dominant negative form of Akt markedly reduces collagen  $\alpha 1$  mRNA and type I collagen protein levels [18]. Akt may be induced by PDGF [17], and a cross-talk appears to occur between the PI3K-Akt and MAPK pathways are closely related [2]. The fact that SNAC treatment inhibited Akt phosphorylation further reinforces its effect on fibrogenic signaling pathways.

Because SNAC shows marked antioxidant effects, ROS could be suggested as a common signaling modulator explaining its antifibrotic properties. However, due to multiple activities of SNAC and the possibility for direct modification of certain signals and signaling proteins, caution is warranted in interpretation. In fact, beneficial effects of antioxidant molecules are not necessarily associated to an antifibrogenic effects and to down-regulation of pro-fibrogenic mediators. Thus, it has been recently shown that diphenyleneidonium, a potent antioxidant able to capture free radicals and inhibit antiinflammatory gene expression, has a slight effect on collagen  $1\alpha$  in experimental fibrosis, but no significant effect on TGF- $\beta$  expression [59]. The novel compound ME3738, derived from soyasapogenol A, prevents oxidative stress and reduces areas of hepatic fibrosis in CBDL rats, but has no effect on the expression of TGF- $\beta$  and TIMP-1 in CBDL rats [43]. Moreover, although NAC has been reported to decrease type III procollagen expression in rats with biliary cirrhosis [27], recent data also indicate that it does not affect increased expression of TGF- $\beta$ , TIMP-1, PDGF and  $\alpha$ -SAM in a rat model of steatohepatitis [60].

Summing up, results obtained revealed that SNAC blocks the elevation of serum markers of hepatic injury and exerts antioxidant and antifibrotic effects in rats with secondary biliary cirrhosis. Antifibrotic mechanisms include down-regulation of TGF- $\beta$ , PDGF, TNF- $\alpha$ , MMP-2 and TIMP-1. Moreover, SNAC also down-regulates ERK, p38, JNK, and Akt signaling activation induced by bile duct ligation. We conclude that SNAC could provide

insight into new strategies aiming at the prevention of fibrosis. The results of our experiments indicate that SNAC, by down-regulating increased expression of several genes and modulating intracellular signaling pathways that contribute to the accumulation of matrix proteins, may be an interesting candidate for the treatment of human fibrosis and cirrhosis.

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from the Brazilian agencies “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)”, “Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)”, and “Laboratório de Hepatologia e Fisiologia Experimental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HCPA/UFRGS)”. CIBERehd is funded by the “Instituto de Salud Carlos III”. R.V. held a studentship from CAPES. G.F.P.S. held a studentship from “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP”, Project 07/55877-3.

### Figure legends

**Fig. 1.** Microscopic findings in rat livers. Rats underwent common bile duct ligation (CBDL) or a sham operation and received SNAC (6.0  $\mu\text{mol/kg/day}$ ) starting 2 weeks after surgery. 4 weeks after the surgical procedure liver was obtained and fixed in 10% formaldehyde solution. Left column (A, B and C): Paraffin embedded sections were prepared and stained with H&E. Right column (D, E and F): Paraffin embedded sections were prepared and were stained with Picrosirius Red for assessing the presence of collagen. Photomicrographs show representative liver sections at 40 times magnification. A and D: Sham, without fibrosis (F0); B and E: CBDL, Secondary biliary cirrhosis with intense proliferation ductular what is accompanied of fibrosis. There are some parenchymal nodules and diffuse proliferation ductular (F4); C and F: Septal fine fibrosis with discreet proliferation ductular (F2).

**Fig. 2.** The effect of common bile duct ligation (CBDL) and SNAC treatment on  $\alpha$ -SMA and collagen 1 $\alpha$  expression as quantitated by real time polymerase chain reaction analysis. Sham-operated and CBDL rats received SNAC (6.0  $\mu\text{mol/kg/day}$ ) starting 2 weeks after surgery. Liver samples were obtained 4 weeks after the surgical procedure. Relative changes in mRNA levels were determined using the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method. Data, normalized against GADPH, are presented as percentage change from the sham-operated group and expressed as means  $\pm$  SEM from four separate experiments. \* Statistically significant in comparison to sham,  $p < 0.05$ . # Statistically significant in comparison to CBDL,  $p < 0.05$ .

**Fig. 3.** The effect of common bile duct ligation (CBDL) and SNAC treatment on TGF- $\beta$ , PDGF and TNF- $\alpha$  expression as quantitated by real time polymerase chain reaction analysis. Sham-operated and CBDL rats received SNAC (6.0  $\mu\text{mol/kg/day}$ ) starting 2 weeks after

surgery. Liver samples were obtained 4 weeks after the surgical procedure. Relative changes in mRNA levels were determined using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Data, normalized against GAPDH, are presented as percentage change from the sham-operated group and expressed as means  $\pm$  SEM from four separate experiments. \* Statistically significant in comparison to sham,  $p < 0.05$ . # Statistically significant in comparison to CBDL,  $p < 0.05$ .

**Fig. 4.** The effect of common bile duct ligation (CBDL) and SNAC treatment on MMP-2 and TIMP-1 expression as quantitated by real time polymerase chain reaction analysis. Sham-operated and CBDL rats received SNAC (6.0  $\mu\text{mol/kg/day}$ ) starting 2 weeks after surgery. Liver samples were obtained 4 weeks after the surgical procedure. Relative changes in mRNA levels were determined using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Data, normalized against GAPDH, are presented as percentage change from the sham-operated group and expressed as means  $\pm$  SEM from four separate experiments. \* Statistically significant in comparison to sham,  $p < 0.05$ . # Statistically significant in comparison to CBDL,  $p < 0.05$ .

**Fig. 5.** The effect of common bile duct ligation (CBDL) and SNAC treatment on ERK1/2, JNK, p38 and Akt expression as quantitated by Western blot. Sham-operated and CBDL rats received SNAC (6.0  $\mu\text{mol/kg/day}$ ) starting 2 weeks after surgery. Liver samples were obtained 4 weeks after the surgical procedure. Total cellular protein was separated on 9% SDS-polyacrylamide gels followed by immunoblotting for the total amount and the phosphorylated forms of the different proteins. (A) Representative Western blots. (B) Densitometric analysis of Western blots. Data, normalized against  $\beta$ -actin, are presented as percentage change from the sham-operated group and expressed as means  $\pm$  SEM from four separate experiments. \* Statistically significant in comparison to sham,  $p < 0.05$ . # Statistically significant in comparison to CBDL,  $p < 0.05$ .

**Table 1**

The effect of bile duct ligation and SNAC treatment on serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) activities, and on percentage of liver fibrosis. Sham-operated and CBDL rats received SNAC (6.0  $\mu$ mol/kg/day) starting 4 weeks after surgery. Liver samples were obtained 4 weeks after the surgical procedure.

Groups	AST (U/l)	ALT (U/l)	ALP (U/l)	Fibrosis (%)
Sham	111.8 $\pm$ 26.7	42.7 $\pm$ 2.6	110.4 $\pm$ 2.7	0.7 $\pm$ 0.2
Sham + SNAC	107.8 $\pm$ 4.3	53.5 $\pm$ 4.2	125.1 $\pm$ 12.4	0.5 $\pm$ 0.2
CBDL	386.3 $\pm$ 27.9*	159.2 $\pm$ 23.8*	352.4 $\pm$ 42.0*	15.1 $\pm$ 3.4*
CBDL + SNAC	270.8 $\pm$ 19.5*#	83.6 $\pm$ 11.6*#	264.7 $\pm$ 27.5*#	4.3 $\pm$ 1.7*#

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

\* Statistically significant in comparison to sham,  $p < 0.05$ .

# Statistically significant in comparison to CBDL,  $p < 0.05$ .

**Table 2**

The effect of bile duct ligation and SNAC administration on liver TBARS concentration, chemiluminescence (QL), superoxide dismutase (SOD) activity and nitrite/nitrate (NO<sub>x</sub><sup>-</sup>) concentration. Sham-operated and CBDL rats received SNAC (6.0 μmol/kg/day) starting 2 weeks after surgery. Liver samples were obtained 4 weeks after the surgical procedure.

Groups	TBARS (nmol/mg protein)	QL (cps/mg protein)	SOD (U/mg protein)	NO <sub>x</sub> <sup>-</sup> (μmol/g protein)
Sham	0.346 ± 0.01	502 ± 21	6.21 ± 0.33	5.71 ± 0.88
Sham + SNAC	0.328 ± 0.01	480 ± 28	7.75 ± 0.41	4.42 ± 0.61
CBDL	0.624 ± 0.05*	818 ± 31*	12.84 ± 0.32*	7.01 ± 1.53
CBDL + SNAC	0.452 ± 0.03**	554 ± 98 <sup>#</sup>	9.28 ± 0.55**	4.14 ± 0.60

Results are expressed as mean ± SEM.

\* Statistically significant in comparison to sham,  $p < 0.05$ .

\*\* Statistically significant in comparison to CBDL,  $p < 0.05$ .

