Tânia Cristina Lima

**Cirrose hepática induzida por tioacetamida: estudo do
modelo por injeção intraperitoneal a longo prazo em ratas
Wistar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez

**São Paulo
2008**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2038
FMVZ

Lima, Tânia Cristina

Cirrose hepática induzida por tioacetamida: estudo do modelo por injeção intraperitoneal a longo prazo em ratas Wistar / Tânia Cristina Lima. – São Paulo : T. C. Lima, 2008.
140 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez.

1. Cirrose. 2. Tioacetamida. 3. Fígado. 4. Função hepática. 5. Rato. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Cirrose hepática induzida por tioacetamida: estudo do modelo por administração intraperitoneal a longo prazo em ratas Wistar", protocolado sob o nº892/2006, utilizando 107 (cento e sete) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Hepatic cirrhosis induced by thioacetamide: study of the model of intraperitoneal long term administration in Wistar rats", protocol number 892/2006, utilizing 107 (one hundred seven) rats, under the responsibility of Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 20 de março de 2008

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87 - 05508-270 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira". Fax: (11) 3032-2224 - fones: (11) 309107676/7671 - e-mail: fmvz@edu.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LIMA, Tânia Cristina

Título: Cirrose hepática induzida por tioacetamida: estudo do modelo por injeção intraperitoneal a longo prazo em ratas Wistar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Jesus Barreira Lima e Ivani Ferreira do Nascimento Lima

*pelo amor, incentivo e apoio incondicionais desde sempre;
pela confiança, paciência e pela luta constante para tornar
realidade os meus sonhos, que também são os seus...*

Aos meus familiares,

*porque sei que também se orgulham de mim e sempre pude contar
com eles*

DEDICATÓRIA

Ao meu amor:

Carlos

Namorado, companheiro, parceiro...

Deu-me o seu apoio, o seu carinho e amor.

Foi o maior incentivador e o maior crítico do meu trabalho.

*Esteve sempre ao meu lado em cada etapa e em cada detalhe,
do primeiro ao último dia...*

*Transmitiu-me a sua experiência de vida e de trabalho,
a sua paixão pelos ratos e pela natureza.*

*Todos os momentos ao seu lado são sempre muito intensos e, por
isso, tão especiais...*

Te amo

pelo que você é e do jeito que é

DEDICATÓRIA

Aos animais

*Todo o meu respeito e gratidão por essas criaturas de
Deus que colaboram com o desenvolvimento do Homem*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Deus,

*Que me permitiu chegar até aqui e realizar esse sonho.
Concedeu-me a graça de conhecer pessoas maravilhosas e
sempre foi minha companhia mais constante e fiel.
Fortaleza nos momentos difíceis, acalanto na solidão...
Em sua infinita generosidade, deu-me ainda esta recompensa!*

*Obrigada, Senhor
por suas dádivas inesgotáveis...*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Francisco,

pelo acolhimento, boa vontade e paciência, quando aqui

cheguei, inexperiente e meio perdida...

pelo exemplo de caráter, retidão, seriedade, respeito e

profissionalismo.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

- ✧ Ao Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo, onde concluo este curso de Pós-Graduação.
- ✧ À Prof^a Dr^a Maria Angélica Miglino, coordenadora do curso de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP.
- ✧ Aos professores da Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP.
- ✧ Ao técnico do laboratório de Imuno-Histoquímica da Anatomia, onde este trabalho foi desenvolvido, Diogo Nader Palermo, pelas instruções necessárias.
- ✧ Aos funcionários da Anatomia: Maicon Barbosa da Silva, Jaqueline Martins de Santana, Edinaldo Farias, João do Carmo Freitas, Raimundo Leal de Sousa, Ronaldo Agostinho da Silva, Sandra Affonso, Tatiana, Fátima, D. Branca, Rose e Débora.
- ✧ Às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação, Cláudia Lima, Deise Flexa e Joana Vasconcelos (em especial), pela atenção e ajuda que sempre prestaram.
- ✧ Às funcionárias da biblioteca da FMVZ-USP, pelo auxílio prestado sempre que necessário. À Elena, paciente, atenciosa e bem humorada.
- ✧ Ao Departamento de Patologia da FMVZ-USP, pela disponibilização das suas dependências para a realização dos experimentos.
- ✧ À Prof^a Dr^a Maria Lúcia Zaidan Dagli, docente do Departamento de Patologia, pela valiosa colaboração na avaliação histopatológica do material.

- ☞ Ao Dr. Carlos de Paula Portela, pós-doutorando do Departamento de Patologia, pela orientação na avaliação comportamental e pela imensa colaboração em todas as etapas deste trabalho.
- ☞ Aos funcionários do Biotério do Departamento de Patologia, Cláudia, Herculano, Nelsinho, Idalina e Rosiris, pela amizade e pela presteza com que sempre me ajudaram.
- ☞ Ao Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno, docente do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, e à Dr^a Maria Aderuza Horst, pós-doutoranda desse departamento, pela colaboração na realização da imuno-histoquímica.
- ☞ Aos funcionários do Setor de Informática, Miro, Antonio, Luis e Rubens.
- ☞ Aos seguranças da FMVZ-USP, que em vários finais de semana e feriados me abriram a porta do prédio.
- ☞ À empresa Bio Brasil, representante da IDEXX Laboratories Inc., que nos forneceu o aparelho de análises bioquímicas, e a sua funcionária Tatiana, pela atenção e prontidão com que nos instruiu na utilização desse aparelho.
- ☞ À FAPESP, pelo apoio financeiro (Processo nº 06/53104-4) e à CAPES.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

- Aos meus amigos e companheiros de trabalho do laboratório: Gisele, Thiago (autor da foto da ratinha), Josy, Diogo e Ricardo; Alex (e a saga do chocolate...), Elizangela (no dilema entre injetar e pegar o rato, trabalhamos muito bem juntas...) e Paula (passamos juntas os apuros da etapa final...); os ICs, Cíntia, Rodrigo, Leandro e Ellen (minha IC querida, responsável e dedicada, "expert" em histopatologia!).
- A todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Em especial Rose e Janaína, sempre tão atenciosas e pacientes, e Fernanda, sempre divertida com seus comentários pertinentes, por terem me acolhido bem desde a minha chegada. Perdoem-me não citar mais nomes, não quero cometer a injustiça de esquecer alguém.
- Às minhas amigas de Uberlândia, Roseâmely e Adriana (em memória), que me trouxeram para São Paulo e me ajudaram muito lá e aqui.
- Ao meu orientador de Iniciação Científica na Universidade Federal de Uberlândia, Zenon Silva, que incentivou a minha vinda para cá.
- Aos amigos que deixei no Departamento de Anatomia Humana da Universidade Federal de Uberlândia, Anivanda, Daniela, Sílvio, Lázaro e o meu Prof. Gilmar, pessoas muito especiais que sempre me apoiaram e torceram por mim. Não sei se ainda estão todos por lá.
- Aos amigos da faculdade, cuja amizade sobreviveu ao tempo e à distância: Ana Lúcia, Luiz, Hirla, Priscila, Marcos, Leandro, Henrique e Felipe.
- Aos amigos da escola, Luciana, Gilberto e Darlan, pela valiosa amizade que nos une há mais de 15 anos. Sei que também vibram com as minhas conquistas.
- Aos colegas do VPT, Bruno, Tereza e Cíntia, sempre tão gentis e dispostos a ajudar. E aos demais, Heidge, Andréia, Domenica, Karin, Ricardo, Luciana Vismari, Natô, Shirley, Marguith, Jorge, Buga e Lívia, Lílian, Paulo Maiorka, Dr. João Palermo, Fred e Carol, que me acolheram bem nesse departamento.

RESUMO

LIMA, T. C. Cirrose hepática induzida por tioacetamida: estudo do modelo por injeção intraperitoneal a longo prazo em ratas Wistar. [Hepatic cirrhosis induced by thioacetamide: study of the model of intraperitoneal long term administration in Wistar rats]. 2008. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A baixa sensibilidade dos animais à droga e a função hepática pouco alterada são as principais dificuldades para o desenvolvimento da cirrose hepática experimental. A proposta deste trabalho foi aprimorar o modelo de cirrose por injeção intraperitoneal de tioacetamida (TAA) a fim de reduzir a adaptação dos animais ao fármaco. Foram utilizados 5 grupos de fêmeas de ratos Wistar: A (200 mg TAA/kg); B (aumento de 20% aos 48 dias); C (aumento de 10% a cada 24 dias); D (aumento de 15% a cada 24 dias); E (solução salina). Os animais foram injetados 3 vezes por semana durante 14 semanas. Foram realizadas coletas sanguíneas, por punção cardíaca, no início, no final do experimento e antes dos aumentos de dose, para análise dos marcadores de função hepática. A avaliação comportamental foi efetuada pelo método do labirinto em cruz elevado (LCE). Amostras de fígado foram colhidas e submetidas ao processamento para microscopia de luz. Os animais tratados com TAA apresentaram piloereção, icterícia e cromodaciorréia. Os testes do LCE demonstraram estresse e/ou ansiedade nesses animais. Os fígados cirróticos apresentaram nódulos regenerativos e lesões hemorrágicas na superfície. O ganho de peso foi semelhante entre os grupos tratados, porém, inferior ao do grupo E. Os danos de função hepática foram mais acentuados nos grupos em que houve aumento de dose, entretanto, a mortalidade do grupo D foi elevada (44%). O tratamento com TAA levou ao desenvolvimento de cirrose com formação de nódulos regenerativos circundados por septos fibrosos e desarranjo da arquitetura hepática. A deposição de colágeno foi maior nos grupos B e C. O grupo D apresentou quantidade de colágeno semelhante a do grupo A. O exame histopatológico demonstrou intensa proliferação de células ovais e hiperplasia de ductos biliares com produção de muco ácido. Foi observada presença de hemossiderina, hepatócitos balonizados, lesões nucleares e células inflamatórias. A administração de TAA provocou ainda o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas, sugerindo possível efeito carcinogênico dessa substância. Os resultados demonstraram que os grupos B e C foram os mais eficazes no desenvolvimento da cirrose experimental. O grupo D, apesar do aumento maior na dose, apresentou resultados similares aos do grupo A (dose constante) e alta mortalidade, selecionando animais resistentes à droga. Assim, recomenda-se o modelo de indução do grupo B por apresentar menor mortalidade (5%), menor influência no aspecto emocional e quadro cirrótico tão grave quanto o dos animais do grupo C.

Palavras-chave: Cirrose. Tioacetamida. Fígado. Função Hepática. Rato.

ABSTRACT

LIMA, T. C. **Hepatic cirrhosis induced by thioacetamide: study of the model of intraperitoneal long term administration in Wistar rats.** [Cirrose hepática induzida por tioacetamida: estudo do modelo por injeção intraperitoneal a longo prazo em ratas Wistar]. 2008. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The low sensitivity of animals to drugs and the lack of changes in liver function are the main difficulties for the development of experimental liver cirrhosis. The aim of this study was improving the model of cirrhosis by intraperitoneal injection of thioacetamide (TAA) to reduce the animal adaptation to the drug. We used 5 groups of female Wistar rats: A (200 mg TAA/kg), B (increase of 20% to 48 days), C (increase of 10% every 24 days), D (increase of 15% every 24 days), E (saline). The animals were injected 3 times a week for 14 weeks. Blood samples were collected by cardiac puncture at the start and at the end of the experiment as well as before each dose increment, for analysis of markers of liver function. The behavioral assessment was done by the method of elevated plus-maze. Samples of liver were collected and processed to light microscopy. The animals treated with TAA showed piloerection, jaundice and chromodacryorrhea. Behavioral test showed stress and/or anxiety in these animals. The liver cirrhosis showed regenerative nodules and hemorrhagic lesions on the surface. Weight gain was similar among the groups treated, however, all of them were smaller than those of group E. The damage of the liver function was more pronounced in groups where the dose was increased over the experimental period, however, the mortality of group D was higher (44%). Treatment with TAA led to the development of cirrhosis with formation of regenerative nodules surrounded by fibrous septa and hepatic architecture disruption. The deposition of collagen was higher in groups B and C, whereas group D was similar to group A. Histopathologic evaluation showed intense proliferation of oval cells and bile duct hyperplasia, with production of acid mucin. It was observed the presence of hemosiderin, hepatocyte ballooning, nuclear lesions and inflammatory cells. The administration of TAA led to the development of neoplastic lesions, suggesting possible carcinogenic effect of this substance. The results showed that the treatment of groups B and C were most effective in the development of experimental cirrhosis. Despite that animals of group D received an increment in their TAA dose, their results seems similar to those of group A but with high mortality, probably because the treatment selected resistant animals to the drug. Therefore, it is recommended the model of induction of group B due to the lower mortality (5%), less influence on the emotional aspect and development of cirrhosis as severe as that the rats of group C.

Key words: Cirrhosis. Thioacetamide. Liver. Hepatic function. Rat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Labirinto em Cruz Elevado – equipamento para avaliação comportamental	060
Figura 2 -	Taxa de mortalidade registrada durante o experimento. Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina	068
Figura 3 -	Número de entradas nos braços fechados do Labirinto em Cruz Elevado durante indução de cirrose. (B): ANOVA seguida por teste de Tukey-Kramer; (C) e (D): ANOVA seguida por teste de Holm-Sidak. * P<0,05. Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina	069
Figura 4 -	Tempo de permanência (s) nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado durante indução de cirrose. ANOVA seguida por teste de Holm-Sidak. * P<0,05. Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina	070
Figura 5 -	Fígados cirróticos de ratas após 14 semanas de tratamento com TAA. (a, b) grupo C (aumento de 10% a cada 24 dias) mostrando nódulos regenerativos na superfície do órgão; (c) grupo D (aumento de 15% a cada 24 dias), fígado sem nodulação evidente, porém com pontos esbranquiçados em sua superfície; (d) grupo B (aumento de 20% aos 48 dias) mostrando lesão hemorrágica, a qual foi observada em todos os grupos cirróticos. Barra: 1,5 cm (a, b, c), 1,0 cm (d).....	071
Figura 6 -	Índice de ganho de peso dos grupos durante o período experimental. Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina	072
Figura 7 -	Box Plot dos valores de GGT do grupo A (14 semanas 200 mg/kg). ..	076
Figura 8 -	Box Plot dos valores de GGT do grupo B (aumento de 20% aos 48 dias).....	077

Figura 9 -	Box Plot dos valores de GGT do grupo C (aumento de 10% a cada 24 dias).....	079
Figura 10 -	Fotomicrografias do tecido hepático de animais do Grupo E (14 semanas solução salina): a) fileiras de hepatócitos separadas por sinusóides (seta), confluindo para veias centrolobulares (asterisco). Coloração HE. Barra: 100 µm; b) espaço porta composto pela tríade portal: ramo da veia porta (asterisco), ramo da artéria hepática (cabeça de seta) e ducto biliar (seta). Coloração PAS/Hematoxilina. Barra: 200 µm.....	087
Figura 11 -	Fotomicrografias do tecido hepático de animais tratados com TAA: a) observar o parênquima tecidual dividido por septos (seta) e a ausência de sinusóides; b) nódulos regenerativos (asterisco) circundados por septos fibrosos (seta). Coloração HE. Barra: 200 µm.....	088
Figura 12 -	Fotomicrografias do tecido hepático de animais do Grupo A (14 semanas 200 mg/kg): a) septos fibrosos delgados (seta) circundando nódulo regenerativo incompleto (asterisco); b) arquitetura hepática parcialmente preservada com integridade de espaços porta (seta). Coloração Picrossírius. Barra: 200 µm	088
Figura 13 -	Fotomicrografias do tecido hepático de animais do Grupo B (aumento de 20% aos 48 dias): a) septos fibrosos (seta) emitindo prolongamentos (cabeça de seta); b) nódulos regenerativos incompletos (asterisco); c) septos fibrosos espessos (seta) delimitando nódulos regenerativos completos; d) abundante deposição de colágeno no espaço porta (seta). Coloração Picrossírius. Barra: 200 µm	089
Figura 14 -	Fotomicrografias do tecido hepático de animais do Grupo C (aumento de 10% a cada 24 dias): a) septos fibrosos largos (seta) delimitando nódulo completo (asterisco); b) prolongamentos dos septos fibrosos (seta); c) septos fibrosos formando pontes (seta); d) espaços porta ampliados (asterisco) unidos por pontes de colágeno (seta). Coloração Picrossírius. Barra: 200 µm.....	090
Figura 15 -	Fotomicrografias do tecido hepático de animais do Grupo D (aumento de 15% a cada 24 dias): a) septos fibrosos (seta) unindo espaços porta (cabeça de seta) sem delimitar nódulos; b) nódulos regenerativos grandes (asterisco); c) septos espessos formando pontes (seta); d) parênquima hepático pouco desarranjado com espaços porta (seta) íntegros. Coloração Picrossírius. Barra: 200 µm.....	091
Figura 16 -	Porcentagem da área de colágeno no fígado em cada grupo. Objetiva de 20x; campo medido = 603126 µm ² . *P<0,05. Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina	093

Figura 17 -	Porcentagem da área de colágeno no fígado em cada grupo. Objetiva de 60x; campo medido = 67014,2 μm^2 . *P<0,05. Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina	094
Figura 18 -	Fotomicrografias do tecido hepático: a) animal tratado com TAA; b) animal controle. Notar as fibras colágenas do parênquima hepático. Coloração Picrossírius. Barra: 50 μm	095
Figura 19 -	Fotomicrografias do tecido hepático de animais tratados com TAA: a) septos formados por fibras colágenas que caracterizam a fibrose (seta). Barra: 100 μm ; b) presença de células ovais (cabeça de seta); c) inclusão nuclear (seta). Coloração HE. Barra: 30 μm (b e c)	096
Figura 20 -	Fotomicrografias do tecido hepático de animais tratados com TAA: a) figuras de mitose (seta); b) célula binucleada (seta), observar a degeneração de um dos núcleos; c) hepatócitos encarcerados por células ovais (asterisco). Coloração HE. Barra: 50 μm (a e b), 30 μm (c).....	098
Figura 21 -	Média dos escores para os parâmetros histopatológicos avaliados. *estatisticamente diferente do grupo A; # estatisticamente diferente do grupo D. Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias	099
Figura 22 -	Porcentagem do número de animais que apresentaram proliferação de ductos biliares em cada grupo. Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina	099
Figura 23 -	Fotomicrografias do tecido hepático de animal tratado com TAA: presença de hemossiderina (seta) principalmente ao redor dos espaços porta. Coloração Azul da Prússia. Barra: 300 μm (a); 200 μm (b)	100
Figura 24 -	Fotomicrografias do tecido hepático de animais tratados com TAA: a) células inflamatórias: neutrófilo (seta), plasmócitos (cabeça de seta amarela) e linfócitos (cabeça de seta verde); b) hepatócito com lesão nuclear (seta); c) megalócitos (seta), células inflamatórias: basófilo (seta azul), linfócito (seta verde), neutrófilo (seta amarela); d) hepatócitos balonizados (asterisco); e) corpo apoptótico (seta); f) fotomicrografia e em fluorescência, corpo apoptótico fluoresce devido à eosina (seta). Coloração HE. Barra: 30 μm (a e b), 50 μm (c e d), 200 μm (e e f)	101

Figura 25 -	Fotomicrografias do tecido hepático com marcação para glicogênio: a) fígado de animal do Grupo E (14 semanas solução salina), observar menor positividade nas regiões próximas aos espaços porta (cabeça de seta) do que nas regiões próximas às veias centrolobulares (seta); b) fígado de animal cirrótico com parênquima homogeneamente positivo. Coloração PAS/Hematoxilina. Barra: 300 µm.....	102
Figura 26 -	Fotomicrografias do tecido hepático de animais tratados com TAA com região de extensa proliferação de ductos biliares (a) e presença de substância fortemente positiva ao PAS preenchendo o lúmen dos mesmos (seta) (b). Coloração: HE (a); PAS/Hematoxilina (b). Barra: 300 µm.....	103
Figura 27 -	Fotomicrografias do tecido hepático com proliferação de ductos biliares antes e após digestão do glicogênio: a) substância verificada pela positividade ao PAS; b) mucopolissacarídeo identificado pela resistência à amilase salivar. Coloração Diastase/PAS/Hematoxilina. Barra: 100 µm.....	103
Figura 28 -	Fotomicrografia do tecido hepático com proliferação de ductos biliares e mucopolissacarídeo ácido (seta) produzido pelas células epiteliais desses ductos. Coloração Azul de Alcian/HE. Barra: 100 µm.....	104
Figura 29 -	Fotomicrografias do tecido hepático de animal tratado com TAA: a) regiões positivas para marcação imuno-histoquímica anti-GST-P identificando lesões pré-neoplásicas (setas); b) região de transição entre a lesão e o tecido adjacente. Coloração HE. Barra: 600 µm (a); 200 µm (b)	105
Figura 30 -	Fotomicrografias do tecido hepático de animais tratados com TAA apresentando lesões pré-neoplásicas ao centro: a) observar células maiores com citoplasma rarefeito e vários núcleos acidófilos e disformes (seta). Coloração HE. Barra: 200 µm; b) células pré-neoplásicas com maior quantidade de glicogênio. Coloração PAS/Hematoxilina. Barra: 300 µm.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Comparação da média e desvio padrão do índice de ganho de peso (IGP= P_{ss} / P_i) entre os grupos em cada semana, contada a partir da semana 0 – início do experimento. São Paulo, 2008.....	073
Tabela 2 -	Média e desvio padrão de índices relativos à massa e volume em todos os grupos. São Paulo, 2008.....	074
Tabela 3 -	Média e desvio padrão dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática no grupo A (14 semanas 200 mg TAA/kg). São Paulo, 2008.....	075
Tabela 4 -	Média e desvio padrão dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática no grupo B (aumento de 20% aos 48 dias). São Paulo, 2008	077
Tabela 5 -	Média e desvio padrão dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática no grupo C (aumento de 10% a cada 24 dias). São Paulo, 2008....	078
Tabela 6 -	Média e desvio padrão dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática no grupo D (aumento de 15% a cada 24 dias). São Paulo, 2008 ...	080
Tabela 7 -	Média e desvio padrão dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática no grupo E (14 semanas solução salina). São Paulo, 2008.....	081
Tabela 8 -	Comparações dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática entre todos os grupos no início do experimento. São Paulo, 2008	082
Tabela 9 -	Comparações dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática entre os grupos C e D após 24 dias de tratamento com TAA. São Paulo, 2008	083
Tabela 10 -	Comparações dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática entre os grupos B, C e D após 48 dias de tratamento com TAA. São Paulo, 2008	084
Tabela 11 -	Comparações dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática entre os grupos C e D após 72 dias de tratamento com TAA. São Paulo, 2008	085
Tabela 12 -	Comparações dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática entre todos os grupos após 14 semanas de tratamento. São Paulo, 2008	086
Tabela 13 -	Área ocupada pelo colágeno interlobular no fígado, mensurada em 250 campos de cada grupo tratado e 300 campos no grupo controle (valor de cada campo: $603126 \mu m^2$). São Paulo, 2008	092
Tabela 14 -	Área ocupada pelo colágeno intralobular no fígado, mensurada em 500 campos de cada grupo tratado e 600 campos do grupo controle (valor do campo medido: $67014,2 \mu m^2$). São Paulo, 2008.....	093
Tabela 15 -	Comparação da média e desvio padrão dos escores dos parâmetros histopatológicos dos grupos tratados com TAA. São Paulo, 2008	097