Figure 1

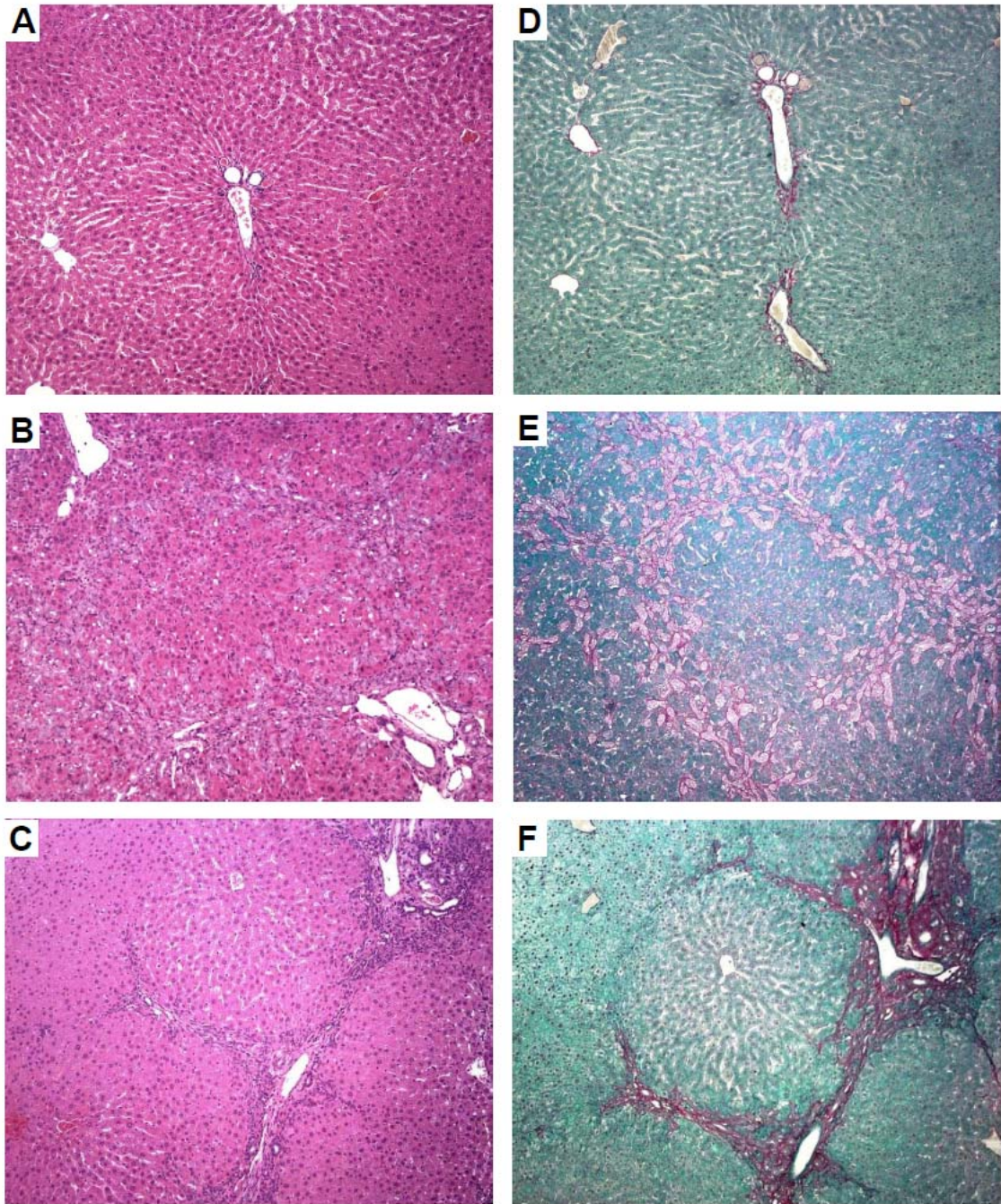


Figure 2

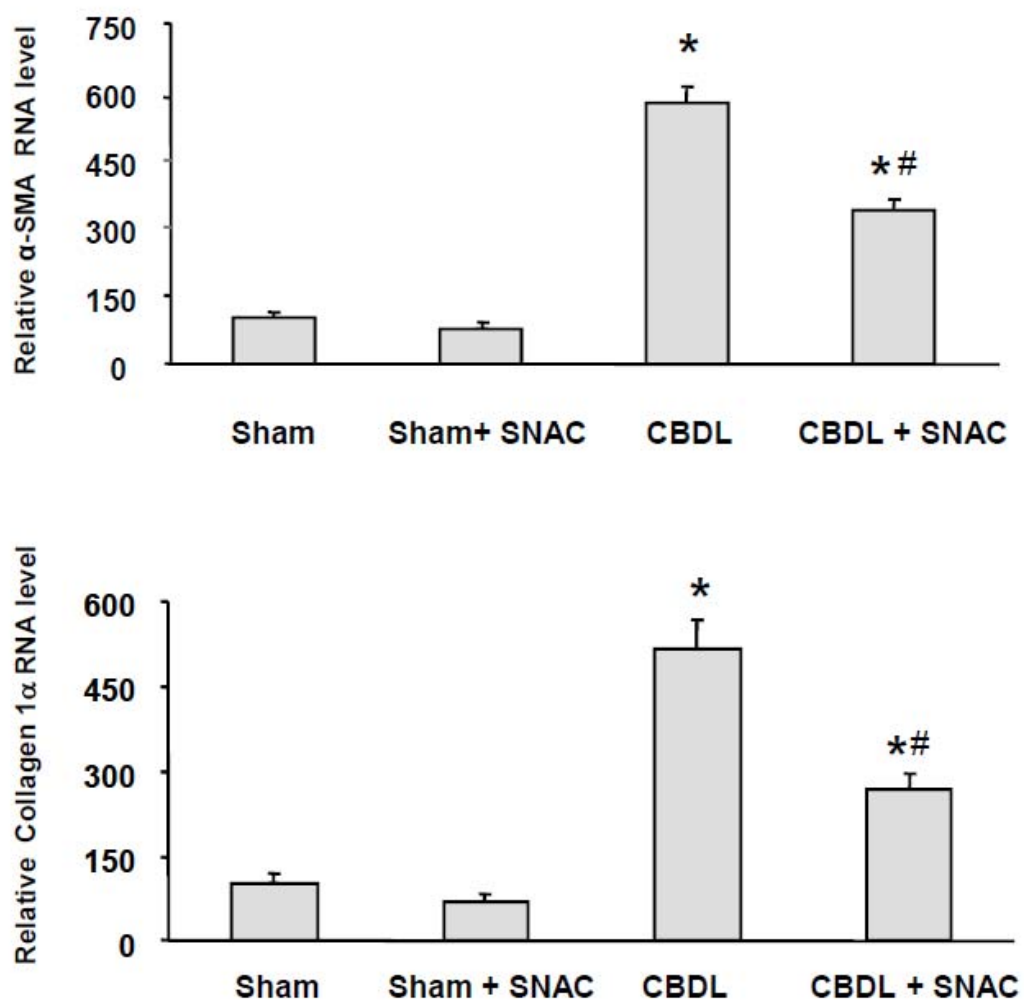




Figure 3

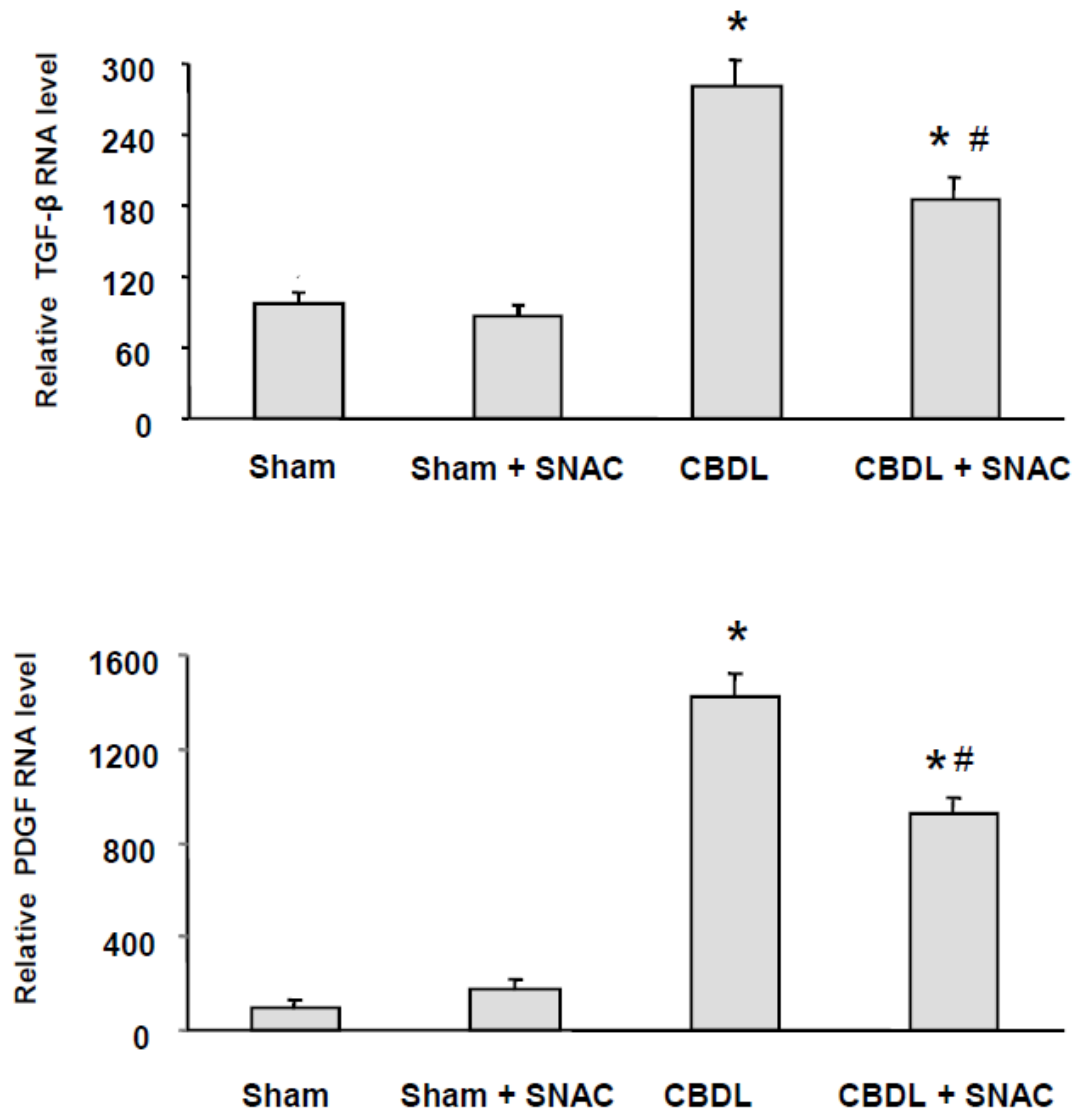


Figure 4

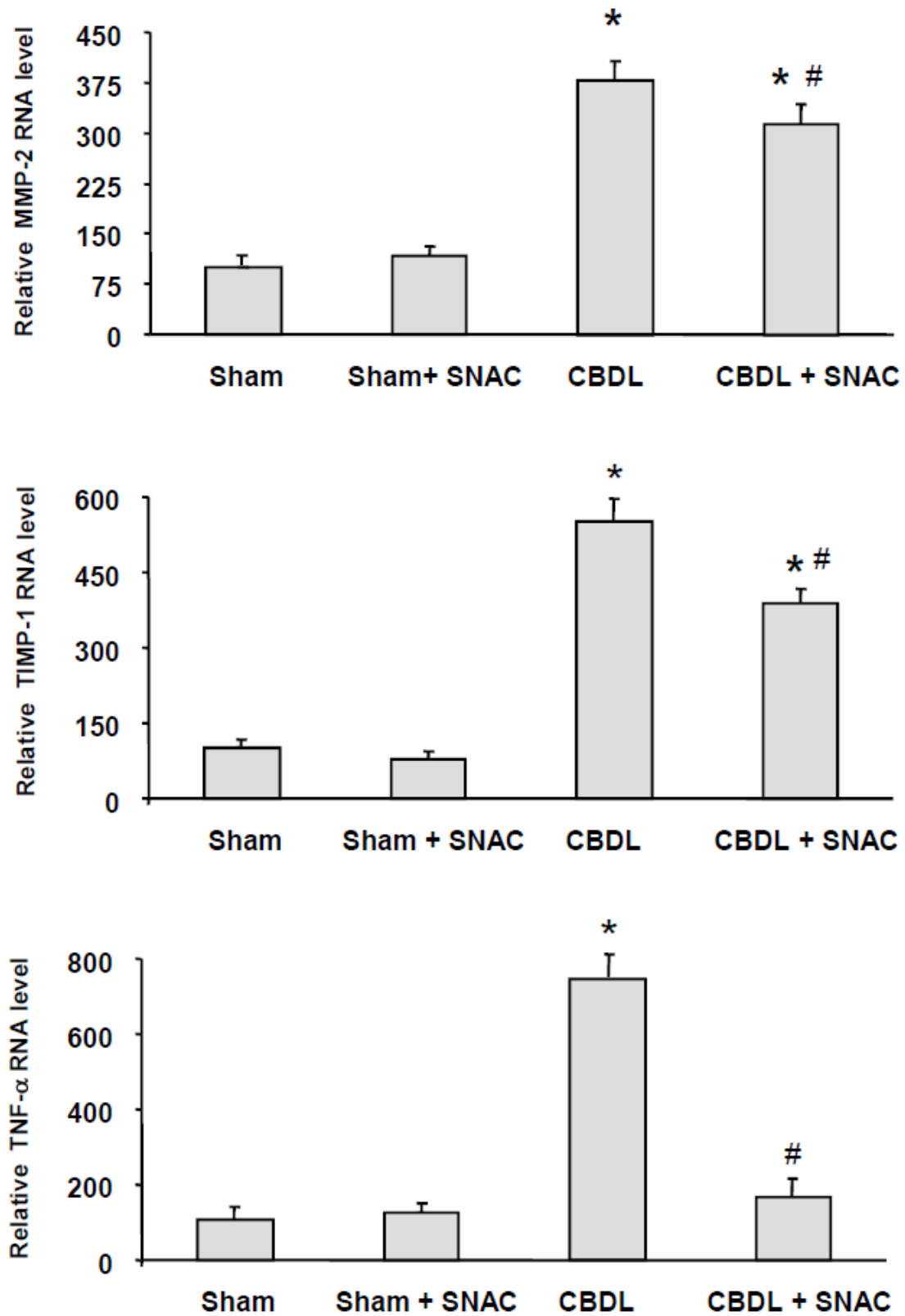


Figure 5 A

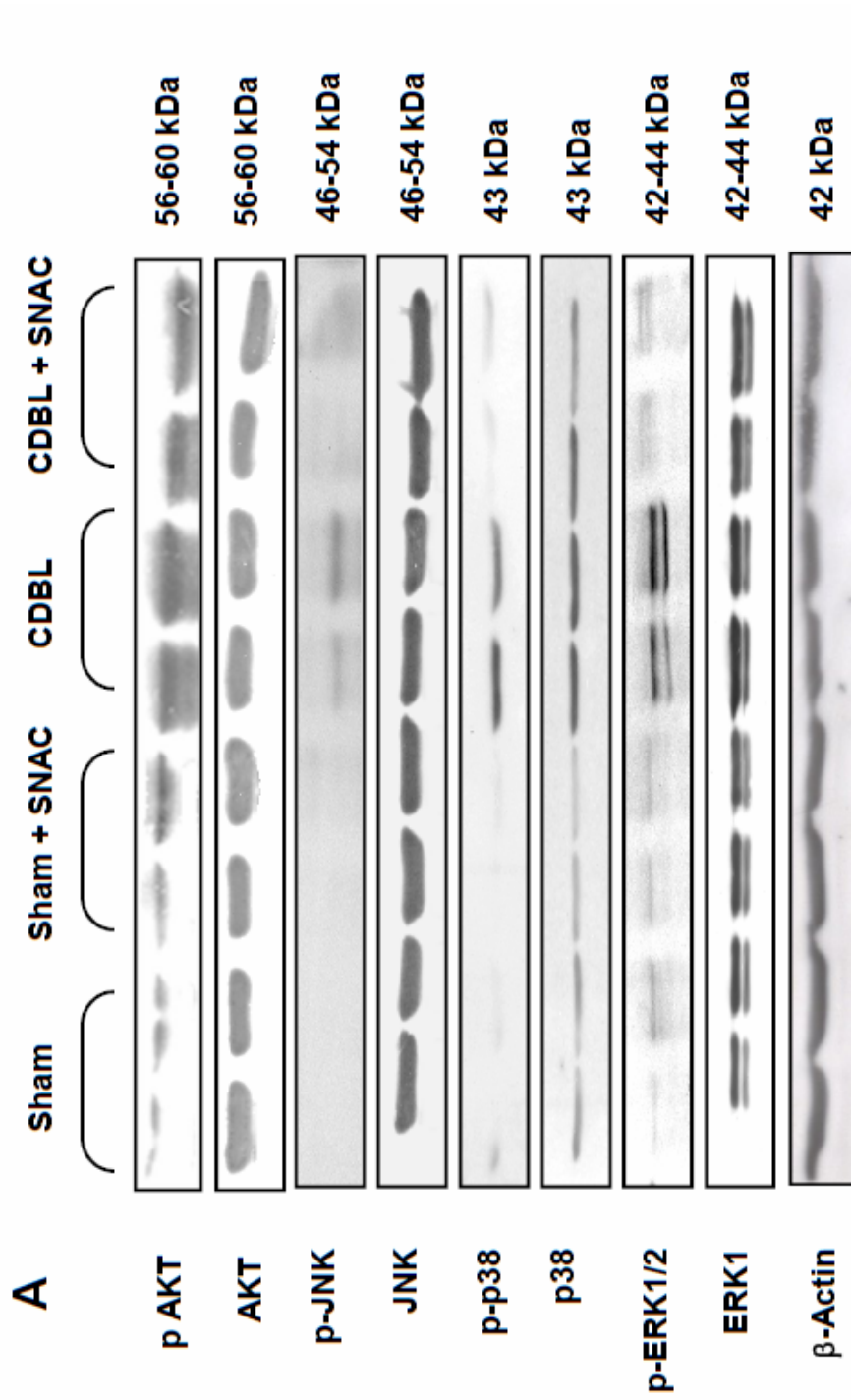
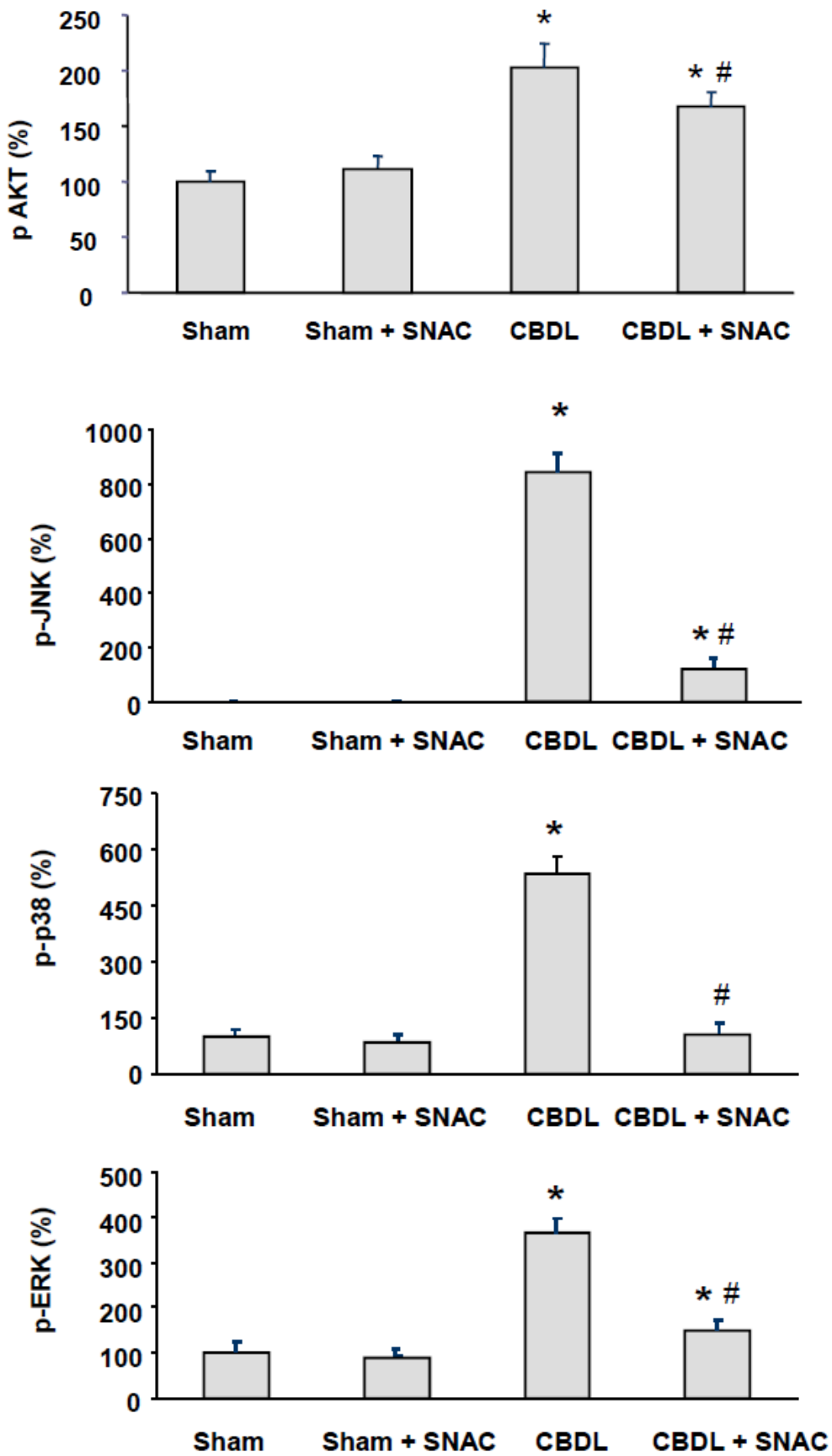


Figure 5 B

**B**

## References

- [1] Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008;134:1655-69.
- [2] Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:S79-S84.
- [3] D'Amico G, Garcia-Tasao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006;44:217-31.
- [4] Diaz-Gil JJ, García-Monzón C, Rúa C, Martín-Sanz P, Cereceda RM, Miquilena-Colina ME, et al. The antifibrotic effect of liver growth factor is associated with decreased intrahepatic levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 and transforming growth factor beta 1 in bile duct-ligated rats. *Histol Histopathol* 2008;23:583-91.
- [5] Yang KL, Chang WT, Chuang CH, Hung KC, Li EIC. Antagonizing TGF- $\beta$ -induced liver fibrosis by a retinoic acid derivative through regulation of ROS and calcium influx. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;2365:484-9.
- [6] Szuster-Ciesielska A, Plewka K, Daniluk J, Kandefer-Szerszen M. Zinc supplementation attenuates ethanol- and acetaldehyde-induced liver stellate cell activation by inhibiting oxygen reactive species (ROS) production and by influencing intracellular signaling. *Biochem Pharmacol* 2009; doi 10.1016/j.bcp.2009.04.009.
- [7] Yata Y, Gotwals P, Koteliansky V, Rockey DC. Dose-dependent inhibition of hepatic fibrosis in mice by a TGF- $\beta$  soluble receptor: implication of antifibrotic therapy. *Hepatology* 2002;35:1022-30.
- [8] Ihn H, Yamane K, Tamaki K. Increased phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase p38 in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2005;125:247-55.

- [9] Gabele E, Froh M, Arteel GE, Uesugi T, Hellerbrand C, Scholmerich J, Brenner DA, et al. TNF $\alpha$  is required for cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;378:348-53.
- [10] Borkham-Kamphorst E, Stoll D, Gressner AM, Weiskirchen R. Antisense strategy against PDGF B-chain proves effective in preventing experimental liver fibrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:413-23.
- [11] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209-18.
- [12] Kretzmann NA, Fillmann A, Mauriz JL, Marroni CA, Marroni N, González-Gallego J, Tuñón MJ. Effects of glutamine on pro-inflammatory gene expression and activation of nuclear factor kappa B and signal transducers and activators of transcription in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:1504-13.
- [13] Kamaraju AK, Roberts AB. Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *J Biol Chem* 2005;280:1024-36.
- [14] Yoshida K, Matsuzaki K, Mori S, Tahashi Y, Yamagata H, Furukawa F, et al. Transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor signal via c-Jun N-terminal kinase-dependent Smad2/3 phosphorylation in rat hepatic stellate cells after acute liver injury. *Am J Pathol* 2005;166:1029-39.
- [15] Hayashida T, deCassestecker M, Schnapper HW. Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad-signaling pathways enhances TGF- $\beta$ -dependent responses in human mesengial cell. *FASEB J*. 2003;17:1576-78.
- [16] Jeong WI, Park O, Radaeva S, Gao B. STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity. *Hepatology* 2006;44:1441-51.

- [17] Borkham-Kamphorst E, Van Roeyen CRC, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R. Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. *J Hepatol* 2007; 46: 1064-74.
- [18] Reif S, Lang A, Lindquist N, Yata Y, Gabele E, Scanga A et al. The role of FAK-PI3-K-Akt signaling in hepatic stellate cell proliferation and type I collagen expression. *J Biol Chem* 2003;78:8083-90.
- [19] Pastor A, Collado PS, Almar A, González-Gallego J. Antioxidant enzyme status in biliary-obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *J Hepatol* 1997; 27:363-7.
- [20] Galli A, Svegliati-Baroni G, Ceni E, Milani S, Ridolfi F, Salzano R, et al. Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2-mediated mechanism. *Hepatology* 2005;41:1074-84.
- [21] Urtasun R, Conde de la Rosa L, Nieto N. Oxidative and nitrosative stress and fibrogenic response. *Clin Liver Dis* 2008;12:769-790.
- [22] Novitskiy G, Potter JG, Wang L, Mezey E. Influences of reactive oxygen species and nitric oxide on hepatic fibrogenesis. *Liver Intern* 2006;26:1248-57.
- [23] Geenwel P, Dominguez-Rosales JA, Mavi G, Rivasesilla AM, Rojkind M. Hydrogen peroxide. A link between acetaldehyde-elicited alpha(1) collagen gene up-regulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000;31:109-16.
- [24] Peres W, Tuñon MJ, Mato S, Collado PS, González-Gallego J. Hepatoprotective effects of the flavonoid quercetin in rats with biliary obstruction *J Hepatol* 2000;33:742-50.
- [25] Liu RM, Liu Y, Forman HJ, Olman M, Tarpey MM. Glutathione regulates transforming growth factor-beta-stimulated collagen production in fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L121-8.
- [26] Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001;35:297-306.

- [27] Yang YY, Lee KC, Huang YT, Wang YW, Hou MC, Lee FY, et al. Effects of N-acetylcysteine administration in hepatic microcirculation of rats with biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2008;49:25-33.
- [28] Mani AR, Hipólito AS, Ollosson R, Moore KP. Nitration of cardiac proteins is associated with abnormal cardiac chronotropic responses in rats with biliary cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:847-56.
- [29] De Souza GFP, Yokoyama-Yasunaka JKU, Seabra AB, Miguel DC, de Oliveira MG, Uliana SRB. Leishmanicidal activity of primary S-nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: Implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Nitric Oxide* 2006; 15:209-216.
- [30] de Oliveira CP, de Lima VM, Simplicio FI, Soriano FG, de Mello ES, de Souza HP, et al. Prevention and reversion of nonalcoholic steatohepatitis in OB/OB mice by S-nitroso-N-acetylcysteine treatment. *J Am Coll Nutr* 2008;27:299-305.
- [31] de Oliveira CP, Simplicio FI, de Lima VM, Yuahasi K, Lopasso FP, Alves VA, et al. Oral administration of S-nitroso-N-acetylcysteine prevents the onset of non alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol* 2006;12:1905-11.
- [32] de Oliveira CP, Stefano JT, de Lima VM, de Sa SV, Simplicio FI, de Mello ES, et al. Hepatic gene expression profile associated with non-alcoholic steatohepatitis protection by S-nitroso-N-acetylcysteine in ob/ob mice. *J Hepatol* 2006;45:725-33.
- [33] de Oliveira CP, Alves VA, Lima VM, Stefano JT, Debbas V, Sa SV, et al. Modulation of hepatic microsomal triglyceride transfer protein (MTP) induced by S-nitroso-N-acetylcysteine in ob/ob mice. *Biochem Pharmacol* 2007;74:290-7.
- [34] Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984;65:305-11.



- [35] Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170-5.
- [36] Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973;134:707-16.
- [37] Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 1991;10:93-100.
- [38] Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, Gutiérrez B, Culebras JM, González-Gallego J. Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 2003;66:439-45.
- [39] Martínez-Flórez S, Gutiérrez-Fernández B, Sánchez-Campos S, González-Gallego J, Tuñón MJ. Quercetin attenuates nuclear factor-kappa B activation and nitric oxide production in interleukin-1 beta-activated rat hepatocytes. *J Nutr* 2005;135:1359-65.
- [40] Garcia-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sanchez-Campos S, Tunon MJ, et al. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol* 2007;557:221-9.
- [41] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 2001;25:402-8.
- [42] Liu TZ, lee KT, Chern CL, Cheng JT, Stern A, Tasi LY. Free radical-triggered hepatic injury of experimental obstructive jaundice of rats involves overproduction of proinflammatory cytokines and enhanced activation of nuclear factor kappa B. *Ann Clin Lab Sci* 2001;31:383-90.

- [43] Maeda K, Koda M, Matono T, Sugihara T, Yamamoto S, Ueki M, Murawaki Y, et al. Preventive effects of ME3738 on hepatic fibrosis induced by bile duct ligation in rats. *Hepatol Res* 2008;38:727-35.
- [44] Moal F, Veal N, Vuillemin E, Barriere E, Wang J, Oberti F, et al. hemodynamic and antifibrotic effects of a selective liver nitric oxide donor V-PYRRO/NO in bile duct ligated rats. *World J Gastroenterol* 2006;12:6639-45.
- [45] Wang JH, Batey RG, George J. Role of ethanol in the regulation of hepatic stellate cell function. *World J Gastroenterol* 2006;12:6926-32.
- [46] Diaz-Gil JJ, García-Monzón C, Rúa C, Martín-Sanz C, Cereceda RM, Miquelina-Colina ME, et al. Liver growth factor antifibrotic activity in vivo is associated with decrease in activation of hepatic stellate cells. *Histol Histopathol* 2009;24:473-9.
- [47] Urtasun R, Cubero FJ, Verqa M, Nieto N. Reactive nitrogen species switch on early extracellular matrix remodeling via induction of MMP1 and TNFalpha. *Gastroenterology* 2009;136:1410-22.
- [48] Garcia JA, dos Santos L, Moura AL, Rocardo KF, Wanschel AC, Sishido SM, et al. S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) prevents myocardial alterations in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice by anti-inflammatory action. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008;51:78-85.
- [49] Tsukada S, Westwick JK, Ikejima K, Sato N, Rippe RA. SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate alpha1(I) collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2005;280:10055-64.
- [50] De Bleser P, Xu G, Rombouts K, Rogiers V, Geerts A. Glutathione levels discriminate between oxidative stress and transforming growth factor b1 signaling in activated rat hepatic stellate cell. *J Biol Chem* 199;274:33881-7.

- [51] Nieto N, Friedmann SL, Cederbaum A. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P-450 2E-1 derived reactive oxygen species. *Hepatology* 2000;35:62-73.
- [52] Failli P, DeFranco R, Caligiuri A, Gentilini A, Romanelli RG, Marra F, et al. Nitrovasodilators inhibit platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration of activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;119:479-92.
- [53] Sakaida I, Hironaka K, Terai S, Okita K. Gadolinium chloride reverses dimethylnitrosamine (DMN)-induced rat liver fibrosis with increased matrix metalloproteinases (MMPs) of Kupffer cells. *Life Sci* 2003;72:943-59.
- [54] Han YP. Matrix metalloproteinases, the pros and cons in liver fibrosis. *J Gastroenterol hepatol* 2006;21:S88-91.
- [55] Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mice. *Hepatology* 2002;36:850-60.
- [56] Qiang H, Lin Y, Zhang X, Zeng X, Shi J, Chen YX, Yang MF, Han ZG, Xie WF. Differential expression genes analyzed by cDNA array in the regulation of rat hepatic fibrogenesis. *Liver Int* 2006;26:1126-37.
- [57] Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Caradonna Z, Alvaro D, Marzionin M, Saccommano S, Candelaresi C, et al. Regulation of ERK/JNK/p70S6K in two rat models of liver injury and fibrosis. *J Hepatol* 2003;39:528-37.
- [58] Rgyu DY, Yang Y, Ha H, Lee GT, Song JS, Uh ST, et al. Role of reactive oxygen species in TGF- $\beta$ 1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:667-75.

- 
- [59] Salazar-Montes A, Ruiz-Corro A, López-Reyes A, Castrejón-Gómez E, Armendáriz-Borunda J. Potent antioxidant role of pirfenidone in experimental cirrhosis. *Eur J Pharmacol* 2008;595:69-77.
- [60] Baumgardner JN, Shankar K, Hennings L, Albano E, Badger TM, Ronis MJJ. N-acetylcysteine attenuates progression of liver pathology in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr* 2008;138:1872-9.

---

## DISCUSSÃO

---

## **5. DISCUSSÃO**

A ligadura de ducto biliar comum é modelo experimental para o estudo de lesão hepática por obstrução das vias biliares. A obstrução do ducto biliar comum produz dano hepatocelular e resposta inflamatória pelo acúmulo de sais biliares no interior do fígado. Esse mecanismo favorece a produção de citocinas, ativando cascatas inflamatórias. Esses eventos, por sua vez, promovem o processo de lesão e cicatrização hepatocelular, levando ao acúmulo de colágeno, desenvolvimento da fibrose e consequente cirrose hepática (Schmucker, Ohta *et al.*, 1990). A obstrução biliar é caracterizada por necrose, infiltração de linfócitos e fibrose hepática, podendo evoluir para cirrose, além de ser um modelo comum para o estudo das complicações da cirrose hepática (Lee, Kim *et al.*, 2008; Zhang, Luo *et al.*, 2009).

A cirrose é o estágio mais avançado de fibrose hepática, na qual, além do acúmulo de colágeno, há distorção do parênquima do fígado pela formação de septos e nódulos, alteração do fluxo sanguíneo e risco de falência do fígado (Hui e Friedman, 2003; Friedman, 2008b).

Essa doença pode apresentar diversas complicações sistêmicas, como a síndrome hepatopulmonar. A associação entre a doença hepática crônica e as anormalidades vasculares pulmonares é reconhecida há mais de cem anos, no entanto, o interesse pela pesquisa clínica e experimental da interação fígado-pulmão ocorreu somente nos últimos quinze anos. A síndrome hepatopulmonar é uma complicação da cirrose e ou hipertensão portal, que se caracteriza pela presença de dilatações vasculares intrapulmonares que levam a alterações na difusão arterial de gases (Fallon e Abrams, 2000; Rodríguez-Roisin e Krowka, 2008).

Experimentalmente, o modelo de ligadura de ducto biliar comum desenvolve a cirrose biliar secundária, com áreas focais de necrose centrolobular, necrose periportal, proliferação e dilatação dos ductos e canalículos biliares dos espaços porta, colangite estéril ou infecciosa, edema e fibrose dos espaços porta (Abdel-Aziz, Lebeau *et al.*, 1990). Também identifica as características da síndrome hepatopulmonar por reduzir a resistência vascular pulmonar e causar alterações nas trocas gasosas (Fallon, M. B.,

Abrams, G. A. et al., 1997; Luo, Liu et al., 2004; Tieppo, Vercelino et al., 2005; Tang, Luo et al., 2007; Vercelino, Tieppo, Forgiarini Junior et al., 2008; Tieppo, Cuevas et al., 2009).