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Fórmulas estruturais de compostos do grupo Nitrosamina	048
Quadro 2 -	Esquema ilustrativo da metabolização da tioacetamida	051
Quadro 3 -	Protocolo de indução do grupo C	058
Quadro 4 -	Protocolo de indução do grupo D	058

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	023
2	OBJETIVOS	028
2.1	OBJETIVO GERAL	029
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	029
3	REVISÃO DE LITERATURA	030
3.1	FÍGADO	031
3.1.1	<i>Anatomia</i>	031
3.1.2	<i>Funções</i>	032
3.1.3	<i>Estrutura</i>	032
3.1.4	<i>Circulação Hepática</i>	033
3.1.5	<i>Histologia</i>	034
3.2	REGENERAÇÃO HEPÁTICA	036
3.3	PROCESSOS PATOLÓGICOS	038
3.3.1	<i>Fibrose</i>	039
3.3.2	<i>Cirrose</i>	041
3.3.3	<i>Hepatocarcinoma</i>	043
3.4	ANÁLISE BIOQUÍMICA DA FUNÇÃO HEPÁTICA	045
3.5	MODELOS EXPERIMENTAIS DE CIRROSE HEPÁTICA	048
3.5.1	<i>Dimetilnitrosamina</i>	048
3.5.2	<i>Tetracloreto de carbono</i>	049
3.5.3	<i>Tioacetamida</i>	050
3.6	AValiaÇÃO DA EMOCIONALIDADE.....	053
4	MATERIAL E MÉTODOS	056
4.1	ANIMAIS	057
4.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	057
4.2.1	<i>Colheita e Processamento de Amostras Sanguíneas</i>	059
4.2.2	<i>Avaliação Comportamental</i>	059
4.2.3	<i>Eutanásia</i>	061
4.2.4	<i>Processamento do Fígado</i>	061
4.3	ÍNDICES RELATIVOS.....	061
4.4	ANÁLISE BIOQUÍMICA	062
4.5	MICROSCOPIA DE LUZ E DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA.....	062
4.5.1	<i>Colorações</i>	063
4.5.2	<i>Quantificação de Colágeno</i>	063
4.5.3	<i>Avaliação Histopatológica</i>	064
4.5.4	<i>Imuno-histoquímica para Glutathione S-Transferase Forma Placental (GST-P)</i> ..	065
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	066

5	RESULTADOS	067
5.1	OBSERVAÇÕES PRELIMINARES.....	068
5.2	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	069
5.3	MACROSCOPIA.....	071
5.4	GANHO DE PESO	072
5.5	ÍNDICES RELATIVOS.....	074
5.6	FUNÇÃO HEPÁTICA – COMPARAÇÕES INTRAGRUPOS	075
5.6.1	<i>Grupo A</i>	075
5.6.2	<i>Grupo B</i>	076
5.6.3	<i>Grupo C</i>	078
5.6.4	<i>Grupo D</i>	079
5.6.5	<i>Grupo E</i>	080
5.7	FUNÇÃO HEPÁTICA – COMPARAÇÕES INTERGRUPOS.....	081
5.7.1	<i>Todos os Grupos: início</i>	082
5.7.2	<i>Grupos C e D: 24 dias</i>	083
5.7.3	<i>Grupos B, C e D: 48 dias</i>	084
5.7.4	<i>Grupos C e D: 72 dias</i>	085
5.7.5	<i>Todos os Grupos: última semana do experimento</i>	086
5.8	MORFOLOGIA	087
5.9	QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO	092
5.10	HISTOPATOLOGIA	095
5.11	HISTOQUÍMICA	102
5.12	IMUNO-HISTOQUÍMICA	104
6	DISCUSSÃO.....	106
7	CONCLUSÕES	122
	REFERÊNCIAS.....	124
	ANEXO	139

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As doenças hepáticas constituem um dos maiores problemas de saúde de ordem mundial. Na África e na Ásia, as principais causas são as infecções virais e parasitárias, destacando-se a hepatite B (HVB), um dos principais patógenos humanos que infecta cerca de 400 milhões de pessoas no mundo. Na Europa e na América, o consumo de álcool e a hepatite C (HVC) são as maiores causas das doenças hepáticas, juntamente com a esteatohepatite não-alcoólica (MURIEL; ESCOBAR, 2003; HENDERSON; IREDALE, 2007; SCHUPPAN; AFDHAL, 2008; ZHANG et al., 2008).

Um quinto de todos os cânceres são causados por uma infecção crônica. O câncer de fígado é um dos 5 tipos mais comuns de tumores, principalmente em homens, no mundo inteiro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). A mortalidade por hepatocarcinoma associado à cirrose está se elevando, enquanto que a mortalidade por cirrose não associada ao hepatocarcinoma vem diminuindo. A incidência desse tipo de câncer em pacientes cirróticos é de 2-7% (SCHUPPAN; AFDHAL, 2008).

Nos Estados Unidos e na Europa, a cirrose hepática é a causa não-neoplásica mais comum de morte entre as doenças hepatobiliares e digestivas (PINZANI; ROMBOUTS, 2004). Porém, a prevalência da cirrose na população mundial não é conhecida com exatidão. Estima-se que, apenas nos Estados Unidos, a cirrose atinja 400 mil pessoas (0,15% da população). Contudo, este número pode ser muito maior já que em muitos casos a doença permanece não diagnosticada por extensos períodos, podendo atingir até 1% da população americana. Números similares são verificados na Europa e números muito maiores são observados em muitos países da Ásia e África, onde a infecção pelos vírus da hepatite B e C é comum (SCHUPPAN; AFDHAL, 2008).

No Brasil, a taxa de mortalidade por cirrose hepática é de 13,2 por 100 mil habitantes, no sexo masculino, e 2,9 no sexo feminino (DATASUS - IDB 2001). O consumo abusivo do álcool ainda é considerado a principal causa, mas nota-se um aumento na incidência das hepatites de caráter crônico, contribuindo para os altos índices de mortalidade da cirrose. Em 2005 foram registrados 63.477 novos casos de hepatites virais sendo que a incidência da HVC foi de 13.261 e da HVB 14.681 casos. Em 1997, o número de casos registrados de HVC foi de 3.135 e de HVB 6.098 (DATASUS). O aumento da incidência de HVC e HVB, provavelmente, está relacionado a aspectos de comportamento e relacionamento sociais da população (CHÁVEZ; CAMPANA; HAAS, 2003).

Em virtude do grave problema de saúde mundial que a cirrose representa, face aos vários agentes etiológicos e fatores de risco que contribuem para os altos números explicitados aqui, muitas pesquisas envolvendo essa doença são realizadas pelo mundo todo. Esses trabalhos são efetuados com a finalidade de testar substâncias e desenvolver métodos que possam se converter em tratamentos para essa doença em busca da cura, ou pelo menos o aumento da sobrevida do paciente sem agravamentos.

Considerações éticas limitam procedimentos em seres humanos, reforçando a necessidade de modelos animais que reproduzam o quadro patológico da cirrose (LALEMAN et al., 2006). Neste sentido, os modelos experimentais de cirrose hepática são indispensáveis para a pesquisa de mecanismos fundamentais e tratamentos associados a esta doença (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002) e a eficiência desses modelos animais é crucial para o estudo da cirrose hepática (JEONG et al., 2001).

O modelo de cirrose hepática experimental pela administração de tioacetamida (TAA) é amplamente utilizado para o estudo do desenvolvimento do processo patológico e para a pesquisa de alternativas para o seu tratamento. Nesse modelo, a fibrose hepática e os nódulos regenerativos são mais proeminentes e o padrão histológico é mais próximo ao da cirrose humana. Além disso, a cirrose induzida por TAA leva a uma mortalidade menor em relação a outras substâncias, por exemplo, o tetracloreto de carbono (JEONG et al., 2001; LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002).

As formas de administração mais empregadas são a oral (na água do bebedouro) e a injeção intraperitoneal. A administração oral de TAA consiste em um método não invasivo e fácil na indução da cirrose em grande número de animais (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002). No entanto, à medida que a cirrose se instala e compromete o fígado do animal, ele apresenta redução na ingestão de água e alimento, diminuindo a eficiência do tóxico (MOREIRA et al., 1995; FONTANA et al., 1996; GEORGE et al., 2001). Tal fato pode justificar a baixa mortalidade registrada por Li, Benjamin e Alexander (2002) uma vez que a ingestão do tóxico também diminui. Ademais, podem ocorrer falhas e variações no processo de indução. Como não é possível controlar a dosagem de fármaco administrada por animal, cada um receberá a quantidade de droga correspondente à água que ingere, havendo grande variação individual nas lesões resultantes. Assim, a indução de cirrose com TAA, por via oral, geralmente apresenta resultados heterogêneos durante o desenvolvimento do quadro patológico, limitando a aplicação desse modelo.

Um aspecto importante quanto a utilização da TAA na indução de cirrose, é que há um certo grau de variação na sensibilidade hepática entre os animais. Após um determinado

período de administração da substância, o animal adquire resistência à droga (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002). Estes autores observaram que alguns animais ganhavam peso durante o tratamento, contrariando os resultados esperados e indicando que a sensibilidade hepática à TAA se reduz com o tempo. Desse modo, sugerem que as doses sejam ajustadas para cada animal de acordo com suas variações de peso, aumentando o rendimento da indução do quadro cirrótico em maior número de animais e reduzindo expressivamente a mortalidade dos mesmos. Nesse trabalho, apesar da cirrose instalar-se com sucesso, apresentando as características morfológicas típicas da doença, os testes de função hepática não apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle.

A adoção da injeção intraperitoneal de TAA uniformiza a quantidade de toxina que o animal recebe, diminuindo a variabilidade observada na administração oral. Contudo, os problemas de indução de cirrose encontrados pelos referidos autores, baixa sensibilidade a TAA e função hepática inalterada, foram observados em experimento anterior desenvolvido por este laboratório (GUERRA, 2006). Neste estudo, no qual a injeção intraperitoneal foi adotada como meio de administração, embora a resposta tenha sido uniforme, registrou-se recuperação de peso dos animais após a metade do período experimental, indicando adaptação à droga. Li, Benjamin e Alexander (2002) resolveram este problema aumentando a dose de TAA oferecida na água *ad libitum* com resultado satisfatório. No entanto, não há trabalhos sobre a quantidade de TAA que deve ser administrada intraperitonealmente e seus efeitos sobre as lesões hepáticas, sorologia e a mortalidade dos animais. Por isso é importante aprimorar o modelo estudando formas de evitar a adaptação dos animais à TAA.

Assim, com vistas a buscar soluções para os problemas de adaptação, são propostas alterações do modelo de indução de cirrose hepática utilizado até então. O presente estudo verifica se modificações nas doses de TAA, ao longo do experimento, evitam a recuperação de peso dos animais devido à adaptação à droga e se o processo patológico desenvolvido corresponde a um quadro cirrótico experimentalmente aceitável em seus principais parâmetros morfológicos e bioquímicos.

A administração parenteral tem a vantagem de assegurar que toda a dose é absorvida (SHEA; MANSEAU, 1968) sendo mais eficaz no processo de indução da cirrose. A injeção intraperitoneal permite controle mais rigoroso quanto à dosagem de tóxico administrada por animal e isto proporciona maior segurança na análise dos efeitos da droga, já que todos os animais estarão submetidos às mesmas condições.

A principal hipótese de trabalho é que é possível obter um quadro cirrótico mais intenso, com alteração significativa dos marcadores sanguíneos de lesão hepática, por meio de

doses intraperitoneais crescentes de TAA, o que permitirá melhor avaliar o efeito de tratamentos anticirróticos no quadro histopatológico e bioquímico plasmático.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter um quadro cirrótico experimental adequado para os estudos dessa doença pela adaptação do modelo de injeção intraperitoneal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Verificar se doses crescentes de TAA evitam a adaptação dos animais à droga ao longo do período experimental, caracterizada pelo ganho de peso;
- ✓ Avaliar o comportamento dos animais frente às diferentes dosagens de TAA em diferentes estágios da indução da cirrose;
- ✓ Verificar se o aumento progressivo nas doses de TAA provoca os danos de função hepática com as alterações da bioquímica sanguínea observadas na cirrose não-experimental;
- ✓ Verificar os efeitos do aumento progressivo das doses de TAA no desenvolvimento do quadro histopatológico da cirrose.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo serão fornecidas as informações necessárias sobre o assunto abordado neste trabalho, dando embasamento para a compreensão dos resultados que serão apresentados e da discussão dos mesmos.

3.1 FÍGADO

Aqui serão apresentados os elementos básicos da organização hepática.

3.1.1 *Anatomia*

O fígado é o segundo maior órgão do corpo, superado apenas pela pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Anatomicamente, está localizado na porção superior direita da cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma; apresenta dois lobos principais, direito e esquerdo, separados pelo ligamento falciforme, o qual prende-o à parede abdominal ventral e à superfície caudal do diafragma (HERLIHY; MAEBIUS, 2002). São distinguidos outros dois lobos acessórios, quadrado e caudado (ARIAS et al., 1994), mas há variação quanto ao número de lobos entre as espécies animais.

Apesar do fígado dos ratos apresentar uma aparência mais lobulada do que o da espécie humana, há uma correspondência entre os seus lobos e os setores hepáticos do fígado humano. Ambas as espécies pertencem à Classe Mammalia e, portanto, apresentam desenvolvimento embriológico semelhante. O fígado do rato possui um lobo direito, um lobo esquerdo, um lobo médio dividido em porções esquerda e direita e um lobo caudado, também denominado lobo de Spiegel (KOGURE et al., 1999).

3.1.2 Funções

A posição ocupada pelo fígado na cavidade abdominal é favorável à captura, transformação, acúmulo e neutralização de substâncias (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Esse órgão desempenha importantes funções para o organismo, tais como: síntese de várias substâncias (açúcares, proteínas); secreção de sais e ácidos biliares; armazenamento (lipídios, vitaminas, glicogênio); biotransformação (substâncias tóxicas, drogas, hormônios) e metabolismo (lipídios, proteínas, carboidratos) (BANKS, 1992). As funções do fígado ainda incluem filtração e armazenamento de sangue, assim como do ferro, e formação dos fatores de coagulação (GUYTON; HALL, 2002).

No processo de biotransformação, muitos compostos sofrem a ação do fígado que altera a sua toxicidade, reduz a sua atividade e os elimina. As propriedades detoxificantes do fígado datam de eras pré-históricas, decorrendo do duelo planta x animal, em que as plantas sintetizam substâncias de autodefesa e os animais se vêem obrigados a desenvolver enzimas metabolizantes para que possam se alimentar delas (RAMAIAH; APTE; MEHENDALE, 2001). A função essencial da biotransformação é aumentar a hidrossolubilidade e a polaridade, tornando o composto menos lipossolúvel e, portanto, incapaz de penetrar a membrana celular. Todavia, algumas das atividades hepáticas tornam as drogas mais tóxicas para o organismo. A exposição crônica a substâncias tóxicas geralmente resulta na alteração da função orgânica, na diminuição do tamanho do órgão e no aumento do tecido conjuntivo fibroso intra-hepático (BANKS, 1992).

3.1.3 Estrutura

A unidade estrutural básica do fígado é o lóbulo hepático. Em suínos essa estrutura é bem delimitada sendo separada por tecido conjuntivo. Já em humanos, assim como em ratos, os lóbulos estão em contato uns com os outros tornando difícil o estabelecimento de limites entre eles. Os lóbulos hepáticos apresentam um formato geralmente hexagonal e nos vértices de cada lóbulo são encontrados os espaços porta. Estas regiões possuem um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática, um ducto biliar e vasos linfáticos, todos envolvidos por uma bainha de tecido conjuntivo. Os hepatócitos estão dispostos em placas celulares que se

anastomosam livremente e são orientadas radialmente, da periferia para o centro do lóbulo. Essas placas são separadas por capilares, denominados sinusóides, os quais são revestidos por uma camada descontínua de células endoteliais compondo um endotélio intensamente fenestrado. As células endoteliais estão separadas dos hepatócitos por uma lâmina basal descontínua e por um espaço subendotelial, o espaço de Disse. Nesse espaço estão as microvilosidades dos hepatócitos, aumentando a superfície de contato celular. As fenestrações do endotélio hepático permitem que fluidos percolem rapidamente dos sinusóides para o espaço de Disse. É estabelecido um amplo contato entre o sangue e a membrana dos hepatócitos facilitando a troca de macromoléculas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A superfície de cada hepatócito está em contato com o sinusóide, através do espaço de Disse, e com a superfície de outros hepatócitos. A membrana plasmática de hepatócitos adjacentes delimita o canalículo biliar, o qual possui um pequeno número de microvilos do hepatócito em seu interior, para a secreção da bile, e constitui a primeira porção do sistema de ductos biliares. Os canalículos biliares se anastomosam ao longo das placas de hepatócitos em direção ao espaço porta e, assim, a bile flui na direção contrária do sangue. No espaço porta estão os ductos biliares, formados por epitélio cubóide, que se fundem gradualmente até formarem o ducto hepático. Este, por sua vez, conduz a bile até a vesícula biliar (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

3.1.4 *Circulação Hepática*

O fígado é um órgão atípico por receber sangue de duas vias diferentes. 75% do sangue que entra no fígado provém da veia porta, que traz os nutrientes da absorção intestinal, e 25% do suprimento sanguíneo hepático provém da artéria hepática, cuja principal função é fornecer aos hepatócitos quantidade adequada de oxigênio para que exerçam suas funções (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; LE COUTEUR et al., 2008).

A veia porta entra no fígado e se divide repetidamente enviando ramos aos espaços porta, os quais se ramificam em vênulas distribuidoras. Estas vênulas correm ao redor dos lóbulos e emitem pequenos ramos que desembocam nos sinusóides. Os sinusóides, por sua vez, convergem para o centro do lóbulo onde formam a veia centrolobular. À medida que a veia centrolobular progride ao longo do lóbulo, ela continua a receber vários sinusóides e seu diâmetro é aumentado gradualmente. Ao deixar o lóbulo ela funde-se com a veia sublobular,

de diâmetro maior. As veias sublobulares convergem e se fundem formando as veias hepáticas que desembocam na veia cava caudal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A artéria hepática ramifica-se do mesmo modo que a veia porta desembocando também nos sinusóides. Assim, há uma mistura de sangue arterial e venoso nesses capilares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Todo o aporte sanguíneo do fígado chega pelo espaço porta e flui para o centro do lóbulo. Conseqüentemente, todas as substâncias presentes nesse sangue, sejam elas tóxicas ou não, atingem primeiro as células periportais fazendo com que haja um “comportamento” diferente entre essas células e aquelas mais centrais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Esse comportamento determina o conceito do ácino hepático, uma unidade funcional do fígado baseada na dinâmica da circulação hepática. O ácino hepático possui os vasos aferentes, ou seja, o espaço porta, no centro e a veia centrolobular na extremidade. Dessa forma, é possível dividir o parênquima acinar em 3 regiões: zona 1, circundando os vasos aferentes (região periportal); zona 2 (região intermediária); zona 3, ao redor da veia centrolobular (região pericentral). A morfologia, o tamanho, a ploidia e as funções celulares variam entre as regiões do ácino (ARIAS et al., 1994).

3.1.5 Histologia

O lóbulo hepático é composto por um tipo de células parenquimais, os hepatócitos, e vários tipos de células não-parenquimais: células endoteliais, células de Kupffer, células estreladas, *pit cells* e células dendríticas (NAKATANI, 2004).

Os **hepatócitos** são células poliédricas com 20-30 µm de diâmetro, possuem um ou dois núcleos com um ou dois nucléolos. Retículo endoplasmático tanto liso quanto rugoso é abundante nos hepatócitos. O retículo endoplasmático rugoso forma agregados dispersos pelo citoplasma (denominados corpos basofílicos), onde são sintetizadas diversas proteínas. O retículo endoplasmático liso é difuso e nele acontecem processos importantes, tais como oxidação, metilação e conjugação de compostos; esses processos são fundamentais para a inativação ou detoxificação de substâncias. Mitocôndrias e complexos de Golgi também são numerosos nos hepatócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os hepatócitos sintetizam muitas substâncias de exportação como albumina, fibrinogênio, α e β globulinas, lipoproteínas e colesterol (BANKS, 1992). Também

armazenam glicogênio, um depósito de glicose acionado quando a glicemia sanguínea fica abaixo do nível adequado, que frequentemente aparece associado ao retículo endoplasmático liso. Assim, o hepatócito constitui-se na célula que, talvez, seja a mais versátil do organismo. Ele desempenha funções endócrinas e exócrinas, acumula, detoxifica e transporta diversas substâncias, além de sintetizar proteínas para si próprio e para exportação. De acordo com a distância a que se encontram dos espaços porta, os hepatócitos apresentam características estruturais, histoquímicas e bioquímicas distintas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As **células endoteliais** são células especializadas que revestem os sinusóides hepáticos. Elas são muito delgadas e possuem fenestrações agrupadas em placas. Cerca de 5-10% da superfície da célula endotelial é perfurada por essas fenestras e estudos sugerem que elas são mais amplas nos sinusóides periportais e mais numerosas nos sinusóides pericentrais. As fenestrações permitem a passagem de uma ampla gama de substratos para dentro do espaço de Disse. A espessura das células endoteliais hepáticas e a ausência de lâmina basal e colágeno no espaço perissinusoidal, asseguram que barreiras de permeabilidade à difusão de substâncias entre o sangue e os hepatócitos sejam minimizadas. Contudo, as fenestrações das células endoteliais não permitem a passagem livre de moléculas grandes (maiores do que 15 nm) e funcionam como uma barreira entre macromoléculas ou leucócitos presentes no lúmen sinusoidal e os hepatócitos (KNOLLE; GERKEN, 2000). A endocitose também é uma característica notável dessas células juntamente com a função imunológica que elas desempenham ao expressarem antígenos importantes para interação com leucócitos (LE COUTER et al., 2005; 2008).