A discussão da tese, inicialmente, será baseada no artigo I, referente ao *experimento I*, e seguida da discussão da segunda parte do trabalho, o artigo II, referente ao *experimento II*. Os dois experimentos foram desenvolvidos utilizando o modelo de ligadura de ducto biliar comum.

No *experimento I* foi avaliado o efeito da N-acetilcisteína sobre o pulmão, para verificar seu efeito sobre a síndrome hepatopulmonar. No *experimento II*, avaliamos o efeito da S-nitroso-N-acetilcisteína no fígado no modelo de cirrose biliar secundária e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da fibrose e cirrose instalada.

Ao desenvolver o modelo de ligadura de ducto biliar comum, avaliamos a integridade hepática através das enzimas séricas transaminases (aspartato aminotransferase, AST; alanino amino transferase, ALT) e da fosfatase alcalina (FA) e verificamos seu aumento no grupo CBDL, que foi diminuído no grupo CBDL+NAC (Tabela 1). As alterações que ocorrem devido ao dano hepático estabelecido pelo refluxo dos sais biliares para o interior do fígado são tóxicos ao tecido hepático e elevam os níveis dessas enzimas, principalmente por estarem diretamente relacionadas à lesão e à necrose celular (Brandão e Marroni, 2001). Diversos trabalhos experimentais demonstraram o elevado nível das transaminases e da fosfatase alcalina no modelo de cirrose biliar secundária e sua correção pelo uso de antioxidantes (Pastor, Collado *et al.*, 1997; Campos Maia, Botelho Guimarães *et al.*, 2003; Tieppo, Vercelino *et al.*, 2005; Vercelino, Tieppo *et al.*, 2008; Tieppo, Cuevas *et al.*, 2009).

Os dados das enzimas de integridade hepática correlacionaram-se com o encontrado na histologia hepática dos animais Sham, CBDL e CBDL+NAC, demonstrando a cirrose instalada e sua atenuação pela administração da NAC (Anexo I).

Os dados de enzimas séricas também se correlacionam com os dados encontrados na gasometria arterial (Tabela 2), que é um sinal importante para o

diagnóstico da síndrome hepatopulmonar. Os animais do grupo CBDL mostraram significativa diminuição da pressão parcial de oxigênio ( $PO_2$ ), juntamente com aumento significativo da pressão parcial de dióxido de carbono ( $PCO_2$ ) e redução da saturação da hemoglobina ( $SatO_2/O_2$ ), demonstrando a alteração na difusão de gases nesse modelo experimental. Os dados da gasometria arterial foram corrigidos no grupo CBDL+NAC. O mesmo foi observado em outro trabalho do nosso grupo, que utilizou a quercetina e avaliou sua ação na complicação pulmonar no modelo de ligadura de ducto biliar comum (Tieppo, Vercelino *et al.*, 2007; Tieppo, Cuevas *et al.*, 2009), demonstrando a efetividade de fármacos com potencial antioxidantes agirem sobre essa complicação da cirrose.

Na avaliação da relação hepatossomática (Tabela 1), observamos aumento significativo dessa relação. Isso se deve, provavelmente, ao acúmulo de colágeno elevando o peso do fígado. Esses dados coincidem com trabalhos nos quais foi demonstrado que tais aumentos foram atenuados após o uso da NAC e da quercetina no modelo de ligadura de ducto biliar comum (Pastor, Collado *et al.*, 1997; Peres, Tuñón *et al.*, 2000).

Na relação pneumossomática (Tabela 1), observamos aumento significativo no grupo CBDL em relação aos demais grupos. Esse aumento poderia ser pela infiltração do parênquima pulmonar por células inflamatórias e proteínas plasmáticas. Tal edema pulmonar pode resultar do aumento da permeabilidade vascular e da pressão de filtração vascular pulmonar e diminuição da pressão oncótica (Chang e Ohara, 1993). A administração da NAC resultou em redução da relação pneumossomática.

O estresse oxidativo tem um importante papel na etiopatogenia de diversas doenças, incluindo os mecanismos de fibrose hepática via ativação das células estreladas que estimula a transcrição de colágeno e de outras citocinas inflamatórias (Tahan, Tarcin *et al.*, 2007; Friedman, 2008b). Dados referentes ao mecanismo de estresse oxidativo (TBARS e SOD) de fígado de ratos com CBDL e animais tratados e não tratados com NAC são mostrados no Anexo II.



Na síndrome hepatopulmonar também há participação do estresse oxidativo como foi observado em trabalhos anteriores do nosso grupo (Tieppo, Vercelino *et al.*, 2005; Vercelino, Tieppo *et al.*, 2008). Esse estudo mostrou aumento significativo da lipoperoxidação (Tabela 2) acompanhada de diminuição da atividade da enzima SOD (Figura 1) e aumento da produção de nitratos totais (Tabela 2) no grupo CBDL. Esses dados foram revertidos no grupo CBDL+NAC. Possivelmente a NAC poderia estar inibindo translocação bacteriana ou diminuindo a entrada de citocinas na circulação pulmonar, evitando, dessa forma, a formação do  $O_2^{\bullet-}$ , (Okay, Karadenizli *et al.*, 2005), reduzindo a lipoperoxidação e a formação de NO. Esse efeito também foi observado no estudo de Türüt *et al.* (2009), em que animais que apresentavam lesão pulmonar, apresentaram redução da atividade da SOD e aumento da produção de NO no pulmão.

Além do dano aos lipídios, avaliado pelo aumento da lipoperoxidação, as espécies ativas de oxigênio podem causar prejuízos ao DNA. O dano oxidativo ao DNA é situação comum e é a principal causa de instabilidade genômica (Tice, Agurell *et al.*, 2000). Observou-se um aumento na frequência de micronúcleos na medula óssea e aumento de dano ao DNA no tecido pulmonar e hepático dos animais do grupo CBDL, sugerindo aumento da instabilidade genômica desses animais. Os animais do grupo CBDL+NAC apresentaram quase a mesma frequência de dano nos micronúcleos que os animais do grupo CBDL, denotando que a NAC, sob essa dose (10mg/Kg), não pôde impedir danos citogênicos nesse modelo (Tabela 3).

No ensaio cometa, embora esses dados não sejam significativos, o índice de dano ao DNA nos animais CBDL tratados com NAC foi inferior ao grupo CBDL, sugerindo tendência protetora da NAC (Tabela 4). Porém, outros estudos têm demonstrado o papel protetor da NAC como varredor de radicais livres, diminuindo o dano ao DNA (Morley, Curnow *et al.*, 2003; Zhao e Liu, 2005; Farombi, 2006).

A vasodilatação no modelo de ligadura de ducto biliar dá-se pelo aumento de produção de NO. Na histologia de pulmão do grupo CBDL, observamos aumento no diâmetro do vaso (Figura 3), fenômeno presente na síndrome hepatopulmonar, juntamente com a alteração nas trocas gasosas. Esse achado está de acordo com outros estudos que utilizaram o mesmo modelo para investigação da síndrome hepatopulmonar

(Chang e Ohara, 1993; Nunes, Lebrez *et al.*, 2001; Zhang, Katsuta *et al.*, 2003; Vercelino, Tieppo *et al.*, 2008; Tieppo, Cuevas *et al.*, 2009).

Os animais do grupo CBDL + NAC (Figura 4) apresentaram redução da vasodilatação intrapulmonar. Isso ocorre, provavelmente, devido ao potencial antioxidante da NAC, que protege o fígado dos animais com ligadura de ducto biliar, acarretando melhora na função hepática e, conseqüentemente, reduzindo o estresse oxidativo e de NO no tecido pulmonar, inibindo a lesão oxidativa e a vasodilatação, restabelecendo as alterações na difusão de gases, como foi observado nesse trabalho.

A atividade diminuída da enzima SOD, observada nesse trabalho, pode estar relacionada à grande quantidade de  $O_2^{\bullet-}$  no tecido pulmonar.  $O_2^{\bullet-}$  pode se associar ao NO e, assim, formar um potente oxidante celular, o ONOO<sup>-</sup> (Beckman e Koppenol, 1996; Szabó, Ischiropoulos *et al.*, 2007).

O aumento de NO está relacionado à depleção da metionina-adenosil transferase, o que leva à redução das enzimas antioxidantes (Rubbo e Radi, 2002), fato esse, que é observado nos pulmões do grupo CBDL, que apresentaram SOD diminuída e aumento dos nitratos totais.

A NAC também poderia reduzir a formação de ONOO<sup>-</sup>, através da inibição da produção de metabólitos do NO. Esse efeito dá-se pela combinação do composto tiol da NAC com o NO, produzindo, assim, um composto chamado de nitrosotiol, o qual pode preservar e acumular o NO na sua forma biologicamente ativa (Failli, Palmieri *et al.*, 2002). Uma vez em sua forma biologicamente ativa, o NO pode ter ação antioxidante, inibindo a ação de espécies ativas de oxigênio no tecido pulmonar. Quando os peróxidos entram nas células, eles podem reagir com metaloproteínas, formando complexos, que podem levar ao aumento da lipoperoxidação. O NO, como antioxidante, pode reagir com essas metaloproteínas, prevenindo reações oxidativas e limitando o dano celular mediado pelo estresse oxidativo (Rubbo e Radi, 2002).

As observações experimentais com a NAC no modelo de ligadura de ducto biliar comum motivaram a investigação dos mecanismos dos nitrosotióis. Após contatos com o grupo de pesquisa da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, chefiada pelo

Dr. Marcelo Ganzarolli, do Instituto de Físico-Química, que há mais de dez anos investiga o papel dos nitrosotióis, entre eles a S-nitroso-N-Acetilcisteína (SNAC), iniciamos uma parceria para avaliar os efeitos dessa droga no modelo experimental de ligadura de ducto biliar comum.

Baseados na hipótese de que a NAC favoreça a biodisponibilidade do NO através da formação endógena de nitrosotióis, avaliamos o efeito da SNAC sobre os mecanismos envolvidos na cirrose do modelo de ligadura de ducto biliar comum no fígado desses animais.

A discussão que segue é pertinente ao **experimento II**, apresentado no **artigo II**. Na avaliação das enzimas séricas transaminases e fosfatase alcalina (Tabela 1), observamos aumento significativo dessas enzimas nos animais CBDL em relação aos grupos Sham. Nos animais CBDL+SNAC, observamos redução dos níveis séricos dessas enzimas, o que sugere efeito hepatoprotetor desse fármaco, similar ao que foi observado com a NAC (Tahan, Tarcin et al., 2007; Pereira-Filho, Ferreira et al., 2008; Vercelino, Tieppo, Dias et al., 2008). É também importante observar que nenhuma modificação significativa nos níveis dessas enzimas foi observada entre os animais do grupo Sham que receberam SNAC, o que indica uma ausência de efeitos adversos na metabolização hepática desse fármaco (Tabela 1). Esse efeito hepatoprotetor da SNAC foi semelhante aos achados de trabalhos anteriores do nosso grupo no tratamento de animais cirróticos quando utilizados antioxidantes ou outros fármacos com potencial antioxidante (Pavanato, Tuñón et al., 2003; Amália, Possa et al., 2007; Tahan, Tarcin et al., 2007; Tieppo, Vercelino et al., 2007; Vercelino, Tieppo, Dias et al., 2008).

A resposta aos estímulos inflamatórios no modelo de cirrose biliar secundária conduz à cascata de eventos através da ativação de células estreladas presentes no desenvolvimento da cirrose. Esses eventos favorecem a cicatrização celular através do aumento da proliferação celular, contratilidade, fibrogênese, degradação da matriz e sinalizações pró-inflamatórias, favorecendo o acúmulo de colágenos e o desenvolvimento da cirrose (Friedman, 2008b).

Na avaliação da histologia hepática através das colorações hematoxilina eosina e picrossírius, observamos intensa proliferação ductular acompanhada de fibrose,

presença de nódulos parenquimatosos e um valor F4 no escore Metavir de avaliação da fibrose, caracterizando, assim, a cirrose biliar secundária (Figura 1). Obsevamos também um aumento significativo no índice de fibrose do grupo CBDL em relação ao grupo Sham no grupo CBDL respectivamente (Tabela 1). No grupo CBDL+SNAC houve redução do índice de fibrose e discreta proliferação ductular em relação ao grupo CBDL (Tabela 1), mostrando a capacidade antifibrinogênica da SNAC. Resultados semelhantes foram observados pelo nosso grupo de pesquisa que avaliou o papel do flavonoide quercetina no mesmo modelo experimental (Tieppo, Cuevas *et al.*, 2009).

O aumento da fibrose observado no grupo CBDL foi acompanhado pelo aumento da expressão gênica de colágeno 1 $\alpha$  e  $\alpha$ -SMA no grupo CBDL. O colágeno 1 $\alpha$  é o principal constituinte da matriz para formação da fibrose hepática (Wang, Batey *et al.*, 2006). A ativação das células estreladas em decorrência do estímulo de citocinas inflamatórias ou pelo estresse oxidativo desencadeia a produção de colágeno assim como do aumento da contratilidade das células estreladas, que ocorre pelo aumento da expressão de  $\alpha$ -SMA, uma proteína citoesquelética (Friedman, 2008b). O grupo CBDL+SNAC mostrou redução da expressão gênica de colágeno 1 $\alpha$  e  $\alpha$ -SMA, mostrando que a SNAC apresenta potencial efeito sobre a inibição dessas proteínas, justificando seu efeito antifibrinogênico.

O estresse oxidativo e a ativação de citocinas têm um importante papel na etiopatogenia da fibrose hepática, favorecendo a transcrição de colágeno e a perpetuação da inflamação (Tahan, Tarcin *et al.*, 2007; Friedman, 2008b). No nosso estudo, observamos um aumento da lipoperoxidação e da atividade da enzima SOD hepática nos animais do grupo CBDL (Tabela 2). Esses resultados podem ser uma resposta ao dano oxidativo no tecido hepático ocasionado pelo refluxo de sais biliares para o interior do fígado, ocasionando aumento da lipoperoxidação, como demonstrado pelo aumento de TBARS e QL, e, dessa forma, provocando aumento da atividade da enzima SOD, que faz um importante papel no balanço redox celular, na tentativa de dismutar radicais livres e proteger tecidos contra possíveis danos oxidativos (Halliwell, 2007; Filippin, Vercelino *et al.*, 2008). Esses dados estão de acordo com estudos que avaliaram o estresse oxidativo em modelos de cirrose hepática (Amália, Possa *et al.*,

2007; Tieppo, Vercelino *et al.*, 2007; Pereira-Filho, Ferreira *et al.*, 2008; Vercelino, Tieppo, Dias *et al.*, 2008; Tieppo, Cuevas *et al.*, 2009).

A redução significativa da lipoperoxidação nos animais CBDL + SNAC demonstra um efetivo bloqueio no processo da lipoperoxidação, (Tabela 2). Esse resultado está de acordo com a capacidade esperada da SNAC em inativar diretamente espécies  $\text{LOO}^{\bullet}/\text{LO}^{\bullet}$  com a formação de produtos nitrados (LONO/LOONO), observados na seguinte reação:  $2\text{RSNO} + \text{LO}^{\bullet}/\text{LOO}^{\bullet} \rightarrow \text{LONO/LOONO} + \text{RS}^{\bullet}$ , quando duas moléculas de RSNO se decompõem formando um dímero. (De Oliveira, Simplicio *et al.*, 2006).

A eficácia do S-nitrosotiol nesse processo surge a partir do fato de que o radical tiila ( $\text{RS}^{\bullet}$ ) é formado pela dimerização através da formação de uma ligação de um disulfido estável termodinamicamente. Por isso, nenhuma propagação de espécie radical surge a partir da inativação dos radicais oxil e peroxil nestas reações (Rubbo, Radi *et al.*, 1994; Rubbo e Radi, 2002; De Oliveira, Simplicio *et al.*, 2006; De Oliveira, De Lima *et al.*, 2008), por isso a eficácia em proteger o fígado de espécies radicalares de oxigênio.

Um fato muito importante em nosso experimento, foi o efeito protetor da SNAC ocorre sem um aumento detectável nos níveis dos metabólitos do NO ( $\text{NO}_x$ ) no tecido hepático (Tabela 2). Esse resultado indica que o possível efeito adverso associado pelo aumento dos níveis de nitritos e nitratos, deve estar ausente na dose administrada de SNAC nesse modelo animal. Isso também reforça que a SNAC age como uma molécula que inativa espécies radicalares em reações bimoleculares, de acordo com a reação citada anteriormente. Essa ação não está associada à liberação prévia de NO da molécula, uma vez que nitrito e nitrato são formados após a reação de NO livre com o oxigênio, formando a espécie  $\text{ONOO}^-$ , que apresenta grande potencial de lesão tecidual, propagando o estresse nitrosativo.

Diversos estudos demonstram a capacidade antifibrogênica de antioxidantes e outros fármacos (Pavanato, Tuñón *et al.*, 2003; Pereira-Filho, Ferreira *et al.*, 2008). No entanto, os efeitos antifibróticos de varredores de radicais livres são principalmente

observados *in vitro*, usando células estreladas, e poucos estudos testam suas aplicações *in vivo* em modelos animais (Moal, Veal *et al.*, 2006; Yang, Chang *et al.*, 2008).

O principal fator de crescimento envolvido no desenvolvimento da fibrose é o PDGF, e também é o mais potente mitógeno das células estreladas (Borkham-Kamphorst *et al.*, 2007). Durante a inflamação hepática, as células estreladas aumentam a produção de PDGF, bem como fazem um *up regulation* da expressão de seus receptores (Lechuga *et al.*, 2006). A expressão de PDGF também é influenciada pelas mudanças no estado redox celular (Urtasun, Conde De La Rosa *et al.*, 2008) e doadores de NO têm mostrado ser um eficiente inibidor da sua expressão (Failli, Defranco *et al.*, 2000). Isso se evidenciou em nosso experimento com a redução da expressão gênica de PDGF no homogeneizado de fígado dos animais do grupos CBDL+SNAC (Figura 3). Também foi observado um aumento na expressão de AKT nos animais cirróticos. Esse resultado está relacionado ao aumento do PDGF, pois a AKT pode se mostrar elevada quando há ativação das células estreladas, devido estímulo pró-fibrogênico provocado pelo PDGF (Reif, Lang *et al.*, 2003). Nos animais CBDL+SNAC observamos redução na expressão da AKT, cujo resultado ocorreu, provavelmente, devido à inibição da expressão do PDGF pela redução da lesão oxidativa.

O TGF- $\beta$  é a principal citocina fibrogênica no fígado e é influenciada pelo estado redox intracelular (Seki, De Minicis *et al.*, 2007). O mecanismo da fibrogênese ocorre pela estimulação das células estreladas que favorecem a produção dos componentes da matriz extracelular, sendo a ativação do TGF- $\beta$  o principal estímulo para a produção do colágeno do tipo I, fibronectina e proteoglicanos que levam à progressão da fibrose (Inagaki e Okazaki, 2007; Friedman, 2008a). Na Figura 3 observamos um aumento significativo da expressão gênica dessa citocina em relação aos grupos Sham. No grupo CBDL+SNAC, constatamos redução na expressão gênica do TGF- $\beta$  (Figura 3). Esse resultado correlaciona-se ao aumento da expressão do TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória que medeia o dano hepático em diversos modelos animais (Kitamura, Nakamoto *et al.*, 2002; Luo, Liu *et al.*, 2004). O TGF- $\beta$  também apresenta importante papel na proliferação das células estreladas *in vitro* (Hellerbrand, Jobin *et al.*, 1998; Friedman, 2008b).

Em nosso estudo, observamos aumento do TNF- $\alpha$ , juntamente com ativação do PDGF e do TGF- $\beta$  (Figura 3) nos animais CBDL. Podemos inferir que esses parâmetros aumentaram devido ao refluxo de sais biliares que iniciam a cascata de inflamação no interior do fígado, provocando o desenvolvimento da fibrose. Os animais cirróticos tratados com SNAC tiveram os valores dessas citocinas reduzidas, possivelmente devido ao potencial antioxidante e anti-inflamatório da SNAC (Figura 4).

A fibrogênese é contrabalançada na remoção do excesso de matriz extracelular por enzimas proteolíticas, nesse caso, as metaloproteinases (MMPs). Durante o dano hepático crônico, ocorre um mecanismo em favor da fibrogênese em relação à fibrolise, com uma regulação positiva para os inibidores das metaloproteinases (TIMPs) (Benyon e Arthur, 2001).

A MMP-2 é expressada quando há ativação das células estreladas devido à presença de um mecanismo de lesão hepática (Hemmann, Graf *et al.*, 2007). Foi observado aumento da expressão da MMP-2 nos animais CBDL, juntamente com a TIMP-1. Os animais cirróticos tratados com SNAC apresentaram redução dessas proteínas (Figura 4). A regulação promovida pela relação MMPs X TIMPs é um mecanismo complexo, e a literatura apresenta dados controversos (Hemmann, Graf *et al.*, 2007). O aumento concomitante de MMPs e TIMPs, e sua redução com a administração de fármacos com potencial antioxidante já foi demonstrado previamente (Galli, Svegliati-Baroni *et al.*, 2005; Szuster-Ciesielska, Plewka *et al.*, 2009).

A sinalização das MAPKs é crucial para a proliferação tecidual. Evidências indicam que as citocinas também podem ativar cínases que estão envolvidas na sobrevivência celular (Talarmin, Rescan *et al.*, 1999; Taub, 2004). As MAPKs são proteínas-cínase específicas de serina/treonina que respondem a estímulos extracelulares e regulam várias atividades celulares, como expressão gênica, mitose, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose (Sun e Oberley, 1996). Citocinas e radicais livres podem sinalizar a ativação das MAPKs, favorecendo o mecanismo de fibrose (Qiang, Lin *et al.*, 2006; Matsuzawa e Ichijo, 2008). Já foi demonstrado que há aumento da expressão das MAPKs no modelo de ligadura de ducto biliar (Svegliati-Baroni, Ridolfi *et al.*, 2003), o que é comprovado também neste estudo (Figura 5). A ativação das

MAPKs tem sido recentemente relacionada à expressão gênica do TGF- $\beta$  e do colágeno tipo I, o que também foi por nós observado (Furukawa, Matsuzaki *et al.*, 2003; Tsukada, Westwick *et al.*, 2005). O aumento da expressão gênica de PDGF no grupo cirrótico correlaciona-se ao aumento da ERK, fato que, quando o receptor de PDGF é ativado, recruta moléculas de sinalização RAS, ativando a rota da ERK (Friedman, 1999; Carloni, Defranco *et al.*, 2002). Foi-nos possível constatar que a ERK também se correlaciona positivamente com  $\alpha$ -SMA, dado já observado anteriormente no mesmo modelo de cirrose (Zhang, Liu *et al.*, 2006). Da mesma forma, o TGF- $\beta$  pode estimular a cascata de sinalização da JNK e p38 (Ihn, Yamane *et al.*, 2005). Observamos por meio de nossos experimentos que houve aumento da expressão dessas proteínas no grupo CBDL, o que foi inibido após o tratamento com SNAC.

A SNAC apresenta um efeito abrangente nos mecanismos sinalizadores da fibrose hepática, inibindo a expressão das MAPKs e da expressão gênica de citocinas envolvidas, assim como a redução propriamente dita da fibrose hepática.

Neste estudo, a SNAC apresentou efeitos animadores na fisiopatologia da fibrose desenvolvida pela ligadura de ducto biliar comum. Enfatiza-se que a SNAC foi administrada em concentrações muito inferiores às da NAC, a concentração da SNAC foi dez vezes inferior à da NAC, e para efeito comparativo, observamos resultados similares na determinação das transaminases, na lipoperoxidação e na avaliação dos metabólitos do NO. Em outros estudos com modelos de lesão hepática, utilizaram-se dosagens com maiores concentrações de NAC para obtenção de resultados semelhantes aos aqui encontrados (Ronis, Butura *et al.*, 2005; Baumgardner, Shankar *et al.*, 2008; Yang, Lee *et al.*, 2008; Pereira-Filho, Ferreira *et al.*, 2008).

Tais dados animam-nos a considerar de maneira objetiva o potencial terapêutico da SNAC em eventuais benefícios socioeconômicos de custo-benefício, pois sua utilização terapêutica poderia ser administrada com doses inferiores à da NAC e alcançaria resultados semelhantes.



## **CONCLUSÕES**

## **6. CONCLUSÕES**

---

### **6.1 Experimento I**

1. Observamos aumento significativo nas enzimas séricas transaminases e fosfatase alcalina no grupo CBDL, que foi reduzido com NAC. Quanto a gasometria arterial, a NAC aumento a  $PO_2$  e reduziu a  $PCO_2$ , e também restabeleceu a  $SatO_2/Hb$ .
2. As relações hepatossomática e pneumossomática, apresentaram aumento nos animais do grupo CBDL. Reduziram-se quando do tratamento com NAC nos animais CBDL.
3. Os pulmões dos animais do grupo CBDL apresentaram aumento da lipoperoxidação. No grupo CBDL+NAC, apresentou dados semelhantes aos grupos Sham.
4. O grupo CBDL apresentou redução da atividade da enzima SOD, a qual, no grupo CBDL+NAC foi restabelecida.
5. Houve aumento dos nitratos totais no pulmão dos animais do grupo CBDL, o qual, no grupo CBDL+NAC apresentou-se reduzido.
6. Os animais do grupo CBDL apresentaram instabilidade genômica, a qual, que não foi alterada pelo tratamento com NAC no grupo CBDL+NAC. No ensaio cometa, o índice de dano ao DNA nos animais CBDL + NAC foi inferior aos animais do grupo CBDL, sugerindo tendência protetora da NAC.
7. Os animais CBDL apresentaram aumento no diâmetro dos capilares pulmonares, o qual no grupo CBDL+NAC apresentou-se reduzido.

## 6.2 Experimento II

1. Observamos aumento significativo nas transaminases e na fosfatase alcalina no grupo CBDL. No grupo CBDL+ SNAC, esses valores apresentaram-se reduzidos.
2. Observamos na histologia hepática uma redução da proliferação ductular, com finos septos de fibrose nos animais CBDL+SNAC.
3. O grupo CBDL apresentou aumento da lipoperoxidação no tecido hepático avaliados por TBARS e QL. Com o tratamento no grupo CBDL+SNAC, foi reduzida a lipoperoxidação
4. Houve aumento da atividade da enzima SOD no grupo CBDL. No grupo CBDL+SNAC, a atividade da enzima permaneceu próxima aos índices encontrados nos animais dos grupos Sham.
5. A administração da SNAC não apresentou diferenças estatísticas na avaliação dos metabólitos do NO nos grupos estudados.
6. A SNAC mostrou ser efetiva na redução dos níveis de RNAm das proteínas  $\alpha$ -SMA, colágeno tipo I, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PDGF, TIMP-1, MMP-2 no tecido hepático.
7. A SNAC inibiu a expressão das proteínas MAPKs (p38, ERK e JNK) e AKT no tecido hepático no modelo de cirrose biliar secundária.

## 6.3 Conclusão Geral

Os fármacos utilizados nesses experimentos apresentam propriedades antioxidantes eficazes na redução do estresse oxidativo no modelo de cirrose biliar secundária e suas complicações. A NAC se mostra muito eficaz no manejo da SHP, melhorando a função hepática e prevenindo o desenvolvimento da SHP. Em contrapartida, a SNAC, em doses muito inferiores, foi capaz de restabelecer a função

hepática e inibir rotas moleculares envolvidas no processo de fibrose hepática, mostrando-se igualmente eficaz. Isso justifica a continuidade de estudos com a SNAC, podendo ser avaliado seu papel inclusive nos mecanismos da SHP.

---

## **PERSPECTIVAS**

---

## **7. PERSPECTIVAS**

Há um interesse crescente tanto da indústria farmacêutica, como dos grandes laboratórios de investigação científica das principais Universidades do Brasil e do exterior nos mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos do NO.

Ainda pouco se sabe sobre o papel do NO, principalmente por parecer muitas vezes contraditório. A utilização da SNAC, um doador de NO, que apresenta também função antioxidante, mostra grande potencial terapêutico em diversas doenças e pode auxiliar o entendimento dos mecanismos do NO em situações experimentais e clínicas.

A partir dos resultados obtidos, verificamos que a SNAC mostra efeitos benéficos na correção das complicações provocadas pelo modelo de ligadura de ducto biliar comum. Essas evidências despertam grande interesse e abre-nos perspectivas de investigar de forma mais aprofundada seus efeitos sobre ativação de cascatas moleculares, tanto no fígado como no pulmão de ratos cirróticos.

Nossas perspectivas focam a continuidade do estudo investigado os mecanismos que envolvem o estresse oxidativo, a ativação da rota do NFκB e a transcrição de proteínas inflamatórias, como a iNOS, no pulmão de ratos cirróticos. Esse objetivo é condizente com a aplicabilidade da SNAC, pois ela se mostrou muito eficaz no tratamento da cirrose hepática. A avaliação da genotoxicidade da SNAC também se faz muito importante nessa linha de pesquisa, visto que é um fármaco recente e pouco se sabe sobre os efeitos adversos desse fármaco.