O fígado também possui macrófagos residentes, responsáveis pela eliminação de eritrócitos velhos e da hemoglobina, fagocitose de bactérias e secreção de citocinas. Esses macrófagos são chamados **células de Kupffer** e constituem cerca de 15% da população celular do fígado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). As células de Kupffer se localizam no lúmen sinusoidal e compõem a maior população de macrófagos residentes do corpo. Junto com as células endoteliais, elas formam o sistema reticuloendotelial (LE COUTER et al., 2008), constituindo 80-90% dos macrófagos desse sistema (KOLIOS; VALATAS; KOUROUMALIS, 2006). Essas células localizam-se principalmente na área periportal, uma posição estratégica para que possam fagocitar e eliminar antígenos ou patógenos que entrem no fígado pelo sangue venoso portal (KNOLLE; GERKEN, 2000).

As **células estreladas** hepáticas, também chamadas de células de Ito, células perissinusoidais ou lipócitos, situam-se dentro do espaço de Disse e envolvem as células endoteliais com suas extensões citoplasmáticas. Em algumas espécies, há terminações

nervosas tocando esses processos citoplasmáticos. Elas são escassas, representando menos de 10% das células hepáticas, e localizam-se a distâncias regulares umas das outras (cerca de 40 µm). As células estreladas são produtoras de proteínas da matriz extracelular, importantes para a manutenção do ambiente perissinusoidal e é sugerido que essas células possam agir no controle do tônus microvascular, em função do seu posicionamento em torno das células endoteliais. O armazenamento de vitamina A é a principal função das células estreladas, embora elas também exerçam papel no controle da regeneração do fígado normal, expressando fator de crescimento de hepatócito (HGF), entre outros (BURT, 1999; BEDOSSA; PARADIS, 2003).

Outro tipo celular encontrado no fígado são as *pit cells*, linfócitos T citotóxicos residentes que se localizam nos sinusóides e são identificados por inclusões citoplasmáticas denominadas *pits* (LE COUTER et al., 2008). Em holandês, esse termo é utilizado para designar grânulos citoplasmáticos por lembrar “caroços” em uma uva. As *pit cells* são células *natural killer* (NK) específicas do fígado com características morfológicas, funcionais e imunofenotípicas diferentes das células NK do sangue. A frequência dessas células no tecido hepático é de 1 *pit cell* para 10 células de Kupffer e, assim como estas, as *pit cells* são mais numerosas na região periportal do que na região pericentral do lóbulo hepático (LUO et al., 2000). As *pit cells* aderem às células endoteliais e às células de Kupffer e migram pela superfície dessas células estendendo seus pseudópodos bem desenvolvidos (NAKATANI et al., 2004).

O fígado é um órgão hematopoiético com capacidade regenerativa e que possui microambientes imunológicos exclusivos. Sob esse aspecto, o fígado possui um grupo residente de células apresentadoras de antígeno (APCs) profissionais, composto pelas células endoteliais, células de Kupffer, células estreladas e **células dendríticas**, que confere propriedades tolerogênicas ao órgão. Estas últimas localizam-se, estrategicamente, ao redor das tríades portais (WATANABE et al., 2008).

3.2 REGENERAÇÃO HEPÁTICA

O fígado possui um ritmo lento de renovação celular, mas apresenta uma grande capacidade de regeneração (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Ele responde a injúrias teciduais (agentes químicos, biológicos ou hepatectomia parcial) pela entrada de hepatócitos

quiescentes no ciclo celular (TORRES et al., 1999) e, assim, as células progridem sincronicamente para restaurar o volume e a função hepática (KATO, 2005). Esta propriedade do fígado, de regular seu próprio tamanho e crescimento, surge do seu papel central em funções metabólicas essenciais à vida (ARIAS et al., 1994).

Embora seja denominado regeneração, o processo que ocorre após a retirada de uma porção do fígado se dá por crescimento compensatório da porção remanescente por proliferação celular; ocorre um processo de hiperplasia das células quiescentes, visto que os lobos seccionados não são recuperados (FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006; MYRONOVYCH et al., 2008). A proporção do tamanho do fígado em relação à massa corporal é constante. Nos casos de ressecção hepática, a resposta regenerativa do órgão é proporcional à massa hepática removida. Em transplantes de fígado de um doador menor para um maior, ou o contrário, há reestruturação do órgão até atingir a proporção ideal (MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997). Isto também acontece na hiperfrotia ou hiperplasia induzidas por drogas. A retirada do estímulo leva à apoptose de hepatócitos até que a massa normal seja restaurada (FAUSTO, 2000).

Nos casos de hepatectomia parcial ou injúria leve, há recuperação completa do parênquima hepático, pois, diferentemente dos casos de injúria crônica com fibrose, a trama de reticulina do fígado permanece intacta. Quando essa rede é preservada, a proliferação de células parenquimais e não-parenquimais procede ordenadamente, mantendo a proporção ideal entre células e matriz extracelular. Como os hepatócitos replicam primeiro, os componentes da matriz precisam ser sintetizados para manter a arquitetura hepática normal e prover novas estruturas vasculares (ARIAS et al., 1994).

As células estreladas hepáticas contribuem para a angiogênese tanto no desenvolvimento do fígado como na regeneração. Após hepatectomia parcial, elas migram ao longo das células endoteliais para estabelecer conexões vasculares com os hepatócitos e criar novos sinusóides (FRIEDMAN, 2008a). A regeneração dos hepatócitos inicia-se nas áreas periportais dos lóbulos, o que faz sentido, principalmente nos casos de injúrias tóxicas, pois é a região de entrada do sangue que traz as toxinas. As outras células hepáticas iniciam a síntese de DNA cerca de 24 horas depois dos hepatócitos, o que sugere que hepatócitos proliferantes proporcionam estímulos mitogênicos a essas células através da produção de fatores de crescimento e da própria cinética da proliferação celular (MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1999).

Uma série de fatores, tais como fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento transformador α (TGF- α), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de

necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) estão envolvidos no processo regenerativo (MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1999). Entretanto, os mecanismos envolvidos no desencadeamento desse processo requerem a ativação de múltiplas vias, as quais não operam independentemente umas das outras. Os padrões de ativação dessas vias são extremamente complexos, pois podem envolver modos de operação simultâneos e/ou sequenciais, ocorrendo em diferentes células hepáticas e em determinadas fases da regeneração hepática (FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006). Esses autores propõem que o circuito essencial requerido para a regeneração é composto por três tipos de vias: citocinas, fatores de crescimento e processos metabólicos que relacionam a função hepática com crescimento e proliferação celular. Essas vias exibiriam componentes intracelulares semelhantes e a perda de um gene em uma delas não suprimiria a resposta regenerativa.

Um dado interessante acerca dos eventos regenerativos, de acordo com estudos recentes, é que a extensão e a regulação da regeneração hepática, após hepatectomia parcial, sofre influência do ritmo circadiano. Nesses estudos, o pico de replicação do DNA ocorreu 36 horas após a cirurgia, indiferentemente do horário em que o procedimento foi realizado, porém, a entrada em mitose das células cujo DNA foi replicado aconteceu sempre no mesmo período do dia (FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006).

Na prática cotidiana, exceto em casos de ressecção hepática para transplantes, a hepatectomia parcial não é o estímulo regenerativo para o fígado. A regeneração ocorre sempre que há um déficit funcional do fígado e os exemplos mais comuns são as necroses de células e tecidos, mas sem remoção de massa hepática. A necrose hepatocitária massiva observada na falha hepática aguda e a extensa morte celular causada por agentes tóxicos e biológicos fazem com que hepatócitos quiescentes tornem-se proliferativos e se repliquem, a fim de restaurar a capacidade funcional do fígado (FAUSTO, 2000). Portanto, as injúrias são condições básicas para o desencadeamento dos processos regenerativos.

3.3 PROCESSOS PATOLÓGICOS

As doenças que acometem o fígado revestem-se de suma importância para o estudo desse órgão vital. Neste capítulo serão abordados os processos patológicos que são de interesse no presente trabalho.

3.3.1 Fibrose

Quando o fígado sofre uma lesão leve e transitória, as células mortas são rapidamente substituídas pelo processo de regeneração, mas se a lesão é grave e prolongada, ocorre uma resposta cicatrizante da qual resulta a fibrose (ALBANIS; FRIEDMAN, 2006).

A fibrose é, portanto, a resposta cicatricial do fígado à maioria das doenças hepáticas inflamatórias crônicas, como as hepatites B e C, doenças autoimunes ou metabólicas, por exemplo, a hemocromatose. O resultado final é o acúmulo de matriz extracelular (MEC) e a substituição do colágeno tipo IV, de baixa densidade, pelo colágeno tipo I de alta densidade, dentro do espaço de Disse (ALBANIS; FRIEDMAN, 2006).

No fígado sadio, a MEC compreende menos do que 3% da área hepática, onde é restrita aos tratos portais, veias centrais e paredes dos sinusóides. A coesão mecânica e a resistência do fígado são as principais funções da MEC, mas ela também é importante em várias funções biológicas como proliferação, migração e diferenciação celular e expressão gênica (BEDOSSA; PARADIS, 2003). As moléculas constituintes da MEC são importantes nas interações entre as células e a matriz e das células entre si. A MEC retém grande quantidade de água compondo o líquido intersticial, de fundamental importância na integração de todo o organismo (ANDRADE, 2005).

A maior parte das proteínas da MEC é composta por colágeno. Os tipos I, III, IV e V são os mais abundantes. O colágeno tipo IV está associado com a laminina, formando a membrana basal descontínua ao longo dos sinusóides, uma estrutura de baixa densidade, característica essencial para permitir a difusão entre o sangue e as células hepáticas e manter a função diferenciada entre células vizinhas. Os outros tipos de colágeno estão confinados principalmente no espaço porta e na veia central (BEDOSSA; PARADIS, 2003).

A deposição de MEC no espaço de Disse implica no acúmulo de colágeno do tipo I e III e na constituição de uma estrutura de fibras colágenas que substitui o material constituinte da membrana basal. Esse processo, associado à perda das fenestrações das células endoteliais, é chamado “capilarização dos sinusóides” e resulta em prejuízo nas trocas entre o sangue e as células hepáticas. No fígado fibrótico, embora a fibrose seja o evento principal, ela acontece associada a mecanismos de distorção arquitetural, regeneração celular e redistribuição vascular, alterando gravemente a função hepática (BEDOSSA; PARADIS, 2003; BRUCK et al., 2007).

As células estreladas são consideradas os componentes principais da fibrose hepática (BATALLER; BRENNER, 2005), embora possa haver também a ativação de fibroblastos portais e perivasculares (SCHUPPAN et al., 2003) e o recrutamento de células derivadas da medula óssea, as quais representam uma fração substancial da população fibrogênica total (FRIEDMAN, 2008a).

Após injúria, as células estreladas tornam-se ativadas. O processo de ativação é caracterizado pela perda das gotículas lipídicas ricas em vitamina A, produção de MEC e expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) (LE COUTER et al., 2008). As células estreladas diferenciam-se em miofibroblastos capazes de proliferação e fibrogênese, tornam-se contráteis e, devido a sua localização, podem comprimir os sinusóides aumentando a resistência portal (ALBANIS; FRIEDMAN, 2006).

A ativação das células estreladas consiste em duas fases: iniciação e perpetuação. A primeira, também chamada de estágio pré-inflamatório, refere-se a alterações iniciais na expressão gênica e no fenótipo, que tornarão as células aptas a responder às citocinas e outros estímulos. A segunda fase resulta dos efeitos desses estímulos sobre a manutenção do fenótipo ativado e a produção da fibrose. A fase de perpetuação compreende proliferação, contratilidade, fibrogênese, perda de retinóides, infiltração de células inflamatórias e degradação de MEC. Neste último caso, ocorre uma substituição da MEC normal por um tecido cicatricial, com efeitos deletérios para a função celular (FRIEDMAN, no prelo¹). Essa ativação é fonte de mediadores, moléculas de matriz, proteases e seus inibidores que juntos levam à formação da cicatriz hepática. As células estreladas, bem como as células de Kupffer e as plaquetas, secretam TGF- β , o fator fibrogênico mais potente para as células estreladas (ALBANIS; FRIEDMAN, 2006).

No fígado normal, a produção de MEC se dá na mesma proporção da sua degradação. Todavia, na fibrose ocorre um desequilíbrio desse balanço. As metaloproteinases de matriz (MMPs) são as responsáveis pela quebra da MEC. A regulação dessas proteinases é complexa, mas essencialmente, elas são ativadas através da clivagem proteolítica e são inibidas pela ligação a inibidores específicos, denominados inibidores teciduais de metaloproteinase (TIMPs). A diminuição da atividade das MMPs por redução da sua expressão gênica ou pelo aumento da atividade dos TIMPs favorece o acúmulo de MEC. As células estreladas são as maiores fontes de TIMPs do tecido hepático (SCHUPPAN et al., 2003).

¹ FRIEDMAN, S. L. Hepatic Fibrosis – Overview. *Toxicology*, 10 p. 2008. *Article in Press*.

A fibrose é considerada um processo patológico progressivo, o qual envolve múltiplos eventos celulares e moleculares levando à deposição excessiva de MEC. Quando esse processo é combinado com regeneração e reparo ineficazes, ocorre uma distorção da arquitetura hepática normal resultando em cirrose (ZHENG, 2005).

3.3.2 Cirrose

A cirrose é um estágio avançado da fibrose hepática que traz todas as suas complicações acompanhadas ainda pela amplificação da distorção arquitetural e do padrão vascular do fígado.

Tradicionalmente, a cirrose é considerada um processo irreversível, mas há estudos sugerindo que a regressão e até mesmo a reversão da cirrose são possíveis (KUMAR; SARIN, 2007; SATO et al., 2008).

A cirrose hepática pode resultar de lesões crônicas diversas: infecções virais, ingestão de álcool, ataques imunológicos, acúmulo hereditário de metal, parasitoses ou danos tóxicos (SPIRA et al., 2002). O consumo abusivo de álcool já foi considerado a principal causa da cirrose, mas atualmente as infecções virais pelo vírus da hepatite B (ZHANG et al., 2008) e da hepatite C (GARCÍA et al., 2002) tornaram-se a etiologia mais comum dessa doença.

Na clínica veterinária, as injúrias hepáticas crônicas são comuns em cães e podem culminar em cirrose. As causas dessa doença abrangem inflamações do trato gastrintestinal, uso prolongado de corticóides, anticonvulsivos e imunoterapia para *Corynebacterium parvum* e também infecções virais (adenovírus canino tipo I). O armazenamento de cobre é uma doença hepática crônica observada com relativa frequência, especialmente em cães “Bedlington terrier”, associada a fatores genéticos (FUENTEALBA et al., 1997). Essa doença hepática é diferente da doença de Wilson descrita em humanos, na qual o defeito na produção de um carreador de cobre implica na sua deposição em vários órgãos, inclusive o fígado. Nessa raça de cão, outros órgãos não são afetados e a falha ocorre na excreção biliar do metal (WATSON, 2004).

Independentemente da espécie e do fator etiológico, o desenvolvimento da doença compreende uma injúria persistente seguida de regeneração, perda de função hepática desarranjo arquitetural e fibrose (DÍAZ-GIL et al., 1999). O conteúdo de MEC é até seis vezes maior do que no fígado normal, sendo o colágeno do tipo I a proteína predominante

(GARCÍA et al., 2002). A proporção total de colágeno pode passar de 2% para até 30% do total de proteínas do fígado (PINES et al., 1997; SPIRA et al., 2002).

A cirrose hepática é caracterizada pela formação de nódulos regenerativos de parênquima hepático, circundados por septos fibrosos, e está associada a graves alterações angio-arquiteturais (PINZANI; ROMBOUTS; COLAGRANDE, 2005). Histologicamente, a cirrose é determinada por fibrose intensa constituindo septos vascularizados que ligam os tratos portais uns com os outros e/ou com as veias centrolobulares. Há formação de nódulos de hepatócitos regenerativos circundados por esses septos, e desprovidos de veia central, conferindo aspecto rígido ao órgão (DAGLI; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, 2007; SCHUPPAN; AFDHAL, 2008). A hiperplasia de ductos biliares também é frequentemente observada (AL BADER et al., 2000; JEONG et al., 2001). Há um processo generalizado de regeneração do parênquima hepático acompanhado por alterações vasculares, como conexões artério-venosas, desvios porto-sistêmicos (circulação colateral) e capilarização sinusoidal (KUMAR; SARIN, 2007).

A cirrose, geralmente, é assintomática e o seu desenvolvimento não é sentido ou suspeitado até que suas complicações se apresentem. As principais conseqüências clínicas dessa doença são o prejuízo da função celular, a hipertensão portal e o desenvolvimento de hepatocarcinoma. Outras complicações como varizes esofágicas, ascite, peritonite bacteriana e encefalopatia são comuns da cirrose (SCHUPPAN; AFDHAL, 2008), a qual pode levar também ao desenvolvimento de cardiomiopatia cirrótica (LEE; GLENN; LEE, 2007; MILANI et al., 2007) e síndrome hepatopulmonar (GAINES; FALLON, 2004; PALMA; FALLON, 2006; FREIRE et al., 2007).

Nos casos de cirrose assintomática, o diagnóstico pode ocorrer somente na necropsia ou a sua descoberta pode ser acidental, por alterações enzimáticas ou por uma radiografia. Entretanto, a biópsia é considerada o procedimento padrão para o diagnóstico da cirrose, sendo importante na determinação da causa da doença, se esta é desconhecida, ou na sua confirmação, se os sintomas não são específicos (SCHUPPAN; AFDHAL, 2008).

A compensação da doença hepática implica na preservação da função hepática. Uma vez que a descompensação ocorra, o transplante de fígado faz-se necessário. As taxas anuais de descompensação é 4% para a hepatite C e 10% para a hepatite B. A incidência de hepatocarcinoma é 2-7% ao ano. A descompensação, em qualquer tipo de doença hepática, leva a uma mortalidade de 85% dos pacientes em 5 anos, caso o transplante não seja realizado (SCHUPPAN; AFDHAL, 2008).

3.3.3 Hepatocarcinoma

A carcinogênese, de modo geral, é iniciada por agentes (químicos, físicos, biológicos ou genéticos) que alteram a estrutura do DNA. Dentre essas alterações são observadas a formação de adutos (união direta de duas moléculas) de DNA, oxidação das bases e erros no reparo do DNA que levam a mutações. O desenvolvimento do hepatocarcinoma compreende 3 fases: iniciação, promoção e progressão (PITOT, 2001).

A fase de iniciação é caracterizada por uma alteração celular irreversível e permanente em células isoladas. A eficiência dessa fase está relacionada com a síntese replicativa de DNA e a divisão celular, ambas necessárias para a fixação e conseqüente irreversibilidade do estado iniciado da célula (PITOT; DRAGAN, 1991; PITOT, 2001).

A fase de promoção resulta da replicação clonal de células iniciadas na presença do agente promotor de origem endógena ou exógena. A principal característica desse estágio é a sua reversibilidade, a qual pode ser conferida por morte celular, apoptose ou remodelamento da lesão. A promoção, ao contrário da iniciação, pode ser modulada por fatores ambientais, como a exposição ao agente promotor, idade do indivíduo, composição e quantidade da dieta alimentar. Assim, no caso da carcinogênese experimental, a fase de promoção pode ser regulada pela administração do agente promotor, cuja capacidade iniciante originará um número finito de células iniciadas. Entretanto, nas causas “naturais” ou nas doenças crônicas, a presença contínua do agente promotor aumenta o risco de desenvolvimento do câncer, em função do aumento da taxa de proliferação celular, acentuando a probabilidade de propagação de um erro genético (PITOT; DRAGAN, 1991; PITOT, 2001).

A fase de progressão é caracterizada pelo desenvolvimento de neoplasias malignas aneuplóides irreversíveis. As alterações genômicas desse estágio são acompanhadas por aumentada taxa de crescimento, invasividade, metástase e alterações bioquímicas (PITOT; DRAGAN, 1991).

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um dos tumores mais comuns no mundo todo, ocupando a terceira posição entre as causas de mortalidade relacionadas ao câncer. O risco de desenvolvimento do CHC é aumentado nas doenças hepáticas crônicas, principalmente se a cirrose já estiver estabelecida (LOWES et al., 1999). A cirrose é um grande fator de risco para a progressão do CHC, juntamente com as hepatites virais, hereditariedade, diabetes do tipo 2 entre outros (NEWELL et al., 2008; SCHUPPAN; AFDHAL, 2008). A cirrose e as hepatites crônicas são consideradas pré-neoplasias no CHC (LOW, 2004).

Algumas lesões são representativas de condições pré-neoplásicas no fígado. Elas incluem displasia de célula hepática, dividida em alteração de grandes células (caracterizada por ampliação nuclear e citoplasmática, pleomorfismo nuclear com hipercromasia, nucléolo proeminente e multinucleação) e alteração de pequenas células (células pequenas com pleomorfismo nuclear e proporção núcleo/citoplasma aumentada), hiperplasia adenomatóide, focos de hepatócitos alterados e nódulos de hepatócitos alterados (SU; BANNASCH, 2003; PARK; RONCALLI, 2006). Estes últimos diferem quanto à área ocupada pelas células alteradas e o formato esférico, com nítida delimitação do parênquima adjacente, observado nos nódulos (SILVA-OLIVEIRA, 2007). Na fase de promoção ocorre um aumento na proliferação focal de hepatócitos iniciados, os chamados focos e nódulos de hepatócitos alterados, os quais são precursores potenciais para o desenvolvimento de neoplasias, sendo assim considerados lesões pré-neoplásicas (DRAGAN; PITOT, 1992). A persistência dessas lesões implica no desenvolvimento do CHC.

As lesões pré-neoplásicas são marcadas pela alteração na expressão de algumas enzimas que podem ser utilizadas na sua identificação. As células iniciadas apresentam aumento na expressão de glutathione S-transferase forma placentar (GST-P) e γ -glutamyltranspeptidase (GGT) e diminuição na expressão de glicose-6-fosfatase (DRAGAN; PITOT, 1992). A GST-P é considerada um marcador seguro para células pré-neoplásicas, pois apresenta baixa atividade em tecidos normais ou em regeneração (SATO et al., 1985). Nesses casos, a concentração de glutathione S-transferases (GSTs) é suficiente para promover a proteção da célula contra substâncias nocivas provenientes dos alimentos ou subprodutos do próprio metabolismo. Nos mamíferos, a GST-P contribui para a defesa contra o estresse oxidativo (SHEEHAN et al., 2001).

As GSTs pertencem a um grupo de enzimas metabolizantes de xenobióticos (SALINAS; WONG, 1999). O processo de desintoxicação enzimática que envolve as GSTs apresenta 3 fases principais. A fase I ocorre com a difusão do xenobiótico para dentro da célula onde se torna substrato para a ação de enzimas do sistema citocromo P-450. Na fase II, o produto da fase I, de natureza hidrofóbica, é conjugado a um tripeptídeo, a glutathione, numa reação catalisada pelas GSTs. Na fase III, o conjugado glutathione-xenobiótico, um composto hidrofílico, é bombeado ativamente para fora da célula. A adição da glutathione impede que o composto seja difundido para dentro da célula novamente (SHEEHAN et al., 2001).

Os hepatócitos não são as únicas células a sofrerem alterações neoplásicas. Especial atenção tem sido dada à displasia do epitélio biliar, processo que caracteriza o colangiocarcinoma, considerado o segundo tumor hepático mais comum (ZEN et al., 2006). A

taxa de sobrevivência dos pacientes com diagnóstico dessa doença não ultrapassa 20%, em 5 anos (YEH et al., 2004). O colangiocarcinoma pode coexistir com o carcinoma hepatocelular no mesmo fígado, assim como no mesmo tumor e o seu sinal clínico mais evidente é a icterícia (RIO TINTO et al., 2003).

3.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA DA FUNÇÃO HEPÁTICA

A análise bioquímica da função hepática é um método complementar, já que a biópsia hepática é indicada apenas quando se quer confirmar um diagnóstico quase certo da cirrose. A cautela em se indicar uma biópsia se dá em virtude da invasividade do procedimento, dos riscos de complicações cirúrgicas e de erros na colheita do material (material insuficiente ou amostra não representativa) (MANNING; AFDHAL, 2008). Os obstáculos acerca da biópsia incluem dor, sangramento, pneumotórax, punção da vesícula biliar ou mesmo de outros órgãos (CROSS; ANTONIADES; HARRISON, 2008).

A verificação dos níveis plasmáticos de alguns compostos é um método útil para o reconhecimento das doenças que afetam a funcionalidade do fígado. Como já foi dito anteriormente, a doença hepática pode ser assintomática ou apresentar sintomas inespecíficos, como anorexia, perda de peso e fraqueza (LIDA et al., 2005). Dessa forma, os níveis plasmáticos de algumas substâncias marcadoras de lesão hepática auxiliam no diagnóstico diferencial direcionando o exame clínico. Os marcadores tradicionalmente utilizados não são todos específicos da função hepática e alguns deles são empregados como ratificação de um marcador inespecífico.

A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima que cataboliza aminoácidos permitindo que entrem no ciclo do ácido cítrico. Essa enzima faz a transaminação do grupo amino do aspartato para o α -cetoglutarato, formando oxalato. Ela está relacionada com a integridade dos hepatócitos, porém não é específica do fígado, podendo ser encontrada no músculo cardíaco, rins, cérebro e células vermelhas do sangue (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005).

A alanina aminotransferase (ALT) catalisa a interconversão do grupamento amino da alanina para o α -cetoglutarato formando piruvato e, portanto, desempenha importante função na gliconeogênese e no metabolismo de aminoácidos. A atividade da ALT é observada, principalmente, no fígado. Também pode ser encontrada em outros locais como músculos,

coração, rins, cérebro e tecido adiposo, mas em fração muito menor (SCHINDHELM et al., 2006) de tal forma que é considerada um marcador hepato-específico (BANKS, 1992). Por ser uma enzima citosólica o aumento da sua concentração indica permeabilidade da membrana e, portanto, morte celular (MURIEL; ESCOBAR, 2003). Assim, o aumento plasmático concomitante de ALT e de AST confirma a origem hepática da lesão. Apesar da ALT refletir injúria hepática, a AST tem uma correlação mais forte com a presença de fibrose (GRIGORESCU, 2006).

Atualmente, tem-se utilizado a proporção AST/ALT como um marcador de maior sensibilidade e especificidade, em humanos. Pacientes normais apresentam valor de aproximadamente 0,8 e este valor aumenta em estágio avançado de fibrose (MANNING; AFDHAL, 2008). Quando essa proporção é maior ou igual a 1, a cirrose pode ser caracterizada (CHEN et al., 2008). Uma proporção maior que 1,16 apresentou 81% de sensibilidade e 55% de especificidade em identificar pacientes cirróticos que morreram dentro de um ano (GRIGORESCU, 2006).

A albumina (ALB) é uma proteína sintetizada no fígado e corresponde à quase metade da proteína total. A outra metade é composta pelas globulinas. A ALB contribui para o gradiente de concentração entre o sangue e o fluido extracelular, sendo responsável por cerca de 70% da pressão osmótica vascular, além de captar e transportar algumas substâncias, por exemplo, a bilirrubina livre (BANKS, 1992). Essa proteína encontra-se diminuída na cirrose avançada devido à diminuição da produção hepática (SCHUPPAN; AFDHAL, 2008).

A fosfatase alcalina (ALKP) é uma enzima que transporta metabólitos através das membranas celulares. Assim como a AST, a ALKP também não é específica do fígado, podendo ser observada nos ossos, nos intestinos, nos rins, na placenta e nos leucócitos. No fígado, ela está presente na superfície do epitélio dos ductos biliares e na membrana dos hepatócitos. A proliferação desses ductos aumenta a síntese e a liberação dessa enzima. Assim sendo, níveis aumentados de ALKP estão correlacionados ao grau de integridade do tecido hepático. A meia-vida da ALKP é de 1 semana e isso explica a sua lenta diminuição mesmo na fase de resolução da cirrose (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005).

Outra enzima marcadora de colestase é a gama-glutamiltansferase (GGT). Essa enzima catalisa o metabolismo da glutatona e dos compostos conjugados a ela (ARIAS et al., 1994). A GGT faz a transferência do grupo γ -glutamil dos peptídeos para outros aminoácidos. Ela está presente nos hepatócitos e células do epitélio biliar, mas também é encontrada nos túbulos renais, pâncreas e intestino. Entretanto, sua utilização como teste de função hepática é justificada por sua alta sensibilidade em doenças do fígado. A GGT é um marcador de fibrose

progressiva usado para identificar estágios mais avançados da doença, pois reflete anormalidades da estrutura e da função hepática. É uma indicadora de colestase mais específica do que a ALKP e a sua alta concentração plasmática é característica da cirrose. O mecanismo de alteração da GGT é semelhante ao da ALKP, ou seja, níveis plasmáticos aumentados de ambas as enzimas indicam origem hepatobiliar da lesão (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005; MANNING; AFDHAL, 2008; SCHUPPAN; AFDHAL, 2008).

A bilirrubina é um produto formado a partir de eritrócitos velhos que são removidos da circulação por fagocitose. A hemoglobina é quebrada em porção globina e porção heme e seus componentes são reciclados. Quando esses componentes são separados, a globina é hidrolisada até os aminoácidos, os quais voltarão à circulação. O ferro, localizado no interior do grupo heme, é liberado e volta aos estoques teciduais. O resíduo do grupo heme, denominado biliverdina, é transportado para o fígado onde é reduzido à bilirrubina. A bilirrubina, inicialmente, é insolúvel (bilirrubina não-conjugada), mas torna-se solúvel pelo processo de biotransformação, realizado pela enzima glicuronil transferase, ao ser conjugada a um glicuronato. Esta forma da bilirrubina pode, então, entrar no hepatócito e a sua maior parte é secretada na bile. Uma pequena parte retorna à circulação, sendo excretada pelo rim na forma de urobilinogênio (BANKS, 1992; BANCROFT; GAMBLE, 2004). Em condições patológicas, a concentração plasmática de bilirrubina, tanto livre quanto conjugada, aumenta caracterizando a icterícia. As causas desse aumento podem ser decorrentes de aumento na destruição de eritrócitos, obstrução dos ductos biliares ou lesão de hepatócitos, de modo que mesmo as quantidades habituais de bilirrubina não são excretadas na bile (GUYTON; HALL, 2002). O teste da bilirrubina total (TBIL) compreende a fração conjugada e não-conjugada. É um teste específico de desordem hepática, visto que seu metabolismo é exclusivamente no fígado.

O teste da proteína total (TP) avalia a concentração plasmática de proteínas (albumina + globulinas). A cirrose é uma condição patológica que provoca a redução dos níveis plasmáticos de proteínas. A incapacidade do hepatócito de sintetizar as proteínas em quantidade suficiente resulta na diminuição da pressão osmótica do plasma e formação de edema associado à afecção (GUYTON; HALL, 2002).

A globulina (GLOB), juntamente com a ALB, compõe a TP plasmática. A fração das GLOBs compreende as α , β e γ -globulinas. O grupo das γ -globulinas é composto pelas imunoglobulinas e são sintetizadas nos órgãos do sistema reticuloendotelial. As demais são sintetizadas pelo fígado e, assim como a ALB, desempenham funções de transporte de substâncias (BANKS, 1992).

3.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE CIRROSE HEPÁTICA

Os diferentes agentes etiológicos da cirrose agem sob variáveis de tempo, dosagens e condições ambientais que, experimentalmente, devem ser compensadas a fim de se otimizar os estudos em laboratório. Os modelos experimentais procuram, de maneira rápida e eficiente, reproduzir as consequências do quadro patológico encontrado na casuística clínica.

Neste capítulo serão apresentadas as substâncias cuja utilização é mais comum na indução experimental da cirrose: dimetilnitrosamina (DMN), tetracloreto de carbono (CCl_4) e tioacetamida (TAA). Alguns trabalhos empregam a ligação de ductos biliares, porém essa técnica não é muito utilizada, em virtude da invasividade do procedimento e do baixo rendimento do quadro cirrótico obtido, razão pela qual não será abordada nesta revisão.

3.5.1 Dimetilnitrosamina

O termo “nitrosamina” se refere a vários compostos de diferentes pesos moleculares, cuja característica estrutural comum é a presença do grupo funcional N–NO. No grupo das nitrosaminas são encontradas a dimetilnitrosamina (DMN) e a dietilnitrosamina (DEN) (SANCHES FILHO et al., 2003). As fórmulas estruturais dos compostos estão representadas no quadro 1 abaixo:

Quadro 1 – Fórmulas estruturais de compostos do grupo Nitrosamina

A DEN é a substância utilizada no modelo do hepatócito resistente para o desenvolvimento de hepatocarcinogênese experimental (TOLEDO et al., 2003; MORENO et al., 2007; SILVA-OLIVEIRA, 2007).

A DMN já foi o tóxico de eleição na indução de cirrose experimental. O quadro cirrótico é bastante semelhante ao do ser humano, com forte correlação entre o quadro histológico e o funcional. Entretanto, a substância é muito tóxica e pequenas doses podem causar necrose hepática massiva e morte em várias espécies, pois pode ser absorvida pela pele, mucosa, intestino e pulmão (MADDEN et al., 1970).

A DMN é uma hepatotoxina, carcinogênica e mutagênica, muito potente. A toxicidade produzida por esta droga é mediada por seus metabólitos reativos e não pelo composto inicial. Seu composto ativo inibe a síntese protéica e altera a morfologia ribossomal, resultando em morte das células. O alvo da DMN é primariamente o fígado, o qual contém as enzimas necessárias para a sua ativação metabólica (GEORGE et al., 2001).

A DMN sofre a ação do complexo enzimático citocromo P-450 e sua ativação e degradação produzem formaldeído, metanol e o intermediário alquilante que reage com ácidos nucleicos e proteínas para formar macromoléculas metiladas (GEORGE et al., 2001). Embora esses autores tenham recomendado o modelo para o estudo da cirrose hepática focando a rápida deposição de colágeno, a maioria dos trabalhos se referem à DMN como um agente causador de fibrose. Esse fato foi evidenciado por trabalho desenvolvido em nosso laboratório (PEREIRA, 2003). Nesse experimento, o autor afirma que, apesar da função hepática bastante alterada, a mortalidade é alta e o quadro fibrótico é pouco intenso.

3.5.2 Tetracloreto de carbono

O tetracloreto de carbono (CCl_4) é uma substância amplamente utilizada na indução de cirrose ou fibrose hepática. A hepatotoxicidade dessa droga se deve aos radicais livres, triclorometil ($-\text{CCl}_3$) e triclorometilperoxil ($-\text{OOCCL}_3$), formados durante sua metabolização, a qual é realizada pelas enzimas do sistema citocromo P-450. O segundo radical reage rapidamente com o O_2 formando um radical extremamente lesivo (CREMONESE et al., 2001; SIMILE et al., 2001).

Em literatura mais remota, afirmou-se que a cirrose induzida pelo CCl_4 é diferente da doença desenvolvida por humanos. Algumas características que compõem o quadro cirrótico,

como atipia celular e as alterações associadas ao desarranjo arquitetural, por exemplo, os níveis sorológicos das proteínas totais, não foram observadas (QUINN; HIGGINSON, 1965; OLSSON; REHNSTRÖM, 1966). O CCl_4 causa peroxidação lipídica na membrana celular e também diminuição das junções intercomunicantes. Supõe-se que essa perda de comunicação celular pode exercer um efeito protetor ao hepatócito ao desconectar células prejudicadas (NAKATA et al., 1996).

Outros estudos revelam que a cirrose induzida por CCl_4 é adequada quanto à morfologia e fisiopatologia (ZIM et al., 2002; NATARAJAN et al., 2006). São relatadas alterações gordurosas, fibrose centrolobular e alterações bioquímicas. Todavia, são observados septos fibrosos finos e pouca proliferação ductular com rápida regressão das lesões, o que dificulta o estudo de tratamentos anticirróticos a longo prazo nesse modelo (JEONG et al., 2001). A alta mortalidade (até 50%) e a diminuição dos estoques de glicogênio hepático são outras desvantagens apresentadas por esse método (CREMONESE et al., 2001; LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002; MURIEL; ESCOBAR, 2003). Também estão associadas a baixa reprodutibilidade e homogeneidade do quadro cirrótico e pouca semelhança com a cirrose clínica, resultando em distorção arquitetural ampla, porém não tão proeminente (LALEMAN et al., 2006).

3.5.3 *Tioacetamida*

Até 1943, a tioacetamida (TAA) era utilizada como fungicida em lavouras de laranja, quando foi encontrada contaminando o suco e considerada, desde então, um risco à saúde pública. Em 1948, descobriu-se que a administração crônica da substância levava à cirrose hepática e hepatocarcinomas (MUÑOS TORRES et al., 1991; DAVID et al., 2002). Hoje em dia, a TAA é utilizada nas indústrias do couro, papel e têxtil, e empregada como acelerador na vulcanização de borracha e estabilizador de combustíveis (WANG et al., 2000).

A TAA requer ativação metabólica para que seu efeito seja tóxico. Os produtos resultantes da sua biotransformação são S-óxido de tioacetamida e S-dióxido de tioacetamida (Quadro 2). O efeito citotóxico dessa droga é atribuído ao último metabólito, um composto instável altamente reativo que se liga covalentemente às macromoléculas teciduais (CHILAKAPATI et al., 2005).

Quadro 2 - Esquema ilustrativo da metabolização da tioacetamida

A TAA é ativada pela ação catalítica do complexo microsomal citocromo P-450, localizado no retículo endoplasmático liso. O sistema enzimático citocromo P-450 compreende várias isoenzimas das quais a CYP2E1 (Cytochrome P4502E1) parece ser a que está mais envolvida na metabolização da TAA (WANG et al., 2000). Esta isoenzima é a principal família de citocromos P-450 do fígado dos mamíferos, desempenhando papel crucial no metabolismo, toxicidade e carcinogênese de xenobióticos (RAMAIAH; APTE; MEHENDALE, 2001; CARO; CEDERAUM, 2005), além de metabolizar vários outros compostos de baixo peso molecular (CHILAKAPATI et al., 2005).

A TAA reduz a atividade antioxidante e acentua a peroxidação lipídica no fígado, estabelecendo uma condição de estresse oxidativo que leva à necrose celular (TÚNEZ et al., 2005). Os radicais livres gerados por esta via oxidativa, além de causarem peroxidação lipídica nas membranas, provocam aumentos no cálcio citosólico, inibição da glutathione e redução dos grupos tiol (–SH), afetando severamente as células da região acinar pericentral e levando à morte celular. A concentração intracelular de glutathione e os níveis de tióis atuam sobre o DNA, modulando a síntese e protegendo-o do dano oxidativo (SANZ et al., 1998; ZARAGOZA et al., 2000). A toxicidade da TAA leva à destruição do parênquima com rompimento de endomembranas e perda da matriz citoplasmática (MUÑOZ TORRES et al., 1991).

Os compostos derivados da TAA, aparentemente, são responsáveis pela inativação de enzimas e de proteínas estruturais. A necrose provocada por esta droga está relacionada a alterações na concentração citoplasmática do cálcio, o que afeta principalmente mitocôndrias

e leva à inibição da respiração celular. A ação da TAA sobre o metabolismo dos ácidos nucleicos é evidenciada por nucléolos aumentados e pela inibição no transporte de RNA do núcleo para o citoplasma (FONTANA et al., 1996). Além disso, a TAA altera o ciclo da uréia, o perfil de aminoácidos circulantes, o metabolismo lipídico e lipoprotéico e a síntese de ácidos graxos (DAVID et al., 2002).

A cirrose induzida por TAA em ratos leva a uma mortalidade menor (35%) em relação ao CCl₄ (50%) (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002). A fibrose hepática e os nódulos regenerativos são mais proeminentes e o padrão histológico é mais próximo ao da cirrose humana (LALEMAN et al., 2006). Apesar da fibrose induzida com TAA se desenvolver mais lentamente do que com CCl₄, o parênquima se torna completamente dividido por septos fibrosos bem demarcados (SHEA; MANSEAU, 1967). A lenta deposição de colágeno tem sido apontada como uma desvantagem no uso da TAA em relação ao CCl₄, com a cirrose, em geral, se estabelecendo a partir da 10^a semana de tratamento (AL BADER et al., 2000; SPIRA et al., 2002). Contudo, o desenvolvimento tardio da doença é visto como mais uma das características da TAA em reproduzir adequadamente o estado crônico da doença hepática (MASUMI et al., 1999). Geralmente, são necessários anos de exposição ao agente para que a cirrose se desenvolva no Homem.

A administração crônica dessa hepatotoxina provoca perda de peso, necrose celular, regeneração de hepatócitos, fibrose progressiva levando a cirrose e proliferação de ductos biliares (MOREIRA et al., 1995; FONTANA et al., 1996; AL BADER et al., 2000; JEONG et al., 2001).

A TAA pode ser administrada de diferentes formas: oral (na água ou na ração ingerida), por intubação intragástrica, ou por injeções subcutâneas ou intraperitoneais (FONTANA et al., 1996). A administração de TAA através da água do bebedouro consiste em um método não invasivo, satisfatório e fácil na indução da cirrose em grande número de animais (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002), mas, à medida que a cirrose instala-se e compromete o fígado do animal, ele apresenta perda de apetite e redução na ingestão da água com o fármaco (até 50% menos do que os animais controle), diminuindo a eficiência do tóxico (MOREIRA et al., 1995; FONTANA et al., 1996; GEORGE et al., 2001). Ademais, podem ocorrer falhas e variações no processo de indução, visto que não é possível controlar a dosagem de tóxico que cada animal ingere. Assim, dependendo da quantidade de água consumida, haverá grande variação individual nas lesões resultantes. Além disso, a administração de TAA por via intragástrica, assim como ocorre com outras hepatotoxinas,

geralmente incorre em resultados heterogêneos durante o desenvolvimento do quadro patológico, limitando a aplicação desses modelos.

Há um certo grau de variação na sensibilidade hepática entre os animais e, após um determinado período de administração da substância, o animal adquire resistência à droga (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002). Dois fatores contribuem para esta variação de resposta: o envelhecimento do animal e a redução do citocromo P-450, devida ao dano celular. As diferenças na atividade do sistema enzimático são dependentes da idade, apresentando aumento dos 2 aos 12 meses, nos ratos, e diminuindo na senescência (ZARAGOZA et al., 2000). Estudo com ratos recém desmamados sugere que a resposta menos severa nos filhotes, em relação aos adultos, se deva à menor expressão das enzimas envolvidas na metabolização da TAA (SANZ et al., 1998).

Durante tratamento com TAA, por via oral, pesquisadores observaram que alguns animais ganham peso, contrariando os resultados esperados. Nesse experimento, apesar da cirrose instalar-se com sucesso, apresentando as características morfológicas típicas da doença, os testes de função hepática não apresentaram alterações significativas em relação aos animais controle. A sensibilidade hepática à TAA se reduz com o tempo e, assim, é sugerido que as doses sejam ajustadas de acordo com as flutuações de peso dos animais. Esse método resultaria em aumento no rendimento da indução do quadro cirrótico e redução expressiva da mortalidade. (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002).

3.6 AVALIAÇÃO DA EMOCIONALIDADE

A cirrose constitui-se em uma doença crônica que acarreta importantes transtornos na esfera psicológica do paciente. Os estados mentais, as interações sociais e os comportamentos podem ser alterados até mesmo pela simples consciência de uma enfermidade, por exemplo, uma infecção viral, independentemente da função hepática. De fato, é bem conhecido que diversos quadros de infecção e inflamação possam exacerbar distúrbios psicológicos pré-existentes, principalmente após a revelação de um diagnóstico de uma doença crônica incurável (MARCHESINI et al., 2001). Isto acarreta ao paciente baixa auto-estima e piora significativa na qualidade de vida, principalmente àqueles que apresentam transtornos afetivos, como a depressão. Além disso, o estado psicológico tem a capacidade de afetar, consideravelmente, não só o desenvolvimento das doenças, mas também a adesão e a resposta

às terapias e tratamentos farmacológicos. Dentre os pacientes com cirrose em estágio avançado à espera de transplante, a mortalidade é maior entre os depressivos, independente da doença ou de suas complicações (BIANCHI et al., 2005).