---

## ANEXOS

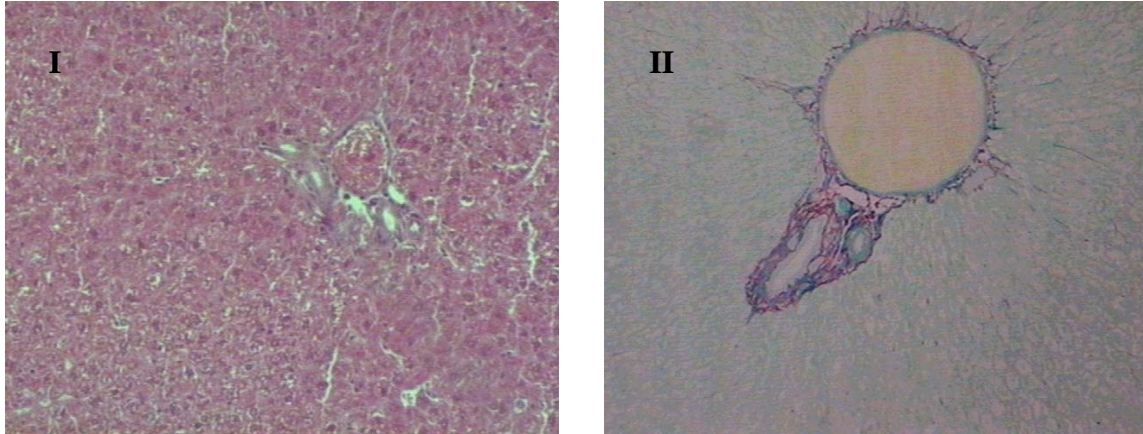
---

## 8. ANEXOS

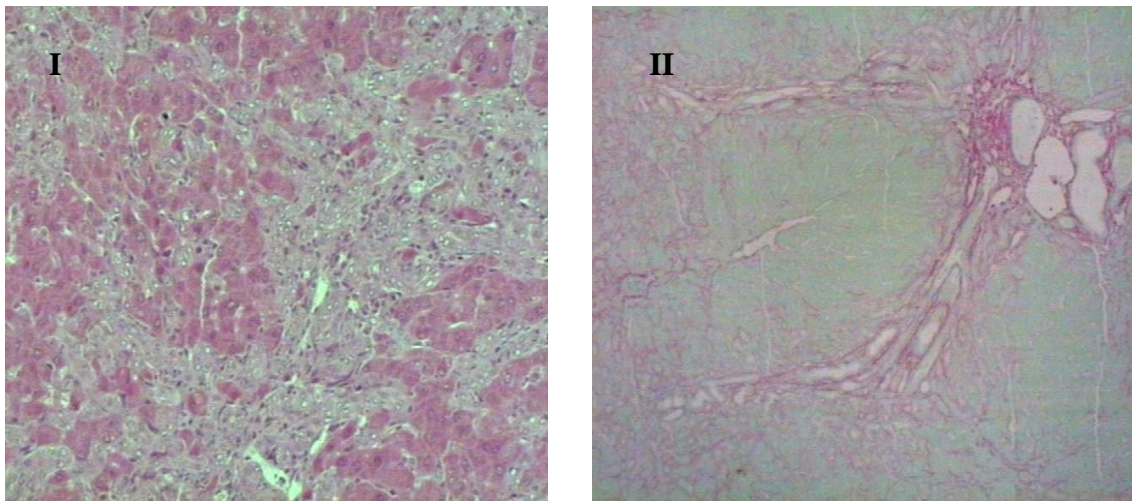
---

### 8.1 Anexo I

Histologia de fígado dos animais do **experimento I** mostrando o grupo Sham (Figura 15) CBDL (Figura 16) e CBDL + NAC (Figura 17).

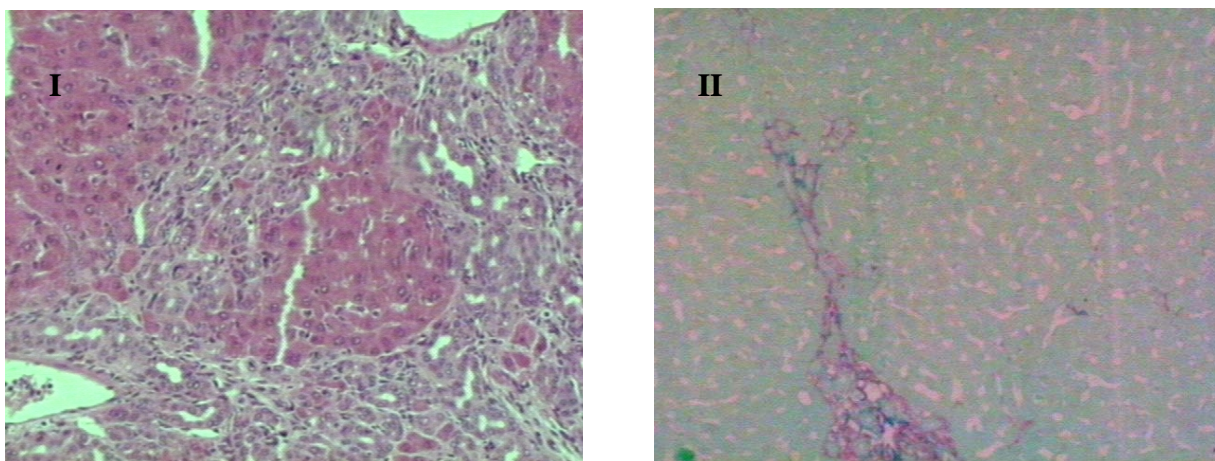


**Figura 14.** Histologia de fígado de animais do grupo Sham com coloração de (I) hematoxilina-eosina com parênquima normal e (II) picrosírius, mostrando a estrutura lobular hepática (100x).



**Figura 15.** Histologia de fígado de animais do grupo CBDL com coloração de (I) hematoxilina-eosina e (II) picrosírius, mostrando alterações no parênquima hepático, com presença de nódulos regenerativos e fibrose (100x).

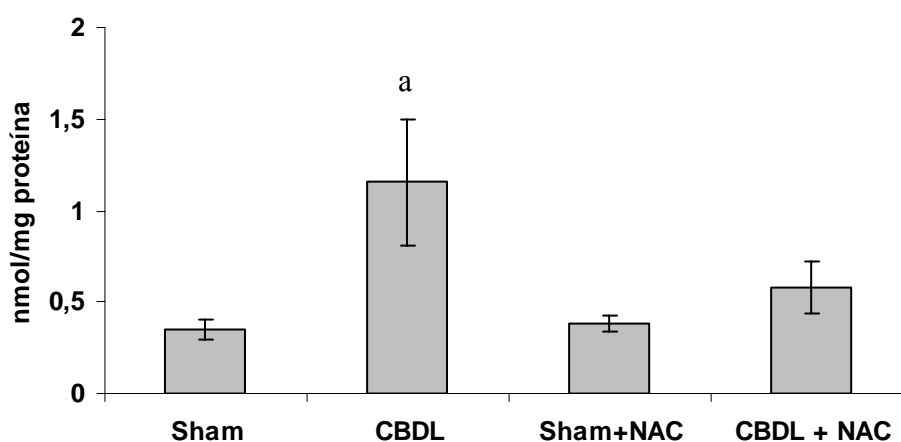




**Figura 16.** Histologia de fígado de animais do grupo CBDL+NAC com coloração de (I) hematoxilina-eosina e (II) picrosírius, mostrando redução da fibrose e nódulos (100x).

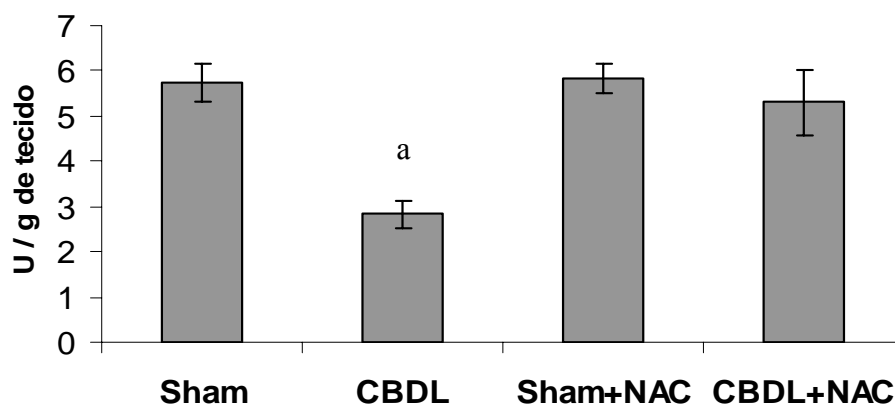
## 8.2 Anexo II

Dados de TBARS e atividade da SOD nos grupos Sham e CBDL tratados e não tratados com SNAC.



**Figura 17.** Valores médios de lipoperoxidação (TBA-RS) no fígado dos diferentes grupos estudados do **experimento I**. Os resultados acima são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), de seis animais em cada grupo. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

a – diferença significativa em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ )



**Figura 18.** Valores médios de atividade antioxidante da enzima SOD no fígado dos diferentes grupos estudados do **experimento I**. Os resultados acima são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), de seis animais em cada grupo. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

a – diferença significativa em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ )

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABDEL-AZIZ, G. *et al.* Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat. *Am J Pathol* [S.I.], v. 137, n. 6, p. 1333-42, Dec 1990.

ABOUSSOUAN, L.; STOLLER, J. The hepatopulmonary syndrome. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* [S.I.], v. 14, n. 6, p. 1033-48, Dec 2000.

AGUSTI, A. *et al.* Pulmonary hemodynamics and gas exchange during exercise in liver cirrhosis. *Am Rev Respir Dis* [S.I.], v. 139, n. 2, p. 485-91, Feb 1989.

AMÁLIA, P. *et al.* Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. *Dig Dis Sci* [S.I.], v. 52, n. 10, p. 2616-21, Oct 2007.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, A. AVMA releases updated euthanasia guidelines. *JAVMA-JOURNAL OF THE AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION* [S.I.], v. 231, n. 6, p. 827-827, SEP 15 2007 2007a.

\_\_\_\_\_. AVMA updates its euthanasia guidelines. *VETERINARY RECORD* [S.I.], v. 161, n. 15, p. 502-502, OCT 13 2007 2007b.

ARUOMA, O. *et al.* The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* [S.I.], v. 6, n. 6, p. 593-7, 1989.

ASKEW, S. *et al.* Chemical mechanisms underlying the vasodilator and platelet anti-aggregating properties of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine and S-nitrosoglutathione. *Bioorg Med Chem* [S.I.], v. 3, n. 1, p. 1-9, Jan 1995.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS. RBT - Registro Brasileiro de Transplantes. 2008.

BARCELLOS-HOFF, M.; DIX, T. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol Endocrinol* [S.I.], v. 10, n. 9, p. 1077-83, Sep 1996.

BAUMGARDNER, J. *et al.* N-acetylcysteine attenuates progression of liver pathology in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr* [S.I.], v. 138, n. 10, p. 1872-9, Oct 2008.

BAKKER, J. *et al.* Effects of N-acetylcysteine in endotoxic shock. *J Crit Care* [S.I.], v. 9, n. 4, p. 236-43, Dec 1994.

BECKMAN, J.; KOPPENOL, W. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* [S.I.], v. 271, n. 5 Pt 1, p. C1424-37, Nov 1996.

BENYON, R.; ARTHUR, M. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* [S.I.], v. 21, n. 3, p. 373-84, Aug 2001.

BERGAMINI, S. *et al.* N-acetylcysteine inhibits in vivo nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* [S.I.], v. 5, n. 4, p. 349-60, Aug 2001.

BILLACK, B. Macrophage activation: role of toll-like receptors, nitric oxide, and nuclear factor kappa B. *Am J Pharm Educ* [S.I.], v. 70, n. 5, p. 102, Oct 2006.

BILZER, M. *et al.* Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* [S.I.], v. 26, n. 10, p. 1175-86, Dec 2006.

BISSELL, D. Lipocyte activation and hepatic fibrosis. *Gastroenterology* [S.I.], v. 102, n. 5, p. 1803-5, May 1992.

BITENCOUTT, P. Metabolismo do Ácido Araquidômico na Sepse. In: MANOLE (Ed.). *Sepse*. São Paulo, 2007.

BLOMHOFF, R.; WAKE, K. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J* [S.I.], v. 5, n. 3, p. 271-7, Mar 1991.

BONIS, P. *et al.* Is liver fibrosis reversible? *N Engl J Med* [S.I.], v. 344, n. 6, p. 452-4, Feb 2001.

BORKHAM-KAMPHORST, E. *et al.* Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. *J Hepatol* [S.I.], v. 46, n. 6, p. 1064-74, Jun 2007.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* [S.I.], v. 134, n. 3, p. 707-16, Jul 1973.

BRANDÃO, A.; MARRONI, C. Testes de função hepática. In: MATTOS, A.; DANTAS, W. (Ed.). *Compêndio de Hepatologia*. São Paulo: Fundação BYK, 2001.

BROUWER, A. *et al.* Isolation and culture of Kupffer cells from human liver. Ultrastructure, endocytosis and prostaglandin synthesis. *J Hepatol* [S.I.], v. 6, n. 1, p. 36-49, Feb 1988.

BUEGE, J.; AUST, S. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* [S.I.], v. 52, p. 302-10, 1978.

BURGERING, B. *et al.* Epidermal growth factor induces phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 via multiple pathways. *Mol Cell Biol* [S.I.], v. 13, n. 12, p. 7248-56, Dec 1993.

CAMPOS MAIA, E. *et al.* Repercussões temporais da ligadura do ducto biliar. *Acta Cirúrgica Brasileira* [S.I.], v. 18, n. 1, p. 45-50, 2003.

CARLONI, V. *et al.* Cell adhesion regulates platelet-derived growth factor-induced MAP kinase and PI-3 kinase activation in stellate cells. *Hepatology* [S.I.], v. 36, n. 3, p. 582-91, Sep 2002.

CHANCE, B. *et al.* Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* [S.I.], v. 59, n. 3, p. 527-605, Jul 1979.

CHANG, S.; OHARA, N. Increased pulmonary vascular permeability in rats with biliary cirrhosis: role of thromboxane A<sub>2</sub>. *Am J Physiol* [S.I.], v. 264, n. 3 Pt 1, p. L245-52, Mar 1993.

CLANCY, R. *et al.* Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 91, n. 9, p. 3680-4, Apr 1994.

CONDE DE LA ROSA, L. *et al.* Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: involvement of JNK and ERK MAP kinases. *J Hepatol* [S.I.], v. 44, n. 5, p. 918-29, May 2006.

COTGREAVE, I. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol* [S.I.], v. 38, p. 205-27, 1997.

CREWS, C.; ERIKSON, R. Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to Mek of it all. *Cell* [S.I.], v. 74, n. 2, p. 215-7, Jul 1993.

CUZZOCREA, S. *et al.* Effects of n-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Res* [S.I.], v. 47, n. 3, p. 537-48, Aug 2000.

DAVIS, R. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Soc Symp* [S.I.], v. 64, p. 1-12, 1999.

DE OLIVEIRA, C. *et al.* Prevention and reversion of nonalcoholic steatohepatitis in OB/OB mice by S-nitroso-N-acetylcysteine treatment. *J Am Coll Nutr* [S.I.], v. 27, n. 2, p. 299-305, Apr 2008.

\_\_\_\_\_. Oral administration of S-nitroso-N-acetylcysteine prevents the onset of non alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol* [S.I.], v. 12, n. 12, p. 1905-11, Mar 2006.

DÍAZ-GIL, J. *et al.* The anti-fibrotic effect of liver growth factor is associated with decreased intrahepatic levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 and transforming growth factor beta 1 in bile duct-ligated rats. *Histol Histopathol* [S.I.], v. 23, n. 5, p. 583-91, May 2008.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* [S.I.], v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan 2002.

FAILLI, P. *et al.* Nitrovasodilators inhibit platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* [S.I.], v. 119, n. 2, p. 479-92, Aug 2000.

\_\_\_\_\_. Effect of N-acetyl-L-cysteine on peroxynitrite and superoxide anion production of lung alveolar macrophages in systemic sclerosis. *Nitric Oxide* [S.I.], v. 7, n. 4, p. 277-82, Dec 2002.

FALLON, M. B. *et al.* Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol* [S.I.], v. 272, n. 4 Pt 1, p. G779-84, Apr 1997.

FALLON, M. B.; ABRAMS, G. A. Pulmonary dysfunction in chronic liver disease. *Hepatology* [S.I.], v. 32, n. 4 Pt 1, p. 859-65, Oct 2000.

FALLON, M. Mechanisms of pulmonary vascular complications of liver disease: hepatopulmonary syndrome. *J Clin Gastroenterol* [S.I.], v. 39, n. 4 Suppl 2, p. S138-42, Apr 2005.

FARBER, J. *et al.* Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest* [S.I.], v. 62, n. 6, p. 670-9, Jun 1990.

FAROMBI, E. Genotoxicity of chloroquine in rat liver cells: protective role of free radical scavengers. *Cell Biol Toxicol* [S.I.], v. 22, n. 3, p. 159-67, May 2006.

FERNANDES, A.; MIES, S. Hipertensão Portal. In: ROBE (Ed.). *Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia*. São Paulo: Silva, OC; Zucoloto S, 1998.

FERNANDO, B. *et al.* N-acetylcysteine prevents development of the hyperdynamic circulation in the portal hypertensive rat. *Hepatology* [S.I.], v. 28, n. 3, p. 689-94, Sep 1998.

FERRAZ-NETO, B.; CARBALLO, R. Evolução e Perspectiva do Transplante de Fígado no Brasil. *Pratica Hospitalar* [S.I.], v. 50, p. 167-170, 2007.

FILIPPIN, L. *et al.* Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* [S.I.], v. 152, n. 3, p. 415-22, Jun 2008.

FORSLUND, T. *et al.* Nitric oxide regulates the aggregation of stimulated human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 274, n. 2, p. 482-7, Aug 2000.

FRIEDMAN, S. *et al.* Retinol release by activated rat hepatic lipocytes: regulation by Kupffer cell-conditioned medium and PDGF. *Am J Physiol* [S.I.], v. 264, n. 5 Pt 1, p. G947-52, May 1993.

FRIEDMAN, S. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* [S.I.], v. 38 Suppl 1, p. S38-53, 2003.

\_\_\_\_\_. Hepatic fibrosis -- overview. *Toxicology* [S.I.], v. 254, n. 3, p. 120-9, Dec 2008a.

\_\_\_\_\_. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* [S.I.], v. 134, n. 6, p. 1655-69, May 2008b.

\_\_\_\_\_. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* [S.I.], v. 19, n. 2, p. 129-40, 1999.

FURUKAWA, F. et al. p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts. *Hepatology* [S.I.], v. 38, n. 4, p. 879-89, Oct 2003.

GALICIA-MORENO, M. et al. N-acetylcysteine prevents carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis: role of liver transforming growth factor-beta and oxidative stress. *Eur J Gastroenterol Hepatol* [S.I.], Apr 2009.

GALLI, A. et al. Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2-mediated mechanism. *Hepatology* [S.I.], v. 41, n. 5, p. 1074-84, May 2005.

GARCIA, J. et al. S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) prevents myocardial alterations in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice by antiinflammatory action. *J Cardiovasc Pharmacol* [S.I.], v. 51, n. 1, p. 78-85, Jan 2008.

GASTON, B. et al. Relaxation of human bronchial smooth muscle by S-nitrosothiols in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* [S.I.], v. 268, n. 2, p. 978-84, Feb 1994.

GEERTS, A. et al. Tissue distribution, quantitation and proliferation kinetics of fat-storing cells in carbon tetrachloride-injured rat liver. *Hepatology* [S.I.], v. 13, n. 6, p. 1193-202, Jun 1991.

GENESCA, J. et al. Increased tumour necrosis factor alpha production in mesenteric lymph nodes of cirrhotic patients with ascites. *Gut* [S.I.], v. 52, n. 7, p. 1054-9, Jul 2003.

GOLDIN, J. R.; RAYMUNDO, M. M. *Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais*. 2ª ed. Porto Alegre, 1997.

GONZALEZ FLECHA, B. et al. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* [S.I.], v. 10, n. 2, p. 93-100, 1991.

GRANGER, D. et al. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol* [S.I.], v. 301, p. 49-61, 1999.

GUYTON, K. et al. Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* [S.I.], v. 271, n. 8, p. 4138-42, Feb 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3 ed. ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4 ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HALPERN, B.; PACAUD, A. \*Technique d pelevement dechantillons de sang chez les petits animaux de laboratoire par ponction du plexus ophthalmique. *Comptes Rendus*



*Des Seances de la societe de biologie et de ses filiales* [S.I.], V. 145, N. 19-2, P. 1465-1466, 1951.

HELLERBRAND, C. *et al.* Cytokines induce NF-kappaB in activated but not in quiescent rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol* [S.I.], v. 275, n. 2 Pt 1, p. G269-78, Aug 1998.

HEMMANN, S. *et al.* Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* [S.I.], v. 46, n. 5, p. 955-75, May 2007.

HERVE, P. *et al.* Pulmonary vascular abnormalities in cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 141-59, 2007.

HOGG, N. Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Radic Biol Med* [S.I.], v. 28, n. 10, p. 1478-86, May 2000.

HOUAISS; ANTONIO. *Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa*. 1. ed. Rio de Janeiro: Objetiva, 2001.

HUFFMYER, J.; NEMERGUT, E. Respiratory dysfunction and pulmonary disease in cirrhosis and other hepatic disorders. *Respir Care* [S.I.], v. 52, n. 8, p. 1030-6, Aug 2007.

HUI, A.; FRIEDMAN, S. Molecular basis of hepatic fibrosis. *Expert Rev Mol Med* [S.I.], v. 5, n. 5, p. 1-23, Feb 2003.

HWANG, E.; KIM, G. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology* [S.I.], v. 229, n. 1-2, p. 1-10, Jan 2007.

IGNARRO, L. *et al.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 84, n. 24, p. 9265-9, Dec 1987.

IHN, H. *et al.* Increased phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase p38 in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol* [S.I.], v. 125, n. 2, p. 247-55, Aug 2005.

ILES, K.; FORMAN, H. Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol Res* [S.I.], v. 26, n. 1-3, p. 95-105, 2002.

INAGAKI, Y.; OKAZAKI, I. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* [S.I.], v. 56, n. 2, p. 284-92, Feb 2007.

IREDALE, J. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* [S.I.], v. 21, n. 3, p. 427-36, Aug 2001.

JANSSEN-HEININGER, Y. *et al.* Cooperativity between oxidants and tumor necrosis factor in the activation of nuclear factor (NF)-kappaB: requirement of Ras/mitogen-

activated protein kinases in the activation of NF-kappaB by oxidants. *Am J Respir Cell Mol Biol* [S.I.], v. 20, n. 5, p. 942-52, May 1999.

JENSEN, D. Endoscopic screening for varices in cirrhosis: findings, implications, and outcomes. *Gastroenterology* [S.I.], v. 122, n. 6, p. 1620-30, May 2002.

JIMÉNEZ, L. *et al.* Role of extracellular signal-regulated protein kinases in apoptosis by asbestos and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Am J Physiol* [S.I.], v. 273, n. 5 Pt 1, p. L1029-35, Nov 1997.

KAMINSKA, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1754, n. 1-2, p. 253-62, Dec 2005.

KAYE, D. *et al.* S-nitrosothiols inhibit neuronal norepinephrine transport. *Am J Physiol* [S.I.], v. 272, n. 2 Pt 2, p. H875-83, Feb 1997.

KELLY, G. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev* [S.I.], v. 3, n. 2, p. 114-27, Apr 1998.

KITAMURA, K. *et al.* Pathogenic roles of tumor necrosis factor receptor p55-mediated signals in dimethylnitrosamine-induced murine liver fibrosis. *Lab Invest* [S.I.], v. 82, n. 5, p. 571-83, May 2002.

KOUNTOURAS, J. *et al.* Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* [S.I.], v. 65, n. 3, p. 305-11, Jun 1984.

KRINSKY, N. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic Biol Med* [S.I.], v. 7, n. 6, p. 617-35, 1989.

KROWKA, M.; CORTESE, D. Hepatopulmonary syndrome. Current concepts in diagnostic and therapeutic considerations. *Chest* [S.I.], v. 105, n. 5, p. 1528-37, May 1994.

KROWKA, M. *et al.* Hepatopulmonary syndrome. Clinical observations and lack of therapeutic response to somatostatin analogue. *Chest* [S.I.], v. 104, n. 2, p. 515-21, Aug 1993.

LALEMAN, W. *et al.* Nitroflurbiprofen, a nitric oxide-releasing cyclooxygenase inhibitor, improves cirrhotic portal hypertension in rats. *Gastroenterology* [S.I.], v. 132, n. 2, p. 709-19, Feb 2007.

LANDER, H. *et al.* Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J Biol Chem* [S.I.], v. 271, n. 33, p. 19705-9, Aug 1996.

LANDVIK, S. *et al.* Efficacy of vitamin e in human health and disease. In: CADENAS, E.; PACKER, L. (Ed.). *Hanbook of Antioxidants*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002. p. 75-97.

LANGE, P.; STOLLER, J. The hepatopulmonary syndrome. *Ann Intern Med* [S.I.], v. 122, n. 7, p. 521-9, Apr 1995.

LAWRENCE, M. *et al.* The roles of MAPKs in disease. *Cell Res* [S.I.], v. 18, n. 4, p. 436-42, Apr 2008.

LECHUGA, C. *et al.* PI3K is involved in PDGF-beta receptor upregulation post-PDGF-BB treatment in mouse HSC. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [S.I.], v. 291, n. 6, p. G1051-61, Dec 2006.

LEE, S. *et al.* Reduction of hepatocellular injury after common bile duct ligation using omega-3 fatty acids. *J Pediatr Surg* [S.I.], v. 43, n. 11, p. 2010-5, Nov 2008.

LIU, D. *et al.* N-acetylcysteine attenuates acute lung injury induced by fat embolism. *Crit Care Med* [S.I.], v. 36, n. 2, p. 565-71, Feb 2008.

LIU, Z. *et al.* S-Transnitrosation reactions are involved in the metabolic fate and biological actions of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* [S.I.], v. 284, n. 2, p. 526-34, Feb 1998.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* [S.I.], v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

LLESUY, S. Introducción y especies activas de oxígeno. In: ULBRA (Ed.). *Estresse oxidativo e antioxidantes*. Canoas: MARRONI, N. P.(org), 2002. p. 21-32.

LOWRY, O. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* [S.I.], v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951.

LUO, B. *et al.* ET-1 and TNF-alpha in HPS: analysis in prehepatic portal hypertension and biliary and nonbiliary cirrhosis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [S.I.], v. 286, n. 2, p. G294-303, Feb 2004.

LÜTH, H. *et al.* Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation. *Brain Res* [S.I.], v. 953, n. 1-2, p. 135-43, Oct 2002.

MARRA, F. *et al.* Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol* [S.I.], v. 152, n. 2, p. 423-30, Feb 1998.

MATSUZAWA, A.; ICHIJO, H. Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1780, n. 11, p. 1325-36, Nov 2008.

MAVOURNIN, K. *et al.* The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* [S.I.], v. 239, n. 1, p. 29-80, Jul 1990.

MCCUBREY, J. *et al.* Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal* [S.I.], v. 8, n. 9-10, p. 1775-89, 2006.

MACGREGOR, J. T. *et al.* Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res* [S.I.], v. 189, n. 2, p. 103-12, Oct 1987.

MCCUSKEY, R. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. *Liver* [S.I.], v. 20, n. 1, p. 3-7, Feb 2000.

MISRA, H.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* [S.I.], v. 247, n. 10, p. 3170-5, May 1972.

MITSOPOULOS, P. *et al.* Effectiveness of liposomal-N-acetylcysteine against LPS-induced lung injuries in rodents. *Int J Pharm* [S.I.], v. 363, n. 1-2, p. 106-11, Nov 2008.

MOAL, F. *et al.* Hemodynamic and antifibrotic effects of a selective liver nitric oxide donor V-PYRRO/NO in bile duct ligated rats. *World J Gastroenterol* [S.I.], v. 12, n. 41, p. 6639-45, Nov 2006.

MOREIRA, A. *et al.* Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol* [S.I.], v. 68, n. 10, p. 1939-46, Nov 2004.

MORLEY, N. *et al.* N-acetyl-L-cysteine prevents DNA damage induced by UVA, UVB and visible radiation in human fibroblasts. *J Photochem Photobiol B* [S.I.], v. 72, n. 1-3, p. 55-60, Dec 2003.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* [S.I.], v. 155, p. 335-50, 1987.

MURPHY, F. *et al.* Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* [S.I.], v. 277, n. 13, p. 11069-76, Mar 2002.

NASCHITZ, J. *et al.* Heart diseases affecting the liver and liver diseases affecting the heart. *Am Heart J* [S.I.], v. 140, n. 1, p. 111-20, Jul 2000.

NATHAN, C.; XIE, Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* [S.I.], v. 78, n. 6, p. 915-8, Sep 1994.

NUNES, H. *et al.* Role of nitric oxide in hepatopulmonary syndrome in cirrhotic rats. *Am J Respir Crit Care Med* [S.I.], v. 164, n. 5, p. 879-85, Sep 2001.

OKAY, E. *et al.* N-acetylcysteine attenuates bacterial translocation after partial hepatectomy in rats. *J Surg Res* [S.I.], v. 127, n. 2, p. 164-70, Aug 2005.

OKTYABRSKY, O.; SMIRNOVA, G. Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry (Mosc)* [S.I.], v. 72, n. 2, p. 132-45, Feb 2007.

ORELLANA, M. *et al.* Bile duct ligation and oxidative stress in the rat: effects in liver and kidney. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* [S.I.], v. 126, n. 2, p. 105-11, Jun 2000.

PALMA, D.; FALLON, M. The hepatopulmonary syndrome. *J Hepatol* [S.I.], v. 45, n. 4, p. 617-25, Oct 2006.

PANOS, R.; BAKER, S. Mediators, cytokines, and growth factors in liver-lung interactions. *Clin Chest Med* [S.I.], v. 17, n. 1, p. 151-69, Mar 1996.