Pessoas portadoras de doenças hepáticas crônicas sofrem de fadiga, ansiedade, depressão e outros problemas emocionais que afetam a qualidade de vida e o bem estar. Essa condição é observada mais marcadamente no caso de falha hepática, embora os portadores de cirrose compensada também sejam acometidos. Dentre os transtornos psicológicos classificados no DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition*) e que estão mais associados aos distúrbios hepáticos, a depressão é o mais comum (BIANCHI et al., 2005). A infecção por hepatites e a doença hepática alcoólica têm sua prevalência na 3ª e 4ª década da vida, período considerado mais produtivo na vida das pessoas. Pacientes com doença hepática inicial não tem prejuízo da qualidade de vida, independente da causa da doença. Entre os pacientes com cirrose, aqueles com colestase têm menor prejuízo da qualidade de vida do que aqueles com doença hepatocelular. Esse prejuízo aumenta com a severidade da doença (YOUNOSSI et al., 2001).

Em animais, a avaliação comportamental tem sido realizada em experimentos de administração de agentes alergênicos (PORTELA et al., 2007), tumorais (PALERMO-NETO et al., 2008), tóxicos (RIGHI; PALERMO-NETO, 2003), entre outros, com excelente validação dos testes empregados. No que diz respeito à cirrose, são utilizados testes comportamentais para avaliação dos estados emocionais associados a encefalopatia hepática, uma decorrência da cirrose (WESIERSKA et al., 2006; MÉNDEZ et al., 2008). No entanto, ainda são poucos os estudos que tratam do aspecto comportamental da doença hepática, principalmente no decorrer do seu desenvolvimento e agravamento, e que demonstrem seu caráter ansiogênico e depressor para os animais.

Existem diversos modelos animais elaborados para a avaliação dos estados emocionais decorrentes de um estímulo estressor. Um dos métodos de avaliação do estado emocional dos animais é o teste do labirinto em cruz elevado (LCE), que foi desenvolvido a partir do trabalho de Montgomery (1955) e, tem sido muito utilizado com ratos (PELLOW; FILE, 1985). Este aparelho é constituído por dois braços abertos (desprotegidos), em posição perpendicular a dois braços fechados (protegidos). Segundo Pellow et al. (1985), os estados emocionais decorrentes de estimulações aversivas ou estressantes podem ser avaliados pelos locais de maior permanência dos ratos no LCE, ou seja, a maior permanência nos braços abertos indicaria níveis reduzidos de estresse/ansiedade dos animais, ao passo que a

permanência maior nos braços fechados indicaria o oposto, isto é, animais mais estressados ou ansiosos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material e os procedimentos empregados na realização deste trabalho seguem descritos abaixo.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 112 fêmeas adultas de ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*) com 2 meses de idade e cerca de 200 g cada, provenientes do Biotério Central do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Elas foram identificadas e separadas nas gaiolas de acordo com seu peso, de modo que não houvesse variação maior do que 10 g entre os indivíduos da mesma gaiola. Esses animais permaneceram em gaiolas padrão de polipropileno (41 x 34 x 16 cm), forradas com serragem (maravalha) e tampadas por grade metálica, em número de 5 ratas por gaiola. Elas permaneceram em biotério ventilado, com umidade e temperatura controladas (65-70% e 22-26°C respectivamente) e água e ração fornecidas em regime *ad libitum*. A iluminação artificial determina um ciclo claro-escuro de 12 horas, iniciando-se a fase clara às 6:00 horas. O protocolo experimental nº 892/2006 foi aprovado pela Comissão de Bioética da FMVZ/USP.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

As gaiolas foram distribuídas em 5 grupos. A cirrose hepática foi induzida nos animais de 4 desses grupos, com tioacetamida (Sigma-Aldrich, Alemanha), e 1 constituiu o grupo de ratas controle, recebendo solução salina 0,9%.

A TAA (solução a 4% diluída em salina 0,9%) foi administrada por via intraperitoneal, 3 vezes por semana, por 14 semanas, à proporção inicial de 200 mg/kg, numa dose de 40 mg/mL e 1 mL/kg.

A denominação dos grupos se deu da seguinte maneira:

- ❖ **Grupo A** (20 animais) – 200 mg TAA/kg por 14 semanas;
- ❖ **Grupo B** (20 animais) – 200 mg TAA/kg nas primeiras 7 semanas (48 dias). A partir deste período a dose foi aumentada em 20%, passando a 240 mg TAA/kg;
- ❖ **Grupo C** (35 animais) – as 14 semanas de indução foram divididas em intervalos de 24 dias com acréscimo de 10% na dosagem ao final de cada intervalo (Quadro 3):

INTERVALO 1 (1 – 24 dias):	200 mg/kg
INTERVALO 2 (25 – 48 dias):	aumento 10% (220 mg TAA/kg)
INTERVALO 3 (49 – 72 dias):	aumento 10% (242 mg TAA/kg)
INTERVALO 4 (73 – 96 dias):	aumento 10% (266,2 mg TAA/kg)

Quadro 3 - Protocolo de indução do grupo C

- ❖ **Grupo D** (25 animais) – a indução seguiu o mesmo esquema da divisão em intervalos adotada no grupo C, porém, as doses de TAA foram aumentadas em 15% ao final de cada intervalo (Quadro 4):

INTERVALO 1 (1 – 24 dias):	200 mg/kg
INTERVALO 2 (25 – 48 dias):	aumento 15% (230 mg TAA/kg)
INTERVALO 3 (49 – 72 dias):	aumento 15% (264,5 mg TAA/kg)
INTERVALO 4 (73 – 96 dias):	aumento 15% (304,1 mg TAA/kg)

Quadro 4 - Protocolo de indução do grupo D

- ❖ **Grupo E** (12 animais) – 1 mL de solução salina 0,9% por 14 semanas (grupo controle).

Durante a fase de indução da cirrose, os animais foram pesados 2 vezes por semana e suas características físicas foram observadas.

4.2.1 *Colheita e Processamento de Amostras Sanguíneas*

O sangue de todos os animais foi colhido no início do experimento para se avaliar o estado inicial do fígado e, desta maneira, cada animal foi o controle dele próprio. Nos grupos B, C e D o procedimento foi repetido antes de cada aumento de dose para avaliação dos efeitos de cada dosagem sobre os marcadores bioquímicos. O sangue de todos os animais foi colhido novamente no momento da eutanásia.

A colheita das amostras sanguíneas foi efetuada por punção cardíaca. Para a realização da mesma, procedeu-se a anestesia dos animais com anestésico inalatório Isoflurano (Cristália, Brasil), em oxigênio 100%, através de um aparelho de ventilação mecânica (Takaoka 640, Brasil), com auxílio de máscara de tamanho apropriado. A entrada do animal em anestesia foi verificada pelas frequências cardíaca e respiratória, pelo grau de relaxamento muscular e pelos reflexos digitais.

O volume sanguíneo colhido foi de, no máximo, 1 mL utilizando-se agulha 30 x 0,7 mm e seringa de 3 mL, ambas heparinizadas. As amostras permaneceram sobre gelo picado até o término dos procedimentos quando foram centrifugadas a 6000 rpm por 5 minutos.

O plasma obtido foi armazenado em freezer (-80° C) para posterior análise bioquímica.

4.2.2 *Avaliação Comportamental*

O teste comportamental avaliou a ansiedade dos animais em diferentes fases da indução da cirrose com a finalidade de verificar alterações decorrentes da evolução da doença.

Os testes aconteceram na 6ª, 10ª, 12ª e 14ª semanas de tratamento. Os animais utilizados como controle foram avaliados antes da primeira injeção. O grupo D foi avaliado somente na 14ª semana por não dispor de número suficiente de animais para serem avaliados em todas as etapas, consequência da alta mortalidade registrada nesse grupo.

A avaliação comportamental foi realizada pelo método do Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Este equipamento, feito de madeira, consiste de dois braços fechados, com paredes laterais de 40 cm de altura, perpendiculares a dois braços abertos de igual tamanho (50 x 10 cm). Os braços são conectados por um quadrado central (10 x 10 cm) em forma de cruz (Figura 1). O labirinto está elevado 50 cm do solo e é iluminado por duas lâmpadas

fluorescentes de 60 watts. Cada animal é colocado individualmente no espaço central do LCE e observado por 5 minutos para o registro do comportamento. Entre as observações de cada animal, a arena foi limpa com álcool 5% com vistas a minimizar os odores deixados pelo animal anterior, o que poderia interferir no comportamento do animal seguinte. Os registros dos comportamentos no LCE foram realizados sempre no mesmo período do dia, intercalando-se os animais dos diferentes grupos. Cada animal passou pelo equipamento uma única vez durante todo o experimento.

Figura 1 - Labirinto em Cruz Elevado – equipamento para avaliação comportamental

O registro dos comportamentos no LCE é feito indiretamente, evitando a interferência da presença do pesquisador na sala de observação dos animais. O sistema de observação indireta é constituído por uma câmara instalada no teto da sala de observação, conectada a um sistema operacional constituído por um monitor (Sony - Triniton®) e um microcomputador, ambos fora da sala. Para interpretar as imagens observadas durante a realização dos testes comportamentais, o programa Ethovision® System (Noldus Information Technology®, Leesburg, Va., EUA) fez a digitalização e o registro do comportamento dos animais.

Pellow (1985) e Lister (1987) validaram esse modelo para estudo dos níveis de ansiedade e propuseram o registro dos seguintes parâmetros de comportamento:

- a. Número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados;
- b. Tempo de permanência nos braços abertos e nos braços fechados.

Para tanto, considera-se como “entrada” em um dos braços, para efeito de sua permanência em cada área do labirinto, o ato do animal colocar os quatro membros dentro da área.

4.2.3 Eutanásia

Ao término do experimento, os animais permaneceram 10 dias em repouso, sendo apenas pesados. Após este período eles foram sacrificados com dose excessiva de anestésico (CLOSE et al., 1996, 1997), empregando-se o mesmo procedimento da colheita sanguínea.

4.2.4 Processamento do Fígado

Em cada animal, as vísceras (pulmões, coração e trato digestivo completo) foram removidas e seu peso foi aferido. O fígado foi separado, pesado e o seu volume foi obtido suspendendo-o por um fio e mergulhando-o em um béquer com água destilada, sobre uma balança analítica. O peso adicional é equivalente ao peso em água deslocada, portanto, ao volume em centímetros cúbicos. Foi aferido também o peso da carcaça.

Foram coletadas amostras de fígado de todos os animais para análise histológica. A fixação dos fragmentos foi efetuada nos líquidos fixadores Bouin (6 h) e Metacarn (12 h), para inclusão em paraplast, e em McDowell (tempo indeterminado) para inclusão em historresina. Em Bouin e Metacarn foram fixados fragmentos da porção direita do lobo médio e, em McDowell, fragmentos do lobo esquerdo. O restante do fígado foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C para análises futuras.

4.3 ÍNDICES RELATIVOS

O peso dos animais foi analisado com base no índice de ganho de peso, considerando-se o peso do animal em cada semana em relação ao peso inicial:

$$\text{IGP} = \text{Pss} / \text{Pi}$$

Onde: IGP = índice de ganho de peso
Pss = peso na semana selecionada
Pi = peso inicial

O índice hepato-corporal foi calculado dividindo-se o peso do fígado pelo peso da carcaça e multiplicando-se o resultado por 100, para obtenção dos valores em porcentagem. O mesmo foi feito para o índice hepatossomático, no qual dividiu-se o peso do fígado pelo peso do animal, e para o índice víscero-somático, em que se dividiu o peso das vísceras pelo peso do animal.

4.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Sendo dotado de várias atribuições, muitas técnicas foram desenvolvidas no sentido de avaliar a funcionalidade do fígado. Neste experimento, utilizou-se como marcador bioquímico a determinação da atividade dos seguintes marcadores sanguíneos de lesão hepática: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), albumina (ALB), fosfatase alcalina (ALKP), gama-glutamiltanspeptidase (GGT), bilirrubina total (TBIL), proteína total (TP) e globulina (GLOB).

As amostras de plasma foram analisadas pelo analisador bioquímico VetTest® (IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, ME, EUA). Os valores médios de ALT, AST, ALKP e GGT são expressos em U/L, enquanto que os valores de ALB, TP e GLOB são expressos em g/dL e os de TBIL em mg/dL.

Para a avaliação desses marcadores foram utilizados 10 animais por grupo.

4.5 MICROSCOPIA DE LUZ E DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Para a análise morfológica microscópica, os fragmentos incluídos em paraplast foram cortados em micrótomo manual, obtendo-se cortes de 5 µm de espessura. Estes cortes foram distendidos em banho-maria (30-35°C) e recolhidos em lâminas de vidro.

Após as devidas colorações, as lâminas foram fotografadas em microscópio óptico (OLYMPUS, BX60) com câmara acoplada (ZEISS, AxioCam HRc) utilizando-se o *software* KS400 3.0 (ZEISS, 2000), para a aquisição das imagens.

4.5.1 Colorações

Os cortes de tecido foram desparafinados em xilol e xilol/etanol (1:1), reidratados em sequência decrescente de etanol, lavados em água corrente e, então, corados. Após a coloração, esses cortes passaram por desidratação, na sequência inversa, sendo retirados do xilol e montados em resina sintética Permout®. Esses procedimentos foram comuns a todas as colorações.

O material fixado em Bouin foi corado por Picrossírius (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979), para evidenciação das fibras colágenas. Antes de passarem pelo corante, os cortes passaram por tratamento com solução de ácido fosfomolibdico 2% (1 banho: 15 s).

No material fixado em Metacarn efetuou-se as seguintes colorações (BANCROFT; GAMBLE, 2002):

- a) HE (Hematoxilina de Harris - Eosina): para análise morfológica e histopatológica das amostras;
- b) PAS (Ácido Periódico de Schiff): para observação do glicogênio no tecido hepático;
- c) Diastase/PAS (incubação em saliva 1 h em estufa 37°C) para determinação da presença de mucopolissacarídeos neutros no interior de ductos biliares e de glicogênio;
- d) Azul de Alcian (pH 2,5)/HE: para diferenciação de mucopolissacarídeos ácidos nos ductos biliares;
- e) Azul da Prússia: para identificação de pigmento férrico (TOLOSA et al., 2003).

4.5.2 Quantificação de Colágeno

Nesta etapa foram utilizados os tecidos corados por Picrossírius. O material foi fotografado no microscópio óptico, já descrito anteriormente, e o mesmo *software* (KS400 3.0) executou a captura das imagens e a mensuração do colágeno.

As imagens foram feitas em aumento de 20x, para quantificação do colágeno interlobular, e em aumento de 60x, para quantificação do colágeno intralobular. Foram tomados, aleatoriamente, 10 animais de cada grupo cirrótico e todos os animais do grupo controle (Grupo E, n=12). Na objetiva de 20x foram fotografados 5 cortes não seriados, sendo 5 campos por corte, de forma a somar 25 campos, de tamanho constante, por animal. Na objetiva de 60x empregou-se o mesmo procedimento em 10 campos por corte, somando 50 campos por animal.

A imagem de cada campo foi digitalizada e tratada de forma a contrastar as fibras colágenas da coloração de fundo por limiar de cor. Após esta separação, foi medida a área ocupada pelas fibras colágenas no campo.

Os valores dos campos de cada animal foram somados e, assim, obteve-se a área ocupada por colágeno no fígado de cada indivíduo do grupo. A partir desses valores os grupos foram comparados estatisticamente.

A porcentagem da área ocupada pelo colágeno no fígado em cada grupo, a qual corresponde à proporção volumétrica do mesmo, foi calculada em função da área do campo de cada objetiva, da seguinte forma:

$$\frac{ACF \times 100}{ACC}$$

Onde, ACF: área ocupada por colágeno (soma de todos os campos mensurados no grupo)

ACC: área do campo multiplicada pelo número de campos fotografados no grupo

$$20x = 603126 \mu m^2 ; 60x = 67014,2 \mu m^2$$

4.5.3 Avaliação Histopatológica

Foram examinadas as lâminas coradas por HE. Após um estudo prévio do material, definiram-se os itens a serem considerados e a avaliação dessas lesões foi realizada em função do padrão observado no grupo controle. A sua intensidade consistiu em classificação por cruzes, às quais foram atribuídos escores, conforme a intensidade da lesão:

(+ + +) lesão acentuada	(+ +) lesão moderada	(+) lesão discreta
(+ + +) = 3	(+ +) = 2	(+) = 1

Esses valores passaram por tratamento estatístico, obtendo-se deles a média e o desvio padrão.

O exame histopatológico avaliou os seguintes parâmetros: nódulos regenerativos, fibrose, células ovais, inclusões nucleares, figuras de mitose, células binucleadas com lesão nuclear e hepatócitos encarcerados. O fígado normal frequentemente apresenta hepatócitos binucleados e, para avaliação histopatológica, considerou-se as células que apresentaram inclusão nuclear em um dos seus núcleos. Como hepatócitos encarcerados considerou-se aqueles que estavam envoltos por células ovais.

A classificação das lesões foi realizada por estudo cego, no qual o observador desconhecia a que grupo pertencia o material sob análise.

4.5.4 Imuno-histoquímica para *Glutathione S-Transferase Forma Placental (GST-P)*

As lâminas utilizadas foram previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxi-silano (Sigma, EUA), solução a 4% em acetona (1 min), acetona (2 banhos), água destilada (2 banhos). O procedimento foi realizado no material fixado em Metacarn, sendo tomados 2 espécimes de cada grupo.

Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol e xilol/etanol (1:1), reidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 70%) e lavados em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução de peróxido de hidrogênio 30 volumes (Merck, Brasil) a 20%, em PBS, por 20 min.

A marcação imuno-histoquímica da GST-P empregou o método da avidina-biotina (HSU; RAINE; FANGER 1981). Os cortes foram incubados com anticorpo primário (policlonal) anti-GST-P (MBL, Japão) na diluição de 1:1000, durante 2 h, a temperatura ambiente. A diluição foi feita em solução contendo soro-albumina a 0,5% (albumina bovina fração V; Sigma, EUA) em água destilada e PBS.

Após a incubação com o anticorpo primário, incubou-se novamente os cortes, por 30 min, com o anticorpo secundário biotilado (antiimunoglobulina de coelho; Vector Laboratories, EUA) na diluição de 1:400. A aplicação do conjugado avidina-biotina-peroxidase (Vectastain-ABC kit, Vector EUA) diluído em PBS (1:400) decorreu também por 30 min. Posteriormente, foi aplicada sobre os cortes uma solução substrato de peroxidase preparada imediatamente antes da utilização. Essa solução constitui-se na mistura de peróxido

de hidrogênio a 0,02% (Merck, Brasil) com diaminobenzidina (DAB - Sigma, EUA) a 0,1%, em PBS.

Os cortes foram então lavados em PBS por 5 min, contracorados pela eosina e em seguida corados pela hematoxilina, desidratados, secos e montados com resina sintética.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações dos marcadores sanguíneos de lesão hepática foram realizadas intragrupos, comparando-se a função hepática em diferentes momentos, e intergrupos, comparando-se a função hepática em relação aos diferentes protocolos de indução.

As análises intragrupos foram comparadas pelo teste t de Student pareado, para os grupos com 2 amostras e distribuição paramétrica, e teste de Wilcoxon, para 2 amostras pareadas com distribuição não paramétrica. Foi realizada ANOVA de medidas repetidas seguida por teste de Tukey-Kramer ou de Holm-Sidak para os grupos com mais de 2 amostras e distribuição paramétrica, e ANOVA de medidas repetidas seguida por teste de Friedman para distribuição não paramétrica.

As análises intergrupos foram realizadas pelo teste t de Student (paramétrico) e teste U de Mann-Whitney (não paramétrico) para comparar os grupos C e D aos 24 dias e aos 72 dias. ANOVA seguida por teste de Tukey-Kramer ou de Holm-Sidak foi utilizada para as demais comparações de amostras paramétricas, e ANOVA seguida por teste de Kruskal-Wallis para amostras não paramétricas.

Foram utilizados os *softwares* Minitab® Release 14 Statistical Software (State College, PA - EUA), GraphPad InStat 3 (La Jolla, CA – EUA) e SigmaStat (Jandel Scientific, CA - EUA) de acordo com os testes adequados a cada comparação e para a conferência dos mesmos. Os resultados com $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos nesse experimento encontram-se descritos a seguir.

5.1 OBSERVAÇÕES PRELIMINARES

Durante a indução da cirrose as características físicas dos animais foram observadas. Os animais tratados com TAA apresentaram queda de pêlo (principalmente o grupo C) e freqüente secreção porfirinêmica da glândula de Harder, uma secreção avermelhada observada ao redor dos olhos. Foi observada também piloereção e amarelamento da pelagem, bem como flacidez da pele, posição álgica e pouca responsividade à manipulação. Além do que já foi mencionado, um animal do grupo C apresentou petéquias anelares e avermelhadas na cauda, sensíveis ao toque. No grupo C, e mais acentuadamente no grupo D, alguns animais apresentaram diarreia. Em contrapartida, os animais do grupo E (controle) eram nitidamente mais ativos do que os dos outros grupos, em qualquer fase do experimento.

A taxa de mortalidade registrada foi 5% no grupo A, 5% no grupo B, 14,3% no grupo C, 44% no grupo D e 0 no grupo E (Figura 2).

Figura 2 - Taxa de mortalidade registrada durante o experimento.

Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina

5.2 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Foram verificados o número de entradas e o tempo de permanência em cada área do LCE, sendo encontradas diferenças referentes aos braços fechados e abertos, respectivamente.

Os grupos tratados com TAA apresentaram menor número de entradas nos braços fechados do que o grupo E, porém isto não é verificado até a 6ª semana (Figura 3A). As diferenças surgiram a partir da 10ª semana de tratamento. Nesta fase, o grupo B apresentou número de entradas nos braços fechados significativamente menor (22 ± 10) do que o grupo E ($33,8 \pm 3,3$) ($P < 0,01$) (Figura 3B). Na 12ª semana, houve diferença dos grupos B ($21,3 \pm 5,7$) e C ($23,6 \pm 10,1$) em relação ao grupo E ($P < 0,02$) (Figura 3C). No entanto, na 14ª semana foram os grupos C ($17,7 \pm 10,4$) e D ($18,9 \pm 10,1$) que apresentaram número de entradas significativamente menor, não apenas em relação ao grupo E, mas também em relação aos grupos A ($36,8 \pm 22,4$) e B ($33,5 \pm 13,3$) ($P < 0,001$) (Figura 3D).