PARK, J. *et al.* Transnitrosation as a predominant mechanism in the hypotensive effect of S-nitrosoglutathione. *Biochem Mol Biol Int* [S.I.], v. 30, n. 5, p. 885-91, Aug 1993.

PAROLA, M. *et al.* On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Radic Biol Med* [S.I.], v. 20, n. 3, p. 351-9, 1996.

PARSONS, C. *et al.* Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* [S.I.], v. 22 Suppl 1, p. S79-84, Jun 2007.

PASTOR, A. *et al.* Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *J Hepatol* [S.I.], v. 27, n. 2, p. 363-70, Aug 1997.

PAVANATO, A. *et al.* Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci* [S.I.], v. 48, n. 4, p. 824-9, Apr 2003.

PAVANATO, A. *Ação protetora da quercetina no fígado de ratos cirróticos.* (2004). 120 f. (Doutor) - Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

PEARSON, G. *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* [S.I.], v. 22, n. 2, p. 153-83, Apr 2001.

PEREIRA-FILHO, G. *et al.* Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats. *Arq Gastroenterol* [S.I.], v. 45, n. 2, p. 156-62, 2008.

PERES, W. *et al.* The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol* [S.I.], v. 33, n. 5, p. 742-50, Nov 2000.

PICADA, J. N. *et al.* DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Brain Res Mol Brain Res* [S.I.], v. 114, n. 1, p. 80-5, May 26 2003.

QIANG, H. *et al.* Differential expression genes analyzed by cDNA array in the regulation of rat hepatic fibrogenesis. *Liver Int* [S.I.], v. 26, n. 9, p. 1126-37, Nov 2006.

RABILLER, A. *et al.* Prevention of gram-negative translocation reduces the severity of hepatopulmonary syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* [S.I.], v. 166, n. 4, p. 514-7, Aug 15 2002.

RAMOS, J. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* [S.I.], v. 40, n. 12, p. 2707-19, 2008.

REIF, S. *et al.* The role of focal adhesion kinase-phosphatidylinositol 3-kinase-akt signaling in hepatic stellate cell proliferation and type I collagen expression. *J Biol Chem* [S.I.], v. 278, n. 10, p. 8083-90, Mar 2003.

REPETTO, M.; LLESUY, S. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res* [S.I.], v. 35, n. 5, p. 523-34, May 2002.

REZAEI, A. *et al.* The effects of N-acetylcysteine on the expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in hepatic fibrosis in bile duct ligated rats. *Hepatol Res* [S.I.], v. 38, n. 12, p. 1252-63, Dec 2008.

RICHARDSON, G.; BENJAMIN, N. Potential therapeutic uses for S-nitrosothiols. *Clin Sci (Lond)* [S.I.], v. 102, n. 1, p. 99-105, Jan 2002.

ROBERTS, D. *et al.* Cost-effectiveness of screening for hepatopulmonary syndrome in liver transplant candidates. *Liver Transpl* [S.I.], v. 13, n. 2, p. 206-14, Feb 2007.

ROCKEY, D. Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology* [S.I.], v. 37, n. 1, p. 4-12, Jan 2003.

ROCKEY, D.; CHUNG, J. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* [S.I.], v. 114, n. 2, p. 344-51, Feb 1998.

ROCKEY, D.; WEISIGER, R. Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology* [S.I.], v. 24, n. 1, p. 233-40, Jul 1996.

RODRÍGUEZ-ROISIN, R.; KROWKA, M. Hepatopulmonary syndrome--a liver-induced lung vascular disorder. *N Engl J Med* [S.I.], v. 358, n. 22, p. 2378-87, May 2008.

RODRÍGUEZ-ROISIN, R. *et al.* Pulmonary-Hepatic vascular Disorders (PHD). *Eur Respir J* [S.I.], v. 24, n. 5, p. 861-80, Nov 2004.

ROMBOUTS, K. *et al.* Actin filament formation, reorganization and migration are impaired in hepatic stellate cells under influence of trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor. *J Hepatol* [S.I.], v. 37, n. 6, p. 788-96, Dec 2002.

RONIS, M. *et al.* Effects of N-acetylcysteine on ethanol-induced hepatotoxicity in rats fed via total enteral nutrition. *Free Radic Biol Med* [S.I.], v. 39, n. 5, p. 619-30, Sep 2005.

RUBBO, C.; RADİ, R. Antioxidant properties of NO. In: CADENAS, E.; PACKER, L. (Ed.). *Handbook of Antioxidants*. New York: Ed. Marcel Dekker, 2002.

RUBBO, H. *et al.* Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* [S.I.], v. 269, n. 42, p. 26066-75, Oct 1994.

SAIKI, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* [S.I.], v. 239, n. 4839, p. 487-91, Jan 29 1988.

SALVEMINI, D. *et al.* Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation. *Biochem Soc Trans* [S.I.], v. 34, n. Pt 5, p. 965-70, Nov 2006.

SCHMUCKER, D. *et al.* Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. *Hepatology* [S.I.], v. 12, n. 5, p. 1216-21, Nov 1990.

SCHIEKE, S. *et al.* Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation. *FEBS Lett* [S.I.], v. 448, n. 2-3, p. 301-3, Apr 1999.

SCHIFF, E. R. *et al.* Schiff's diseases of the liver. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. p. 122-134.

SEKI, E. *et al.* TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* [S.I.], v. 13, n. 11, p. 1324-32, Nov 2007.

SEXTON, D. *et al.* Visible light photochemical release of nitric oxide from S-nitrosoglutathione: potential photochemotherapeutic applications. *Photochem Photobiol* [S.I.], v. 59, n. 4, p. 463-7, Apr 1994.

SHAH, V. *et al.* Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* [S.I.], v. 117, n. 5, p. 1222-8, Nov 1999.

SHERLOCK, S. Chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology* [S.I.], v. 4, n. 1 Suppl, p. 25S-28S, 1984.

SHIRATORI, Y. *et al.* Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann Intern Med* [S.I.], v. 132, n. 7, p. 517-24, Apr 2000.

SHISHIDO, S.; DE OLIVEIRA, M. Polyethylene glycol matrix reduces the rates of photochemical and thermal release of nitric oxide from S-nitroso-N-acetylcysteine. *Photochem Photobiol* [S.I.], v. 71, n. 3, p. 273-80, Mar 2000.

SIES, H.; MURPHY, M. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol B* [S.I.], v. 8, n. 2, p. 211-8, Jan 1991.

SIKULER, E. *et al.* Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol* [S.I.], v. 248, n. 6 Pt 1, p. G618-25, Jun 1985.

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

SIMON, D. *et al.* Antiplatelet properties of protein S-nitrosothiols derived from nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor. *Arterioscler Thromb* [S.I.], v. 13, n. 6, p. 791-9, Jun 1993.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol* [S.I.], v. 113, p. 203-12, 1999.

SPRONG, R. *et al.* Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *Am J Respir Crit Care Med* [S.I.], v. 157, n. 4 Pt 1, p. 1283-93, Apr 1998.

STAMLER, J. *et al.* S-nitrosylation of tissue-type plasminogen activator confers vasodilatory and antiplatelet properties on the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 89, n. 17, p. 8087-91, Sep 1992.

SUN, Y.; OBERLEY, L. Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic Biol Med* [S.I.], v. 21, n. 3, p. 335-48, 1996.

SVEGLIATI BARONI, G. *et al.* Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* [S.I.], v. 27, n. 3, p. 720-6, Mar 1998.

SÄRNSTRAND, B. *et al.* Effects of N-acetylcysteine stereoisomers on oxygen-induced lung injury in rats. *Chem Biol Interact* [S.I.], v. 94, n. 2, p. 157-64, Feb 1995.

SZABÓ, C. *et al.* Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* [S.I.], v. 6, n. 8, p. 662-80, Aug 2007.

SZUSTER-CIESIELSKA, A. *et al.* Zinc supplementation attenuates ethanol- and acetaldehyde-induced liver stellate cell activation by inhibiting reactive oxygen species (ROS) production and by influencing intracellular signaling. *Biochem Pharmacol* [S.I.], v. 78, n. 3, p. 301-14, Aug 2009.

TAHAN, G. *et al.* The effects of N-acetylcysteine on bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. *Dig Dis Sci* [S.I.], v. 52, n. 12, p. 3348-54, Dec 2007.

TALARMIN, H. *et al.* The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes. *Mol Cell Biol* [S.I.], v. 19, n. 9, p. 6003-11, Sep 1999.

TANG, L. *et al.* Modulation of pulmonary endothelial endothelin B receptor expression and signaling: implications for experimental hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [S.I.], v. 292, n. 6, p. L1467-72, Jun 2007.

TAUB, R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* [S.I.], v. 5, n. 10, p. 836-47, Oct 2004.



THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [S.I.], v. 279, n. 6, p. L1005-28, Dec 2000.

TICE, R. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* [S.I.], v. 35, n. 3, p. 206-21, 2000.

TIEPPO, J. *et al.* [Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress]. *Arq Gastroenterol* [S.I.], v. 42, n. 4, p. 244-8, Oct-Dec 2005.

\_\_\_\_\_. Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food Chem Toxicol* [S.I.], v. 45, n. 7, p. 1140-6, Jul 2007.

\_\_\_\_\_. Quercetin Administration Ameliorates Pulmonary Complications of Cirrhosis in Rats. *J Nutr* [S.I.], Jun 2009.

TSUKAMOTO, H. *et al.* Roles of oxidative stress in activation of Kupffer and Ito cells in liver fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* [S.I.], v. 10 Suppl 1, p. S50-3, 1995.

TSUKADA, S. *et al.* SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate alpha1(I) collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* [S.I.], v. 280, n. 11, p. 10055-64, Mar 2005.

TÜRÜT, H. *et al.* Effects of early administration of dexamethasone, N-acetylcysteine and aprotinin on inflammatory and oxidant-antioxidant status after lung contusion in rats. *Injury* [S.I.], v. 40, n. 5, p. 521-7, May 2009.

TZIROU, C.; FREEDMAN, J. The many antithrombotic actions of nitric oxide. *Curr Drug Targets* [S.I.], v. 7, n. 10, p. 1243-51, Oct 2006.

UEDA, S. *et al.* Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal* [S.I.], v. 4, n. 3, p. 405-14, Jun 2002.

URTASUN, R. *et al.* Oxidative and nitrosative stress and fibrogenic response. *Clin Liver Dis* [S.I.], v. 12, n. 4, p. 769-90, viii, Nov 2008.

\_\_\_\_\_. Reactive nitrogen species switch on early extracellular matrix remodeling via induction of MMP1 and TNFalpha. *Gastroenterology* [S.I.], v. 136, n. 4, p. 1410-22, e1-4, Apr 2009.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* [S.I.], v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VERCELINO, R. *et al.* N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* [S.I.], v. 102, n. 4, p. 370-6, Apr 2008.

\_\_\_\_\_. [Experimental models for assessment of pulmonary alterations in hepatopulmonary syndrome]. *J Bras Pneumol* [S.I.], v. 34, n. 7, p. 453-60, Jul 2008.

WANG, K. *et al.* New chemical and biological aspects of S-nitrosothiols. *Curr Med Chem* [S.I.], v. 7, n. 8, p. 821-34, Aug 2000.

WANG, J. *et al.* Role of ethanol in the regulation of hepatic stellate cell function. *World J Gastroenterol* [S.I.], v. 12, n. 43, p. 6926-32, Nov 2006.

WAKE, K. "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat* [S.I.], v. 132, n. 4, p. 429-62, Dec 1971.

WANLESS, I. *et al.* Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med* [S.I.], v. 124, n. 11, p. 1599-607, Nov 2000.

WANSTALL, J. *et al.* Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion. *Br J Pharmacol* [S.I.], v. 134, n. 3, p. 463-72, Oct 2001.

WARNER, A.; BRAIN, J. The cell biology and pathogenic role of pulmonary intravascular macrophages. *Am J Physiol* [S.I.], v. 258, n. 2 Pt 1, p. L1-12, Feb 1990.

WIEST, R. *et al.* Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest* [S.I.], v. 104, n. 9, p. 1223-33, Nov 1999.

WINK, D. *et al.* Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O<sub>2</sub> reaction. *Chem Res Toxicol* [S.I.], v. 7, n. 4, p. 519-25, 1994.

YANG, F. *et al.* Effects of reducing reagents and temperature on conversion of nitrite and nitrate to nitric oxide and detection of NO by chemiluminescence. *Clin Chem* [S.I.], v. 43, n. 4, p. 657-62, Apr 1997.

YANG, K. *et al.* Antagonizing TGF-beta induced liver fibrosis by a retinoic acid derivative through regulation of ROS and calcium influx. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 365, n. 3, p. 484-9, Jan 2008.

YANG, Y. *et al.* Effects of N-acetylcysteine administration in hepatic microcirculation of rats with biliary cirrhosis. *J Hepatol* [S.I.], v. 49, n. 1, p. 25-33, Jul 2008.

YOKOMORI, H. *et al.* Elevated expression of caveolin-1 at protein and mRNA level in human cirrhotic liver: relation with nitric oxide. *J Gastroenterol* [S.I.], v. 38, n. 9, p. 854-60, 2003.

YOSHIJI, H. *et al.* Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* [S.I.], v. 52, n. 9, p. 1347-54, Sep 2003.

YOSHIZAWA, T. *et al.* Synoviocyte innate immune responses: I. Differential regulation of interferon responses and the JNK pathway by MAPK kinases. *J Immunol* [S.I.], v. 181, n. 5, p. 3252-8, Sep 2008.

YU, B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* [S.I.], v. 74, n. 1, p. 139-62, Jan 1994.

ZAFARULLAH, M. *et al.* Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* [S.I.], v. 60, n. 1, p. 6-20, Jan 2003.

ZHANG, J. *et al.* Pulmonary angiogenesis in a rat model of hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* [S.I.], v. 136, n. 3, p. 1070-80, Mar 2009.

ZHANG, X. *et al.* Intrapulmonary vascular dilatation and nitric oxide in hypoxemic rats with chronic bile duct ligation. *J Hepatol* [S.I.], v. 39, n. 5, p. 724-30, Nov 2003.

ZHAO, J.; LIU, X. Antioxidative and immunomodulatory role of melatonin, sodium selenite, N-acetyl-L-cysteine and quercetin on human umbilical blood. *Pharmazie* [S.I.], v. 60, n. 9, p. 683-8, Sep 2005.

ZHUANG, S. *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* [S.I.], v. 275, n. 34, p. 25939-48, Aug 2000.

ZIMENT, I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. *Biomed Pharmacother* [S.I.], v. 42, n. 8, p. 513-9, 1988.

ZIMMERMAN, H.J. Drug – Induced Liver Disease. *In: Schiff's Diseases of the Liver.* SCHIFF, E.R.; SORRELL, M.F. e MADDREY, W.C. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia N.Y., 1999.

ZIMMERMANN, H. *et al.* Effect of development on the functional and histological changes induced by bile-duct ligation in the rat. *J Hepatol* [S.I.], v. 20, n. 2, p. 231-9, Feb 1994.

# 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](#)