Figura 3 - Número de entradas nos braços fechados do Labirinto em Cruz Elevado durante indução de cirrose. **(B)**: ANOVA seguida por teste de Tukey-Kramer; **(C)** e **(D)**: ANOVA seguida por teste de Holm-Sidak. * $P < 0,05$.

Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina

Quanto ao tempo de permanência na área aberta, do mesmo modo, os grupos tratados mostraram valores menores do que o grupo E. Neste parâmetro também não se observou diferença até a 6ª semana de tratamento (Figura 4A). Já na 10ª semana, o grupo B ($48,2 \pm 37,7$ s) apresentou tempo de permanência significativamente menor do que o grupo E ($116,8 \pm 40,4$ s) ($P < 0,02$) (Figura 4B). Porém esta diferença não perdurou até o final da indução da cirrose. Na 12ª semana, o grupo C ($40,8 \pm 20,5$ s) apresentou valores menores do que os grupos B ($113,6 \pm 52,3$ s) e E ($P < 0,03$) (Figura 4C). Ao final do tratamento com TAA, além da diferença do grupo C ($79,4 \pm 31,1$ s) em relação ao E, foram observadas diferenças do grupo D ($54,6 \pm 33,9$ s) em relação aos grupos A ($105,4 \pm 32,9$ s), B ($116,4 \pm 53,6$ s) e E ($P < 0,002$) (Figura 4D).

Figura 4 - Tempo de permanência (s) nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado durante indução de cirrose. ANOVA seguida por teste de Holm-Sidak. * $P < 0,05$.

Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina

5.3 MACROSCOPIA

Os fígados coletados de todos os grupos que receberam TAA apresentaram nódulos regenerativos em sua superfície (Figura 5a, b). O grupo A apresentou a nodulação menos evidente dentre os grupos tratados, e houve maior ocorrência desses nódulos no lobo caudado. No grupo D (Figura 5c), assim como no A, não houve alterações macroscópicas expressivas; os fígados apresentavam superfície relativamente lisa comparados aos dos outros grupos. Já os grupos B e C, além da aparência mais nodular, apresentaram também pontos esbranquiçados espalhados pelo órgão e freqüentes lesões hemorrágicas (Figura 5d). Ao se cortar o fígado para a coleta dos fragmentos, notava-se uma textura granular do órgão.

Figura 5 - Fígados cirróticos de ratas após 14 semanas de tratamento com TAA. (a, b) grupo C (aumento de 10% a cada 24 dias) mostrando nódulos regenerativos na superfície do órgão; (c) grupo D (aumento de 15% a cada 24 dias), fígado sem nodulação evidente, porém com pontos esbranquiçados em sua superfície; (d) grupo B (aumento de 20% aos 48 dias) mostrando lesão hemorrágica, a qual foi observada em todos os grupos cirróticos. Barra: 1,5 cm (a, b, c), 1,0 cm (d)

5.4 GANHO DE PESO

Na primeira semana após o início do tratamento, os grupos apresentaram pesos muito próximos. Entretanto, no decorrer da indução nota-se que os grupos tratados com TAA mantiveram o IGP (índice de ganho de peso) quase constante ao longo das 14 semanas, ao passo que o IGP do grupo controle foi crescente durante todo o período (Figura 6).

A média de peso inicial dos animais do grupo controle foi de 206,5g, enquanto que a média inicial dos grupos tratados com TAA foi de 197,7g. Ao final das 14 semanas, a média de peso do grupo controle foi de 253,9g e a dos animais com cirrose, de 203,2g.

Figura 6 - Índice de ganho de peso dos grupos durante o período experimental.

Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina

A análise estatística do IGP foi feita entre todos os grupos na 1ª e na 14ª semana de tratamento. Nos grupos em que houve aumento de dose, essa análise foi feita na primeira ou na segunda semana após os aumentos, seguindo o cronograma do experimento, período em que os animais demonstram maior sensibilidade à droga.

Na 1ª semana de administração de TAA, os grupos A, C e D apresentaram queda significativa do IGP em relação ao grupo E. Nas semanas que sucederam os aumentos de dose, verificou-se que o IGP do grupo D foi o maior dentre os grupos comparados. Esse grupo foi

diferente do grupo C na 4ª e 11ª semanas, após o primeiro e o terceiro aumento de dose. Também houve diferença do grupo D em relação ao B na 11ª semana, após acréscimo de 20% na dose deste último, porém ambos foram semelhantes ao grupo C. Na 14ª semana o grupo B apresentou o menor IGP entre os grupos tratados, porém o teste estatístico apontou diferenças desse grupo apenas em relação a C e E. Já no grupo A, observou-se tendência de aumento do IGP a partir da 8ª semana (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação da média e desvio padrão do índice de ganho de peso (IGP= Pss / Pi) entre os grupos em cada semana, contada a partir da semana 0 – início do experimento – São Paulo – 2008

Grupos	A (n=19)	B (n=19)	C (n=30)	D (n=14)	E (n=12)
Semanas					
1	0,95 ± 0,03 a	0,98 ± 0,03 a, b	0,94 ± 0,03 a, c	0,96 ± 0,02 a	1 ± 0,01 b
2	0,97 ± 0,05	0,93 ± 0,03	0,95 ± 0,04	0,98 ± 0,02	1,05 ± 0,02
3	0,96 ± 0,06	0,94 ± 0,04	0,96 ± 0,05	1 ± 0,02	1,09 ± 0,03
4	0,97 ± 0,07	0,96 ± 0,04	0,98 ± 0,05 a (+ 10% TAA)	1 ± 0,03 b (+ 15% TAA)	1,1 ± 0,03
5	0,98 ± 0,06	0,96 ± 0,05	0,97 ± 0,05	0,98 ± 0,03	1,11 ± 0,03
6	1 ± 0,07	0,96 ± 0,04	0,98 ± 0,04	1 ± 0,03	1,15 ± 0,04
7	0,99 ± 0,06	0,97 ± 0,04	0,98 ± 0,04	1 ± 0,03	1,16 ± 0,04
8	1,01 ± 0,09	0,99 ± 0,04	0,99 ± 0,05	1 ± 0,03	1,18 ± 0,04
9	1,03 ± 0,07	0,97 ± 0,06 a (+ 20% TAA)	0,98 ± 0,05 a, b (+ 10% TAA)	1,02 ± 0,03 b (+ 15% TAA)	1,18 ± 0,06
10	1,01 ± 0,07	0,92 ± 0,05	1,01 ± 0,05	1,02 ± 0,04	1,2 ± 0,05
11	1,03 ± 0,06	0,97 ± 0,05	1 ± 0,06 a (+ 10% TAA)	1,03 ± 0,02 b (+ 15% TAA)	1,24 ± 0,07
12	1,01 ± 0,08	1,01 ± 0,04	0,98 ± 0,06	0,99 ± 0,03	1,21 ± 0,05
13	1,01 ± 0,08	0,99 ± 0,04	0,98 ± 0,06	1,03 ± 0,04	1,22 ± 0,06
14	1,04 ± 0,07 a	0,99 ± 0,05 a, b	1,05 ± 0,04 a, c	1,04 ± 0,03 a, b, c	1,23 ± 0,07

As comparações foram feitas apenas entre as médias das linhas destacadas. Nas semanas 4, 9 e 11 foram comparados somente os grupos que tiveram aumento de dose. As médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. ANOVA seguida por teste de Kruskal-Wallis foi realizada para as comparações nas semanas 1, 9 e 14; teste t de Student foi realizado para comparar os grupos C e D nas semanas 4 e 11 (P<0,05).

Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina

5.5 ÍNDICES RELATIVOS

O peso médio das carcaças de todos os grupos foi significativamente menor do que o grupo controle, cuja média foi 26,7% maior do que a dos animais com cirrose hepática. Verificou-se também diferença entre os grupos B e C, sendo que o grupo B apresentou o menor peso médio de carcaça entre os grupos tratados.

Quanto ao peso das vísceras, o grupo B apresentou o maior valor em relação a todos os outros, mas também o grupo C foi diferente do E. O peso do fígado foi semelhante, estatisticamente, entre os grupos submetidos a aumentos de dose. O mesmo foi verificado para o volume do fígado e para o índice hepato-corporal. Este índice, e os demais analisados, foram significativamente maiores nos grupos tratados do que no controle. O grupo B ainda apresentou valores maiores para os índices hepatossomático e víscero-somático do que os outros grupos que também receberam TAA (Tabela 2).

Tabela 2 – Média e desvio padrão de índices relativos à massa e volume em todos os grupos – São Paulo – 2008

	Grupo A (n=19)	Grupo B (n=19)	Grupo C (n=30)	Grupo D (n=14)	Grupo E (n=12)
#Carcaça (g)	165,1 ± 13,28 a	159,15 ± 11,4 a, b	168,8 ± 11,64 a, c	166,44 ± 6,56 a	208,87 ± 20,08
#Vísceras (g)	45,78 ± 3,77 a	49,82 ± 4,72	47,18 ± 5,00 a, b	45,27 ± 3,78 a	43,03 ± 4,04 a, c
*Fígado (g)	9,29 ± 1,15 a	10,43 ± 1,13 b	10,14 ± 1,43 a, b	9,91 ± 1,43 a, b	9,07 ± 1,47 a
*Volume Fígado (cm³)	8,58 ± 1,18 a	9,63 ± 1,01 b	9,36 ± 1,32 a, b	9,33 ± 1,34 a, b	8,5 ± 1,34 a
*Índice Hepato-corporal (%)	5,6 ± 0,9 a	6,6 ± 0,9 b	6,0 ± 0,9 a, b	5,9 ± 1,0 a, b	4,3 ± 0,6
#Índice Hepatossomático (%)	4,2 ± 0,4 a	4,8 ± 0,5 b	4,5 ± 0,5 c	4,4 ± 0,3 a, c	3,5 ± 0,4
#Índice Víscero-somático (%)	21,3 ± 2,2 a	23,3 ± 2,4	21,2 ± 2,0 a	21,4 ± 2,3 a	17,0 ± 1,2

As médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. #ANOVA seguida por teste de Holm-Sidak (P<0,001); *ANOVA seguida por teste de Kruskal-Wallis (P<0,003).

Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina

5.6 FUNÇÃO HEPÁTICA – COMPARAÇÕES INTRAGRUPOS

Os marcadores sanguíneos de lesão hepática foram comparados, no mesmo grupo, em diferentes fases da indução para que fossem avaliadas a evolução da doença e a resposta funcional do fígado às variações de dose.

5.6.1 Grupo A

Os animais desse grupo tiveram aumentos significantes nos níveis de ALT (40,12%), ALKP (30,21%) e TP (3,25%) (Tabela 3). Embora não houvesse diferença estatística, foi observado aumento do nível plasmático de AST e GGT, ambas importantes para a avaliação da função hepática.

Tabela 3 – Média e desvio padrão dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática no grupo A (14 semanas 200 mg TAA/kg) – São Paulo – 2008

	Inicial (n=10)	Final (n=10)
ALT	46,6 ± 5,89	65,3 ± 18,76
AST	69,8 ± 9,13 a	83,4 ± 18,97 a
ALB	1,83 ± 0,2 a	2,02 ± 0,19 a
ALKP	114,5 ± 22,58	149,1 ± 45,66
#GGT	0 ± 0 a	3,5 ± 5,58 a
#TBIL	0 ± 0 a	0,03 ± 0,06 a
TP	6,15 ± 0,22	6,35 ± 0,14
GLOB	4,3 ± 0,23 a	4,31 ± 0,26 a

As médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. Teste t de Student pareado; #teste de Wilcoxon (P<0,05).

ALT: alanina aminotransferase (U/L); AST: aspartato aminotransferase (U/L); ALB: albumina (g/dL); ALKP: fosfatase alcalina (U/L); GGT: gama-glutamyltranspeptidase (U/L); TBIL: bilirrubina total (mg/dL); TP: proteína total (g/dL); GLOB: globulina (g/dL)

Embora o teste estatístico empregado não tenha demonstrado diferença nos valores de GGT, é conveniente que seja ilustrada a sua distribuição, pois o aparecimento dessa enzima é fator importante na caracterização do quadro patológico (Figura 7). O gráfico box plot foi utilizado com a finalidade de representar mostrar a diferença entre os grupos de dados por constituir-se em uma representação independente da distribuição estatística.

Figura 7 - Box Plot dos valores de GGT do grupo A (14 semanas 200 mg/kg)

5.6.2 Grupo B

Ao final de 7 semanas, os níveis de ALB, GGT e TBIL não apresentaram alteração significativa (Tabela 4). Entretanto, a GGT, cuja presença não foi registrada antes de se iniciar o tratamento com TAA, manifestou-se nessa fase do experimento. Os valores dessa enzima são muito variáveis e sua dispersão foi representada por gráfico de box plot (Figura 8).

Após o aumento de 20% na dosagem TAA, todos os parâmetros tornaram-se estatisticamente diferentes, exceção feita à GLOB. A GGT apresentou aumento de 164,8% em relação aos 48 dias.

No final da indução desse grupo, as enzimas AST e ALKP apresentaram níveis plasmáticos menores do que aos 48 dias, mas permaneceram significativamente maiores em relação aos valores iniciais, assim como os outros marcadores de lesão hepática.

Tabela 4 – Média e desvio padrão dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática no grupo B (aumento de 20% aos 48 dias) – São Paulo – 2008

	Inicial (n=10)	48 dias (n=10)	Final (n=10)
ALT	45,2 ± 9,36	60,3 ± 8,08	71,1 ± 13,27
AST	71,2 ± 11,42	137,8 ± 24,81	105 ± 23,47
ALB	1,58 ± 0,18 a	1,64 ± 0,11 a	2,04 ± 0,32
ALKP	126,3 ± 16,46	287,5 ± 56,61	193,3 ± 33,05
#GGT	0 ± 0 a	5,4 ± 3,16 a	14,3 ± 10,53
#TBIL	0 ± 0	0 ± 0	0,08 ± 0,13
TP	5,5 ± 0,34	5,89 ± 0,26	6,31 ± 0,21
GLOB	3,93 ± 0,24	4,26 ± 0,20 a	4,27 ± 0,27 a

As médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. ANOVA de medidas repetidas seguida por teste de Tukey-Kramer; #ANOVA de medidas repetidas seguida por teste de Friedman ($P < 0,05$).

ALT: alanina aminotransferase (U/L); AST: aspartato aminotransferase (U/L); ALB: albumina (g/dL); ALKP: fosfatase alcalina (U/L); GGT: gama-glutamiltanspeptidase (U/L); TBIL: bilirrubina total (mg/dL); TP: proteína total (g/dL); GLOB: globulina (g/dL)

Figura 8 - Box Plot dos valores de GGT do grupo B (aumento de 20% aos 48 dias)

5.6.3 Grupo C

Aos 24 dias de tratamento, metade dos marcadores sanguíneos de lesão hepática avaliados não apresentou alterações significativas (ALT, ALB, GGT e TBIL). Após o primeiro aumento de dose (48 dias), a ALT apresentou aumento significativo em relação ao valor inicial. Nesse período foi observada redução significativa de TP em relação aos 24 dias. Até aos 72 dias (após o segundo aumento de dose) esses valores ainda se mantêm; há de se notar aumento considerável da ALKP. Porém, ao final do período experimental, observa-se a redução dos níveis plasmáticos de alguns marcadores (ALT, AST, ALKP) com AST apresentando valor próximo ao inicial. Os valores de ALB e TBIL não apresentaram diferença significativa ao longo da indução (Tabela 5).

A distribuição dos valores de GGT é mostrada na figura 9.

Tabela 5 – Média e desvio padrão dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática no grupo C (aumento de 10% a cada 24 dias) – São Paulo – 2008

	Inicial (n=10)	24 dias (n=10)	48 dias (n=10)	72 dias (n=10)	Final (n=10)
[#] ALT	48,2 ± 5,8 a	61,7 ± 11,56 a, b	86 ± 33,91 b	87 ± 53,08 b	73,3 ± 15,25 b
AST	95,4 ± 19,05 a	156,3 ± 52,22 b	160,4 ± 55,16 b	189 ± 79,55 b	97,9 ± 14,44 a
[#] ALB	1,8 ± 0,41 a	1,9 ± 0,24 a	1,49 ± 0,16 a, b	1,63 ± 0,14 a, b	2 ± 0,25 a
ALKP	126,7 ± 19,8	235,7 ± 35,6 a	232 ± 73,41 a	349 ± 85,87	179,1 ± 26,35
GGT	0 ± 0 a	1,5 ± 2,27 a	6 ± 6,66 a, b	9,1 ± 5,82 b	18,8 ± 17,26 b
[#] TBIL	0 ± 0 a	0,05 ± 0,07 a	0,03 ± 0,09 a	0,09 ± 0,14 a	0,02 ± 0,06 a
TP	5,9 ± 0,33 a	6,18 ± 0,34	5,43 ± 0,45	5,81 ± 0,19 a	6,45 ± 0,25
GLOB	4,07 ± 0,35 a	4,28 ± 0,22 b	3,95 ± 0,43 a	4,28 ± 0,17 a, b	4,47 ± 0,24 b

As médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. ANOVA de medidas repetidas seguida por teste de Holm-Sidak; [#] ANOVA de medidas repetidas seguida por teste de Friedman (P<0,001).

ALT: alanina aminotransferase (U/L); AST: aspartato aminotransferase (U/L); ALB: albumina (g/dL); ALKP: fosfatase alcalina (U/L); GGT: gama-glutamiltanspeptidase (U/L); TBIL: bilirrubina total (mg/dL); TP: proteína total (g/dL); GLOB: globulina (g/dL)

Figura 9 - Box Plot dos valores de GGT do grupo C (aumento de 10% a cada 24 dias)

5.6.4 Grupo D

Aos 24 dias de tratamento, apenas AST, TP e GLOB sofreram alterações significativas. Entretanto, após o primeiro aumento de dose (48 dias) apenas TBIL manteve valor semelhante ao inicial. Em relação aos 24 dias, a ALB apresentou aumento significativo.

Depois do segundo aumento de dose (72 dias), houve uma redução do nível plasmático de ALB, mas os demais parâmetros permaneceram significativamente alterados quando comparados às análises anteriores.

Ao final do experimento, alguns marcadores (ALT, AST e ALKP) apresentaram reduções significativas. Outros (TBIL, TP e GLOB), e inclusive ALKP, retornaram a valores semelhantes aos iniciais. Nesse período, a ALB mostrou-se aumentada novamente (Tabela 6).

Tabela 6 – Média e desvio padrão dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática no grupo D (aumento de 15% a cada 24 dias) – São Paulo – 2008

	Inicial (n=10)	24 dias (n=10)	48 dias (n=10)	72 dias (n=10)	Final (n=10)
ALT	47,1 ± 8,6 a	60,4 ± 9,45 a, b	71,9 ± 14,85 b	115,5 ± 33,91	75,9 ± 16,01 b
AST	67 ± 12,7	120,8 ± 17,9 a	141,5 ± 28 a, b	172,4 ± 52,9 b	106,8 ± 28,1 a
ALB	1,76 ± 0,22 a	1,65 ± 0,28 a	2,2 ± 0,24 b	1,75 ± 0,21 a	2,27 ± 0,2 b
#ALKP	156,9 ± 23,6 a	175,5 ± 31,2 a	179,7 ± 25,6 a, b	209,7 ± 43,3	142,4 ± 30,2 a, c
*GGT	0,2 ± 0,63 a	0,7 ± 1,63 a, b	7,5 ± 1,84 b, c	15,4 ± 7,35 c	10,3 ± 11,49 b, c
*TBIL	0,01 ± 0,03 a	0,01 ± 0,03 a	0,03 ± 0,04 a	0,32 ± 0,31 b	0,12 ± 0,07 a, b
#TP	5,94 ± 0,17 a	5,65 ± 0,33 b	5,6 ± 0,36 b	5,08 ± 0,25	5,9 ± 0,13 a
GLOB	4,15 ± 0,23 a	4 ± 0,35 b	3,41 ± 0,18 b	3,32 ± 0,23	3,66 ± 0,19 a

As médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. ANOVA de medidas repetidas seguida por teste de Tukey-Kramer; #ANOVA de medidas repetidas seguida por teste de Holm-Sidak; * ANOVA de medidas repetidas seguida por teste de Friedman ($P \leq 0,001$).

ALT: alanina aminotransferase (U/L); AST: aspartato aminotransferase (U/L); ALB: albumina (g/dL); ALKP: fosfatase alcalina (U/L); GGT: gama-glutamiltanspeptidase (U/L); TBIL: bilirrubina total (mg/dL); TP: proteína total (g/dL); GLOB: globulina (g/dL)

5.6.5 Grupo E

Os níveis de ALT, AST e GGT mantiveram-se estáveis durante todo o experimento. Os demais marcadores sanguíneos de lesão hepática apresentaram valores significativamente diferentes ao final do experimento, com decréscimo em ALKP e GLOB (Tabela 7).

Tabela 7 – Média e desvio padrão dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática no grupo E (14 semanas solução salina) – São Paulo – 2008

	Inicial (n=10)	Final (n=10)
#ALT	64,3 ± 10,24 a	69 ± 17,46 a
#AST	110 ± 24,01 a	121,6 ± 64,41 a
ALB	1,5 ± 0,16	2,79 ± 0,24
ALKP	185,5 ± 22,99	78,1 ± 6,64
GGT	0 ± 0	0 ± 0
TBIL	0 ± 0	0,16 ± 0,13
TP	5,91 ± 0,22	6,46 ± 0,32
GLOB	4,38 ± 0,16	3,66 ± 0,19

As médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. Teste t de Student pareado; #teste de Wilcoxon (P<0,01).

ALT: alanina aminotransferase (U/L); AST: aspartato aminotransferase (U/L); ALB: albumina (g/dL); ALKP: fosfatase alcalina (U/L); GGT: gama-glutamyltranspeptidase (U/L); TBIL: bilirrubina total (mg/dL); TP: proteína total (g/dL); GLOB: globulina (g/dL)

5.7 FUNÇÃO HEPÁTICA – COMPARAÇÕES INTERGRUPOS

Os marcadores sanguíneos de lesão hepática foram comparados entre os grupos no mesmo estágio da indução para que fossem avaliados os efeitos das diferentes dosagens de TAA sobre a função hepática.

5.7.1 Todos os Grupos: início

No início do experimento, os grupos que receberiam TAA apresentavam valores bastante homogêneos, com poucas diferenças significantes.

O grupo E apresentou valores altos de ALT, AST e ALKP, comparado aos outros grupos (Tabela 8). Contudo, esses valores estavam dentro de limites aceitáveis, considerando-se os valores de referência (Anexo A).

Tabela 8 – Comparações dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática entre todos os grupos no início do experimento – São Paulo – 2008

	Grupo A (n=10)	Grupo B (n=10)	Grupo C (n=10)	Grupo D (n=10)	Grupo E (n=10)
ALT	46,6 ± 5,89 a	45,2 ± 9,36 a	48,2 ± 5,8 a	47,1 ± 8,64 a	64,3 ± 10,24
AST	69,8 ± 9,13 a	71,2 ± 11,42 a	95,4 ± 19,05 b	67 ± 12,66 a	110 ± 24,01 b
#ALB	1,83 ± 0,2 a	1,58 ± 0,18 a, b	1,8 ± 0,41 a, b	1,76 ± 0,22 a, b	1,5 ± 0,16 b
ALKP	114,5 ± 22,58 a	126,3 ± 16,46 a	126,7 ± 19,8 a	156,9 ± 23,6	185,5 ± 22,99
#GGT	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0,2 ± 0,63 a	0 ± 0 a
#TBIL	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0,01 ± 0,03 a	0 ± 0 a
TP	6,15 ± 0,22 a	5,5 ± 0,34	5,9 ± 0,33 a	5,94 ± 0,17 a	5,91 ± 0,22 a
#GLOB	4,3 ± 0,23 a	3,93 ± 0,24 b	4,07 ± 0,35 a, b	4,15 ± 0,23 a, b	4,38 ± 0,16 a

As médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. ANOVA seguida por teste de Tukey-Kramer; #ANOVA seguida por teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

ALT: alanina aminotransferase (U/L); AST: aspartato aminotransferase (U/L); ALB: albumina (g/dL); ALKP: fosfatase alcalina (U/L); GGT: gama-glutamiltanspeptidase (U/L); TBIL: bilirrubina total (mg/dL); TP: proteína total (g/dL); GLOB: globulina (g/dL).

Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina

5.7.2 Grupos C e D: 24 dias

Embora diferenças significantes tenham sido observadas apenas nos níveis plasmáticos de ALB, ALKP, TP e GLOB, o grupo C apresentou todos os marcadores sanguíneos de lesão hepática aumentados, em relação ao grupo D, submetido ao mesmo tratamento – 24 dias 200 mg/kg (Tabela 9).

Tabela 9 – Comparações dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática entre os grupos C e D após 24 dias de tratamento com TAA – São Paulo – 2008

	Grupo C (n=10)	Grupo D (n=10)
ALT	61,7 ± 11,56 a	60,4 ± 9,45 a
AST	156,3 ± 52,22 a	120,8 ± 17,96 a
ALB	1,9 ± 0,24	1,65 ± 0,28
ALKP	235,7 ± 35,6	175,5 ± 31,2
#GGT	1,5 ± 2,27 a	0,7 ± 1,63 a
#TBIL	0,05 ± 0,07 a	0,01 ± 0,03 a
TP	6,18 ± 0,34	5,65 ± 0,33
GLOB	4,28 ± 0,22	4 ± 0,35

As médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. Teste t de Student; #teste U de Mann-Whitney (P<0,05).

ALT: alanina aminotransferase (U/L); AST: aspartato aminotransferase (U/L); ALB: albumina (g/dL); ALKP: fosfatase alcalina (U/L); GGT: gama-glutamiltanspeptidase (U/L); TBIL: bilirrubina total (mg/dL); TP: proteína total (g/dL); GLOB: globulina (g/dL).

Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias

5.7.3 Grupos B, C e D: 48 dias

Neste período, correspondente à metade do experimento, o grupo C, após o seu primeiro aumento de dose (10%) apresentou apenas 2 marcadores significativamente alterados (ALT e TP) em relação ao grupo B que ainda não passou por aumento de dose. O grupo D, cujo aumento foi de 15%, apresentou alterações significativas em ALB, GLOB e ALKP, esta última consideravelmente menor do que no grupo B.

Entre os grupos C e D, foram observadas diferenças significativas em ALB e GLOB (Tabela 10).

Tabela 10 – Comparações dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática entre os grupos B, C e D após 48 dias de tratamento com TAA – São Paulo – 2008

	Grupo B (n=10)	Grupo C (n=10)	Grupo D (n=10)
ALT	60,3 ± 8,08 a	86 ± 33,91 b	71,9 ± 14,85 a, b
AST	137,8 ± 24,81 a	160,4 ± 55,16 a	141,5 ± 28,04 a
ALB	1,64 ± 0,11 a	1,49 ± 0,16 a	2,2 ± 0,24
#ALKP	287,5 ± 56,61 a	232 ± 73,41 a, b	179,7 ± 25,58 b
#GGT	5,4 ± 3,16 a	6 ± 6,66 a	7,5 ± 1,84 a
#TBIL	0 ± 0 a	0,03 ± 0,09 a	0,03 ± 0,04 a
TP	5,89 ± 0,26 a	5,43 ± 0,45 b	5,6 ± 0,36 a, b
GLOB	4,26 ± 0,20 a	3,95 ± 0,43 a	3,41 ± 0,18

As médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. ANOVA seguida por teste de Tukey-Kramer; # ANOVA seguida por teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

ALT: alanina aminotransferase (U/L); AST: aspartato aminotransferase (U/L); ALB: albumina (g/dL); ALKP: fosfatase alcalina (U/L); GGT: gama-glutamiltanspeptidase (U/L); TBIL: bilirrubina total (mg/dL); TP: proteína total (g/dL); GLOB: globulina (g/dL).

Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias

5.7.4 Grupos C e D: 72 dias

Após o segundo aumento na dose dos grupos C (10%) e D (15%), o grupo C apresentou níveis plasmáticos de ALKP, TP e GLOB significativamente maiores do que o grupo D. Este grupo, por sua vez, apresentou os valores de ALT e GGT maiores do que o grupo C (Tabela 11).

Tabela 11 – Comparações dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática entre os grupos C e D após 72 dias de tratamento com TAA – São Paulo – 2008

	Grupo C (n=10)	Grupo D (n=10)
#ALT	87 ± 53,08	115,5 ± 33,91
AST	189 ± 79,55 a	172,4 ± 52,96 a
ALB	1,63 ± 0,14 a	1,75 ± 0,21 a
#ALKP	349 ± 85,87	209,7 ± 43,32
GGT	9,1 ± 5,82	15,4 ± 7,35
#TBIL	0,09 ± 0,14	0,32 ± 0,31
TP	5,81 ± 0,19	5,08 ± 0,25
GLOB	4,28 ± 0,17	3,32 ± 0,23

As médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. Teste t de Student; #teste U de Mann-Whitney (P<0,05).

ALT: alanina aminotransferase (U/L); AST: aspartato aminotransferase (U/L); ALB: albumina (g/dL); ALKP: fosfatase alcalina (U/L); GGT: gama-glutamyltranspeptidase (U/L); TBIL: bilirrubina total (mg/dL); TP: proteína total (g/dL); GLOB: globulina (g/dL).

Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias

5.7.5 Todos os Grupos: última semana do experimento

Ao final do experimento, os grupos que desenvolveram cirrose hepática apresentaram marcadores sanguíneos com valores semelhantes entre si. Apenas no grupo D observou-se diferença significativa em ALB, TP e GLOB. Os níveis plasmáticos de GGT foram significativamente maiores nos grupos em que houve aumento na dose de TAA (Tabela 12).

ALB, ALKP e GGT apresentaram diferenças significantes nos grupos tratados em relação ao grupo E (controle).

Tabela 12 – Comparações dos índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática entre todos os grupos após 14 semanas de tratamento – São Paulo – 2008

	Grupo A (n=10)	Grupo B (n=10)	Grupo C (n=10)	Grupo D (n=10)	Grupo E (n=10)
ALT	65,3 ± 18,76 a	71,1 ± 13,27 a	73,3 ± 15,25 a	75,9 ± 16,01 a	69 ± 17,46 a
AST	83,4 ± 18,97 a	105 ± 23,47 a	97,9 ± 14,44 a	106,8 ± 28,07 a	102,6 ± 24,41 a
#ALB	2,02 ± 0,19 a	2,04 ± 0,32 a	2 ± 0,25 a	2,27 ± 0,2	2,79 ± 0,24
ALKP	149,1 ± 45,66 a	193,3 ± 33,05 a	179,1 ± 26,35 a	142,4 ± 30,23 a	78,1 ± 6,64
GGT	3,5 ± 5,58 a	14,3 ± 10,53 a, b	18,8 ± 17,26 a, b	10,3 ± 11,49 a, b	0 ± 0
TBIL	0,03 ± 0,06 a	0,08 ± 0,13 a	0,02 ± 0,06 a, b	0,12 ± 0,07 a	0,16 ± 0,13 a, c
TP	6,35 ± 0,14 a	6,31 ± 0,21 a	6,45 ± 0,25 a	5,9 ± 0,13	6,46 ± 0,32 a
#GLOB	4,31 ± 0,26 a	4,27 ± 0,27 a	4,47 ± 0,24 a	3,66 ± 0,19 b	3,66 ± 0,19 b

As médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. ANOVA seguida por teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$); #ANOVA seguida por teste de Holm-Sidak ($P < 0,001$).

ALT: alanina aminotransferase (U/L); AST: aspartato aminotransferase (U/L); ALB: albumina (g/dL); ALKP: fosfatase alcalina (U/L); GGT: gama-glutamiltanspeptidase (U/L); TBIL: bilirrubina total (mg/dL); TP: proteína total (g/dL); GLOB: globulina (g/dL).

Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina

5.8 MORFOLOGIA

O grupo E (controle) apresentou a morfologia típica do tecido hepático: lóbulos formados por hepatócitos dispostos em fileiras orientadas radialmente e separadas por sinusóides confluintes para uma veia central. Os espaços porta puderam ser facilmente identificados contendo os vasos que compõem a tríade portal (vênula, arteríola e ducto biliar) (Figura 10).

Figura 10 - Fotomicrografias do tecido hepático de animais do Grupo E (14 semanas solução salina): **a)** fileiras de hepatócitos separadas por sinusóides (seta), confluintes para veias centrolobulares (asterisco). Coloração HE. Barra: 100 μ m; **b)** espaço porta composto pela tríade portal: ramo da veia porta (asterisco), ramo da artéria hepática (cabeça de seta) e ducto biliar (seta). Coloração PAS/Hematoxilina. Barra: 200 μ m

Conforme esperado, nos grupos tratados com TAA não foi observada essa mesma arquitetura: em todos os grupos experimentais o parênquima apresentou-se dividido por septos de tecido conjuntivo formando os nódulos característicos da cirrose. Os hepatócitos não formavam fileiras, mas se dispunham como uma massa celular homogênea não apresentando o aspecto esponjoso do fígado sadio. Os sinusóides não eram tão evidentes como no grupo controle, apresentando-se comprimidos pelos hepatócitos em regeneração e pelo tecido fibroso depositado (Figura 11). Veias centrolobulares tampouco foram observadas no interior da maioria desses nódulos.

Figura 11 - Fotomicrografias do tecido hepático de animais tratados com TAA: **a)** observar o parênquima tecidual dividido por septos (seta) e a ausência de sinusóides; **b)** nódulos regenerativos (asterisco) circundados por septos fibrosos (seta). Coloração HE. Barra: 200 μ m

O quadro cirrótico não se desenvolveu do mesmo modo em todos os grupos. No grupo A, a deposição de colágeno se deu na forma de septos fibrosos delgados que uniam os espaços porta. Os nódulos regenerativos eram grandes e, em sua maioria, incompletos. A arquitetura hepática não estava totalmente desarranjada sendo possível, ainda, identificar espaços porta pelo parênquima em estrutura lobular semelhante àquela observada no grupo controle. Entretanto, veias centrolobulares estavam ausentes (Figura 12).

Figura 12 - Fotomicrografias do tecido hepático de animais do Grupo A (14 semanas 200 mg/kg): **a)** septos fibrosos delgados (seta) circundando nódulo regenerativo incompleto (asterisco); **b)** arquitetura hepática parcialmente preservada com integridade de espaços porta (seta). Coloração Picrosírius. Barra: 200 μ m

O grupo B apresentou espessos septos unindo espaços porta e veias centrolobulares e emitindo prolongamentos pelo parênquima. Os septos fibrosos formaram nódulos ora incompletos ora bem delimitados. No espaço porta foi observada grande quantidade de colágeno. A estrutura lobular do tecido hepático não pôde ser identificada (Figura 13).

Figura 13 - Fotomicrografias do tecido hepático de animais do Grupo B (aumento de 20% aos 48 dias): **a)** septos fibrosos (seta) emitindo prolongamentos (cabeça de seta); **b)** nódulos regenerativos incompletos (asterisco); **c)** septos fibrosos espessos (seta) delimitando nódulos regenerativos completos; **d)** abundante deposição de colágeno no espaço porta (seta). Coloração Picrosirius. Barra: 200 µm

Septos muito largos, circundando lóbulos inteiros, foram observados no grupo C. Os nódulos regenerativos eram quase sempre completos e bem definidos, embora também tenha sido observada a presença de prolongamentos dos septos permeando o parênquima tecidual. Os espaços porta tornaram-se ampliados pela intensa deposição de colágeno, o qual formou grandes pontes unindo-os uns aos outros. A arquitetura hepática foi completamente distorcida (Figura 14).

Figura 14 - Fotomicrografias do tecido hepático de animais do Grupo C (aumento de 10% a cada 24 dias): **a)** septos fibrosos largos (seta) delimitando nódulo completo (asterisco); **b)** prolongamentos dos septos fibrosos (seta); **c)** septos fibrosos formando pontes (seta); **d)** espaços porta ampliados (asterisco) unidos por pontes de colágeno (seta). Coloração Picrosirius. Barra: 200 μ m

O grupo D apresentou longos septos que se insinuavam pelo tecido, mas nem sempre delimitavam nódulos. Esses septos eram, por vezes, tão espessos que formavam pontes entre espaços porta, assim como no grupo C, no entanto, dividindo amplas áreas livres de colágeno. Nesse grupo, a estrutura lobular também não pôde ser reconhecida, embora tenha sido possível encontrar espaços porta íntegros pelo parênquima (Figura 15).

Figura 15 - Fotomicrografias do tecido hepático de animais do Grupo D (aumento de 15% a cada 24 dias): **a)** septos fibrosos (seta) unindo espaços porta (cabeça de seta) sem delimitar nódulos; **b)** nódulos regenerativos grandes (asterisco); **c)** septos espessos formando pontes (seta); **d)** parênquima hepático pouco desarranjado com espaços porta (seta) íntegros. Coloração Picrosirius. Barra: 200 μ m

5.9 QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO

O colágeno foi mensurado nas objetivas de 20x e de 60x para quantificação das fibras interlobulares e intralobulares, respectivamente.

A quantidade de colágeno interlobular hepático foi significativamente maior em todos os grupos tratados em relação ao grupo E. Dentre esses grupos, houve diferença do grupo A em relação a B e C sendo a área maior nestes últimos. O grupo D não apresentou diferença em relação aos demais grupos com cirrose (Tabela 13).

Tabela 13 - Área ocupada pelo colágeno interlobular no fígado, mensurada em 250 campos de cada grupo tratado e 300 campos no grupo controle (valor de cada campo: $603126 \mu\text{m}^2$). São Paulo, 2008

	Grupo A (n=10)	Grupo B (n=10)	Grupo C (n=10)	Grupo D (n=10)	Grupo E (n=12)
Área em $\mu\text{m}^2 \cdot 10^6$	10,00 a	14,61 b	15,23 b	11,36 a, b	1,96
Porcentagem da área total*[#]	6,64	9,69	10,1	7,53	1,08

As médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. ANOVA seguida por teste de Tukey-Kramer ($P < 0,05$). *área total dos grupos tratados (250 campos) = $150,8 \cdot 10^6 \mu\text{m}^2$; [#]área total do grupo controle (300 campos) = $180,9 \cdot 10^6 \mu\text{m}^2$.

Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina

De fato e, conforme ilustrado na figura 16, a porcentagem de aumento de colágeno nos grupos com cirrose superou em mais de 500% os valores encontrados no grupo controle. Mais precisamente, esses aumentos foram: 510% (Grupo A); 745% (Grupo B); 777% (Grupo C); 579% (Grupo D), superiores à área de colágeno verificada no fígado dos animais não tratados.

Figura 16 - Porcentagem da área de colágeno no fígado em cada grupo. Objetiva de 20x; campo medido = $603126 \mu\text{m}^2$. * $P < 0,05$.

Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina

Quanto ao colágeno intralobular, foram verificados resultados inversos ao do colágeno interlobular hepático. Os grupos tratados com TAA apresentaram quantidade significativamente menor do que o grupo E. Entre esses grupos, houve diferença estatística nos valores do grupo D em relação aos outros, este apresentando área maior (Tabela 14).

Tabela 14 – Área ocupada pelo colágeno intralobular no fígado, mensurada em 500 campos de cada grupo tratado e 600 campos do grupo controle (valor do campo medido: $67014,2 \mu\text{m}^2$) – São Paulo – 2008

	Grupo A (n=10)	Grupo B (n=10)	Grupo C (n=10)	Grupo D (n=10)	Grupo E (n=12)
Área em $\mu\text{m}^2 \cdot 10^4$	2,25 a	2,3 a	1,98 a	3,53 b	10,04 c
Porcentagem da área total* [#]	0,067	0,069	0,059	0,105	0,25

As médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. ANOVA seguida por teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,01$). *área total dos grupos tratados (500 campos) = $3350,7 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$; [#]área total do grupo controle (600 campos) = $4020,9 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$.

Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina

De acordo com o ilustrado na figura 17, os grupos tratados tiveram áreas de colágeno intersticial mais de 60% inferiores aos valores encontrados no grupo controle. Mais precisamente, os valores foram: 77,9% (Grupo A); 77,34% (Grupo B); 80,6% (Grupo C); 65,1% (Grupo D), inferiores à área de colágeno intralobular verificada no fígado dos animais não tratados.

Figura 17 - Porcentagem da área de colágeno no fígado em cada grupo. Objetiva de 60x; campo medido = 67014,2 μm^2 . * $P < 0,05$.

Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina

A diferença entre os grupos tratados com TAA e o grupo controle é claramente verificada pelo ilustrado na figura 18. No grupo controle as fibras estão dispersas pelo parênquima, dispostas ao longo dos sinusóides, compondo a estrutura de sustentação do fígado.

Figura 18 - Fotomicrografias do tecido hepático: **a)** animal tratado com TAA; **b)** animal controle. Notar as fibras colágenas do parênquima hepático. Coloração Picrosirius. Barra: 50 μ m

5.10 HISTOPATOLOGIA

O exame histopatológico abrangeu 7 parâmetros. Foi avaliada a presença de nódulos regenerativos, fibrose, células ovais, inclusão nuclear, figuras de mitose, células binucleadas e hepatócitos encarcerados. Foram observadas diferenças estatísticas em 3 deles, os quais estão ilustrados na figura 19: fibrose (Figura 19a), células ovais (Figura 19b) e inclusão nuclear (Figura 19c).

Figura 19 - Fotomicrografias do tecido hepático de animais tratados com TAA: **a)** septos formados por fibras colágenas que caracterizam a fibrose (seta). Barra: 100 µm; **b)** presença de células ovais (cabeça de seta); **c)** inclusão nuclear (seta). Coloração HE. Barra: 30 µm (**b** e **c**)

A quantificação dos 7 parâmetros avaliados está especificada na tabela 15, onde pode-se observar que a intensidade da fibrose foi estatisticamente maior nos grupo B e C do que nos grupos A e D. A concentração de células ovais foi menor no grupo D do que nos demais grupos tratados e as inclusões nucleares foram observadas em quantidade maior nos grupos B e C do que em A e D, embora não tenha sido observada diferença estatística do grupo C em relação ao grupo D.

Tabela 15 – Comparação da média e desvio padrão dos escores dos parâmetros histopatológicos dos grupos tratados com TAA – São Paulo – 2008

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Nódulos regenerativos	1,93 ± 0,73 a	2,58 ± 0,51 a	2,4 ± 0,73 a	2,09 ± 0,7 a
Fibrose	2,14 ± 0,66 a	2,67 ± 0,49 b	2,59 ± 0,59 b	2,09 ± 0,7 a
Células ovais	2,21 ± 0,7 a, b	2,67 ± 0,49 b	2,59 ± 0,59 b	2,0 ± 0,77 a
Inclusão nuclear	1,57 ± 0,85 a	2,83 ± 0,39 b	2,5 ± 0,6 b, c	1,82 ± 0,75 a, c
Figuras de mitose	2,0 ± 0,68 a	2,08 ± 0,67 a	1,9 ± 0,61 a	2,18 ± 0,75 a
Células binucleadas	2,0 ± 0,68 a	1,58 ± 0,67 a	1,64 ± 0,58 a	2,0 ± 0,63 a
Hepatócito encarcerado	2,0 ± 0,88 a	2,42 ± 0,67 a	2,23 ± 0,75 a	2,0 ± 0,77 a

As médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. ANOVA seguida por teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias

A análise estatística não revelou diferenças entre os grupos na quantidade de nódulos regenerativos (P=0,067) e tampouco quanto à presença de figuras mitóticas (Figura 20a), células binucleadas (Figura 20b) ou hepatócitos encarcerados (Figura 20c). Todavia, tanto nódulos regenerativos quanto hepatócitos encarcerados tiveram valores maiores nos grupos B e C, o que foi observado na maioria dos parâmetros. Além disso, verifica-se pela figura 21 que o grupo B apresentou os maiores escores em 5 dos 7 parâmetros avaliados.

Figura 20 - Fotomicrografias do tecido hepático de animais tratados com TAA: **a)** figuras de mitose (seta); **b)** célula binucleada (seta), observar a degeneração de um dos núcleos; **c)** hepatócitos encarcerados por células ovais (asterisco). Coloração HE. Barra: 50 μ m (**a** e **b**), 30 μ m (**c**)

Figura 21 - Média dos escores para os parâmetros histopatológicos avaliados. *estatisticamente diferente do grupo A; # estatisticamente diferente do grupo D.

Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias

Outras lesões puderam ser identificadas e, embora não tenham aparecido em quantidade expressiva, são aspectos importantes na caracterização do quadro cirrótico.

A proliferação de ductos biliares foi uma lesão recorrente nos grupos tratados aparecendo em 15,8% dos animais do grupo A, 21,05% do grupo B, 26,7% do grupo C e 14,3% do grupo D (Figura 22).

Figura 22 - Porcentagem do número de animais que apresentaram proliferação de ductos biliares em cada grupo.

Grupo A: 14 semanas 200 mg/kg; Grupo B: aumento de 20% aos 48 dias; Grupo C: aumento de 10% a cada 24 dias; Grupo D: aumento de 15% a cada 24 dias; Grupo E: 14 semanas solução salina

A presença de hemossiderina ao longo dos septos fibrosos também foi uma característica considerável nos animais com cirrose (Figura 23a, b). A deposição desse pigmento ocorreu ao redor dos espaços porta e a sua identificação foi realizada pela coloração Azul da Prússia, a qual é específica para íons férricos (Fe^{3+}).

Figura 23 - Fotomicrografias do tecido hepático de animal tratado com TAA: presença de hemossiderina (seta) principalmente ao redor dos espaços porta. Coloração Azul da Prússia. Barra: 300 μm (a); 200 μm (b)

Nos animais tratados com TAA também pôde ser observada a presença de células inflamatórias tais como linfócitos, neutrófilos e plasmócitos, sendo que as primeiras foram as mais abundantes. Essas células eram escassas e de difícil identificação em meio à grande quantidade de células ovas (Figura 24a). Vale ressaltar também o aparecimento de lesões nucleares (Figura 24b), megalocitose (Figura 24c), balonização (Figura 24d) e corpos apoptóticos (Figura 24e, Figura 24f).

Figura 24 - Fotomicrografias do tecido hepático de animais tratados com TAA: **a)** células inflamatórias: neutrófilo (seta), plasmócitos (cabeça de seta amarela) e linfócitos (cabeça de seta verde); **b)** hepatócito com lesão nuclear (seta); **c)** megalcitos (seta), células inflamatórias: basófilo (seta azul), linfócito (seta verde), neutrófilo (seta amarela); **d)** hepatócitos balonizados (asterisco); **e)** corpo apoptótico (seta); **f)** fotomicrografia e em fluorescência, corpo apoptótico fluoresce devido à eosina (seta). Coloração HE. Barra: 30 μ m (**a** e **b**), 50 μ m (**c** e **d**), 200 μ m (**e** e **f**)

5.11 HISTOQUÍMICA

A reação PAS evidencia a presença de polissacarídeos e esta técnica permitiu-nos observar o glicogênio armazenado nos hepatócitos.

Nos animais do grupo E foi verificada menor positividade ao PAS, nas áreas periportais (zona 1 do ácino hepático). O glicogênio encontrou-se concentrado nas áreas centrolobulares (zona 3 do ácino hepático) (Figura 25a).

Por outro lado, os animais dos grupos com cirrose hepática apresentaram intensa positividade ao PAS e o glicogênio apresentou-se distribuído uniformemente pelo tecido (Figura 25b).

Figura 25 - Fotomicrografias do tecido hepático com marcação para glicogênio: **a)** fígado de animal do Grupo E (14 semanas solução salina), observar menor positividade nas regiões próximas aos espaços porta (cabeça de seta) do que nas regiões próximas às veias centrolobulares (seta); **b)** fígado de animal cirrótico com parênquima homogeneamente positivo. Coloração PAS/Hematoxilina. Barra: 300 µm

Em áreas de extensa proliferação de ductos biliares (Figura 26a) observou-se a presença de uma substância intensamente positiva ao PAS, que preenchia a luz destes canais (Figura 26b).

Figura 26 - Fotomicrografias do tecido hepático de animais tratados com TAA com região de extensa proliferação de ductos biliares (a) e presença de substância fortemente positiva ao PAS preenchendo o lúmen dos mesmos (seta) (b). Coloração: HE (a); PAS/Hematoxilina (b). Barra: 300 μ m

Nesses mesmos exemplares foi realizada a técnica da diastase associada ao PAS. Após a digestão do glicogênio pela amilase salivar, a substância permaneceu positiva ao PAS indicando tratar-se de um mucopolissacarídeo (Figura 27a, b).

Figura 27 - Fotomicrografias do tecido hepático com proliferação de ductos biliares antes e após digestão do glicogênio: a) substância verificada pela positividade ao PAS; b) mucopolissacarídeo identificado pela resistência à amilase salivar. Coloração Diastase/PAS/Hematoxilina. Barra: 100 μ m

Todavia, o PAS marca tanto mucopolissacarídeos ácidos quanto neutros e para diferenciar o tipo dessa substância foi empregada a técnica histoquímica de coloração pelo Azul de Alcian (pH 2,5). Por meio desta reação identificou-se que essa substância era um mucopolissacarídeo ácido (Figura 28).

Figura 28 - Fotomicrografia do tecido hepático com proliferação de ductos biliares e mucopolissacarídeo ácido (seta) produzido pelas células epiteliais desses ductos. Coloração Azul de Alcian/HE. Barra: 100 µm

5.12 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Todos os grupos tratados com TAA apresentaram áreas positivas à marcação anti-GST-P. Estas áreas, que representam lesões pré-neoplásicas, correspondem aos pontos esbranquiçados observados macroscopicamente (Figura 5c).

As lesões identificadas apresentaram-se com formato circular, circundadas (Figura 29a) ou não por septos fibrosos (Figura 29b). Elas foram mais freqüentes nos grupos C e D, com duas ou mais lesões por corte, nos exemplares examinados.

Figura 29 - Fotomicrografias do tecido hepático de animal tratado com TAA: **a)** regiões positivas para marcação imuno-histoquímica anti-GST-P identificando lesões pré-neoplásicas (setas); **b)** região de transição entre a lesão e o tecido adjacente. Coloração HE. Barra: 600 µm (**a**); 200 µm (**b**)

Em HE, as células que compõem essas áreas são discretamente maiores e intumescidas, apresentam citoplasma rarefeito e núcleos não íntegros, fortemente acidófilos, aparecem em maior quantidade (Figura 30a). Em PAS, essas células armazenam grande quantidade de glicogênio (Figura 30b).

Figura 30 - Fotomicrografias do tecido hepático de animais tratados com TAA apresentando lesões pré-neoplásicas ao centro: **a)** observar células maiores com citoplasma rarefeito e vários núcleos acidófilos e disformes (seta). Coloração HE. Barra: 200 µm; **b)** células pré-neoplásicas com maior quantidade de glicogênio. Coloração PAS/Hematoxilina. Barra: 300 µm

6 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Reprodutibilidade e homogeneidade são essenciais para o desenvolvimento de um modelo de cirrose hepática experimental. A baixa sensibilidade dos animais à TAA, indicada pela recuperação do peso após certo período de administração, e a função hepática pouco alterada, devido a adaptação ao tóxico, são as principais desvantagens do modelo. Os experimentos realizados na tentativa de compensar esses problemas sugerem aumentos na dosagem do tóxico em função do peso do animal, porém utilizam a via oral para administração (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002; LALEMAN et al., 2006). O modelo de indução de cirrose que foi adotado neste trabalho consistiu de aumentos progressivos nas doses de TAA, através de injeções intraperitoneais, buscando garantir o controle na administração da droga, a uniformidade e a eficiência dos resultados, na morfologia e na função hepática.

Durante a fase de indução, os grupos tratados com TAA apresentaram fraqueza, amarelamento da pelagem, queda de pêlos, piloereção e secreção porfirinêmica. Estas características são fortes indicadoras de estresse dos animais, causado em decorrência da injúria hepática instalada. O amarelamento da pelagem, assim como no caso da pele da espécie humana, está associado à icterícia causada pela cirrose quando acomete o sistema biliar. A secreção porfirinêmica é uma secreção avermelhada ou castanha, proveniente da excessiva secreção de porfirinas pela glândula de Harder, que se acumula nos olhos e no nariz do animal. Sua manifestação, conhecida como cromodacriorréia, ocorre em situações de estresse induzido por dor ou doença e é relatada em quadros de inflamação. A presença dessa secreção tem sido utilizada como indicador de doenças crônicas em animais de laboratório (BRISTOW; YOUNG, 1994; HARPER et al., 2001).

Macroscopicamente, a cirrose hepática foi desenvolvida em todos os grupos que receberam TAA. Dentre eles, fígados com nodulação mais evidente foram observados com maior frequência nos grupos B e C. Em todos os grupos tratados, o lobo caudado foi o mais afetado apresentando-se com muitos nódulos de diferentes tamanhos. No diagnóstico da cirrose hepática humana por imagens, este lobo aparece ampliado, embora sejam observadas também hipertrofia do lobo esquerdo e atrofia do lobo direito (SCHUPPAN; AFDHAL, 2008).

As lesões hemorrágicas presentes nos fígados não demonstraram nenhum padrão de distribuição. Foram observadas lesões de várias dimensões e em vários locais do órgão. Elas

são similares ao que se descreve como hemangioma hepático, um tumor benigno dos vasos sanguíneos. No caso da cirrose, o processo de reparo tecidual inclui angiogênese (FRIEDMAN, 2008a) e capilarização dos sinusóides (BRUCK et al., 2007), o que poderia levar a uma displasia desses vasos. Porém, a explicação mais plausível para o aparecimento dessas lesões é um possível aumento da pressão desses capilares, em consequência da hipertensão portal, uma das principais características da cirrose. O aumento da resistência vascular intrahepática é documentado na cirrose induzida por TAA (LALEMAN et al., 2006). O acúmulo de colágeno, principalmente em torno da veia centrolobular, impede a dilatação do vaso, prejudicando a circulação sangüínea e o retorno venoso adequado. Isto, possivelmente, dificulta e retarda a circulação venosa em algumas regiões do fígado.

Além das lesões hemorrágicas, pontos esbranquiçados também foram observados na superfície dos fígados cirróticos. Esses pontos são semelhantes às lesões macroscópicas descritas como lesões pré-neoplásicas em forma de nódulos de hepatócitos, em modelo de hepatocarcinogênese (KUROIWA-TRZMIELINA, 2007) e como colangiocarcinoma (YEH et al., 2004). No presente estudo, tanto lesões pré-neoplásicas como displasia de ductos biliares foram observadas no exame histopatológico, todavia não foi feita uma investigação mais acurada para se determinar a natureza das lesões macroscópicas.

Na análise do índice de ganho de peso (IGP) dos grupos, verificou-se que aqueles que receberam TAA mantiveram valores semelhantes, sempre abaixo do IGP do grupo controle, mostrando que a droga exerceu um efeito negativo sobre o ganho de peso dos animais. Entretanto, o grupo A apresentou aumento do IGP a partir da sétima semana, o que já foi relatado por outros pesquisadores (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002; GUERRA, 2006), revelando a adaptação dos animais à dosagem contínua de TAA.

O grupo D (aumento de 15% a cada 24 dias) apresentou IGP maior, ao longo da indução, do que os grupos B (aumento de 20% aos 48 dias) e C (aumento de 10% a cada 24 dias). Contudo, no grupo D, a porcentagem de óbitos foi de 44%, considerada muito alta em relação aos demais. Este resultado sugere que o aumento de 15% elimina os animais mais sensíveis à droga e apenas os que são resistentes sobrevivem ao tratamento elevando a média do IGP, o que não é desejável neste modelo. No grupo C, mesmo os animais sensíveis tendem a sobreviver, apresentando mortalidade de 14,3%, e proporcionando maior rendimento no processo de indução do quadro cirrótico. Ainda assim, a mortalidade no grupo C foi maior do que no grupo B (5%). Isto pode ser explicado pelo fato de que alguns animais mais sensíveis à droga também foram eliminados no grupo C, pois os aumentos na dosagem acontecem em intervalos relativamente curtos e a injúria constante pode levar a morte por falha hepática.

Após a última semana da fase de indução, o IGP dos grupos tratados com TAA aumentou consideravelmente. No dia da eutanásia, todos os grupos apresentaram pesos próximos ao do grupo controle. Isto mostra que, de fato, os animais se recuperam rapidamente depois de cessada a administração do tóxico (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002).

Os parâmetros relativos ao peso e volume do fígado foram estatisticamente diferentes no grupo B em relação aos grupos A e controle, mas não o foi em relação aos grupos C e D, os quais também passaram por aumento de dose. Assim, percebe-se que os eventos decorrentes do processo patológico (fibrose, regeneração ou proliferação celular) que ocorrem sob dose constante de TAA não são suficientes para causar alterações de massa e volume do órgão. Em relação ao peso da carcaça, todos os grupos tratados com TAA foram diferentes do grupo controle, conforme observado também pelo IGP. Esses valores demonstram que, conforme o esperado, os animais sadios ganham peso com maior facilidade do que aqueles que têm o fígado cirrótico e, portanto, funcionalmente afetado. O menor ganho de peso, provavelmente, está relacionado à deficiência na metabolização e utilização dos nutrientes (FONTANA et al., 1996). Quanto ao peso das vísceras, o grupo B apresentou o maior valor entre todos os outros e, juntamente com o grupo C, foram estatisticamente diferentes do grupo controle. O incremento no peso das vísceras pode ser devido ao aumento da massa hepática observada nos grupos tratados. A maior proporção do fígado nos animais com cirrose relaciona-se com o desenvolvimento de processos inflamatórios decorrentes da droga administrada. O estresse hepatocelular induzido por hepatotoxinas leva a ativação dos macrófagos residentes no fígado e à liberação de quimiocinas (RAMADORI; SAILE, 2004). Além disso, os hepatócitos em regeneração, a proliferação dos miofibroblastos, a deposição de matriz extracelular, a proliferação de células ovas e de ductos biliares, são todos fatores que juntos contribuem para o aumento da proporção hepática.

Quanto à análise bioquímica da função hepática, as transaminases ALT e AST encontram-se aumentadas em caso de enfermidades hepáticas, sendo que a ALT é mais específica do que a AST, a qual pode ser decorrente de injúria em outros órgãos. GGT e ALKP são enzimas que indicam lesão do sistema biliar; como a ALKP é encontrada também em outros órgãos, a GGT serve como prova complementar (KAPLOWITZ; EBERLE; YAMADA, 1982). A ALB e a GLOB, que juntas compõem a TP encontram-se reduzidas em caso de lesão hepática devido ao aumento da permeabilidade capilar e à diminuição da produção hepática (BANKS, 1992; SCHUPPAN; AFDHAL, 2008).

Nos resultados da bioquímica sanguínea, o grupo A (dose constante) apresentou aumentos significativos nos níveis plasmáticos de ALT, ALKP, GGT e TP; apesar de não

significantes, a AST e a ALB também apresentaram níveis aumentados. Esses resultados indicam que a dose constante provoca morte de hepatócitos e acomete o sistema biliar. Todavia, o aumento da TP, decorrente do incremento na fração de ALB, mostra que a síntese protéica não foi prejudicada. Nesse modelo de indução, é provável que o processo de reparo tecidual, ou seja, a regeneração celular, compense a agressão provocada pelo agente hepatotóxico e permite que algumas funções básicas ainda sejam mantidas.

No grupo B, o período de 48 dias de administração de TAA causou aumento nos valores de todos os marcadores avaliados, exceto TBIL, que permaneceu constante, e ALB, que apresentou discreto aumento. Nesse grupo, o aumento de TP foi devido ao aumento no nível plasmático de GLOB. Infelizmente, não é possível saber se houve aumento de α , β ou γ -globulinas. Sabe-se que há aumento de α -GLOB na doença hepática associada a infecções (OLSSON; REHNSTRÖM, 1966) e de γ -GLOB, por estar envolvida na resposta imune. No presente estudo, o aumento de GLOB pode ser influenciado pelo processo inflamatório decorrente da injúria hepática. Ao final da indução, após o aumento de 20% na dose de TAA, todos os marcadores apresentaram-se aumentados em relação ao início do experimento e somente a GLOB permaneceu constante, quando comparada ao período anterior ao aumento de dose (primeiros 48 dias). O aumento da TP, no final da indução da cirrose, se deu em função do aumento da ALB, assim como no grupo A, sugerindo restauração dessa função hepática. A GGT apresentou um aumento de 164%, indicando grave lesão do sistema biliar. Alguns marcadores, apesar de aumentados em relação ao início, tiveram seus valores reduzidos em relação aos 48 dias de indução. Este fato será discutido posteriormente.

O grupo C foi avaliado em 5 momentos, ao longo do experimento. Após 24 dias de indução, houve aumento significativo de AST, ALKP e TP. Nesta fase mais inicial da indução, pode-se verificar que o sistema biliar é o primeiro a manifestar sinais de lesão com significativo aumento de AKLP e discreto aumento de GGT e TBIL. Como a AST não é hepato-específica e a ALT não aumentou significativamente, é de se supor que o fígado responde ativamente nessa fase, regenerando com eficiência. Aos 48 dias, após o primeiro aumento de dose, a TP diminui, com redução dos seus dois componentes (ALB e GLOB). Isto mostra que o aumento de 10% na dose de TAA prejudica a síntese protéica no fígado, pois se constitui num reforço ainda na fase aguda da injúria. Esta perda de função, provavelmente, se deu pela morte de hepatócitos, fato evidenciado pelo aumento de ALT. Aos 72 dias, após o segundo aumento de 10%, é observado um forte aumento de ALKP acompanhado por pequenos incrementos nos valores de GGT e TBIL, refletindo uma injúria progressiva ao

sistema biliar. No grupo C, assim como no B, o final da indução é marcado pela redução do nível plasmático de alguns marcadores.

Os animais do grupo D, desde o início, não apresentaram a maioria das alterações esperadas para o tratamento. Aos 24 dias, apenas a AST e a TP apresentaram alterações típicas de doença hepática. Após o primeiro aumento de 15% (48 dias), os marcadores tornaram-se diferentes dos valores iniciais, mas permaneceram similares aos verificados nos 24 dias. A avaliação bioquímica foi mais satisfatória após o segundo aumento de dose (72 dias) com alterações significativas e típicas do quadro cirrótico. Ao final da indução, também esse grupo apresentou uma reversão dos valores bioquímicos, observada inclusive na GGT, sendo o único grupo a apresentar redução desse marcador. Como já foi dito quando abordamos o IGP dos animais ao longo do experimento, provavelmente o aumento de 15% tenha selecionado os animais mais resistentes do grupo. A função hepática pouco alterada até a metade do período experimental talvez se deva ao fato de que apenas esses animais resistentes foram analisados, já que os testes foram realizados somente com animais que permaneceram até o final do experimento e que foram submetidos às 5 coletas sanguíneas para fazer o acompanhamento.

No grupo E (controle), alguns marcadores foram diferentes nos valores iniciais e finais. A ALKP e a GLOB apresentaram níveis plasmáticos significativamente maiores no início do experimento do que ao final. Considerando-se que a ALKP não é hepato-específica e que não foi registrada a presença de GGT nos animais desse grupo, poderia estar ocorrendo algum processo inflamatório nestes animais, de origem não hepática. Essa hipótese é assumida em razão do simultâneo aumento de GLOB, tendo em vista que a classe γ dessas proteínas participam da resposta imune, e que a ALKP pode ser encontrada também nos leucócitos (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005). No final do experimento, a ALKP foi reduzida em mais de 50% e a GLOB também sofreu significativa redução. Entretanto, os níveis plasmáticos de TP aumentaram devido a um incremento de 86% da ALB o que, neste caso, representa uma evidência de bom funcionamento hepático. Esses resultados vêm afirmar que as condições ambientais a que todos os animais estiveram submetidos – alimentação, tratamento, manipulação e aclimação – são adequadas para manutenção do fígado sadio.

No início do período experimental, todos os grupos apresentaram valores dos marcadores sanguíneos de lesão hepática relativamente homogêneos, indicando o estado saudável dos animais utilizados no experimento, no que se refere ao funcionamento adequado do fígado.

A análise bioquímica dos grupos C e D, aos 24 dias, revelou que o grupo D, de fato, respondeu menos à injúria hepática, reafirmando a resistência desses animais ao tóxico. Aos 48 dias, ao compararmos os grupos B, C e D, verifica-se que o aumento de 10% do grupo C causou um dano hepático mais uniforme do que a dose constante do grupo B e do que o aumento de 15% do grupo D, com transaminases mais elevadas e diminuição da TP. Os animais que sobreviveram aos aumentos de 15% apresentaram lesão hepática mais acentuada aos 72 dias (após o segundo aumento de dose) com alterações significativas dos marcadores mais específicos de lesão hepática do que aqueles com aumento de 10%.

Ao término do experimento, observamos uma redução nos níveis plasmáticos das transaminases, de tal forma que não apresentaram diferença em relação ao grupo controle. Porém, ALKP e GGT ainda permaneceram diferentes. De acordo com esses resultados, a cirrose desenvolvida afeta sobremaneira o sistema biliar, visto que todos os grupos apresentaram esses parâmetros aumentados. A lesão biliar causada pela TAA mostrou-se estável e dependente da dose, pois os níveis de GGT foram menores sob dose constante e maiores sob aumento progressivo de 10%. Embora dependente da dose, a GGT não foi maior no grupo D devido à resistência dos animais, fato já comentado. De modo geral, os índices sanguíneos dos marcadores de lesão hepática foram muito similares entre os grupos B e C, neste período.

Ainda sobre o quadro bioquímico, e conforme já chamada atenção, nos grupos em que mais de duas coletas sanguíneas foram realizadas, foi possível observar que alguns parâmetros retornaram a valores próximos aos iniciais, no final do experimento, fazendo com que os grupos não apresentassem diferenças marcantes. Tal fato pode ser explicado pelo período de repouso (10 dias) a que os animais foram submetidos antes da eutanásia, em que foi cessada a administração da droga. A análise do IGP também revela a rápida recuperação dos animais. Esta reversão dos marcadores sanguíneos de lesão hepática confirma que os efeitos de hepatotoxinas podem ser minimizados suspendendo a administração da droga (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002), provavelmente por cessar a morte de hepatócitos. No entanto, o período de repouso é necessário porque, nos experimentos em que se testam substâncias que podem alterar ou reduzir o quadro cirrótico, deve haver um prazo mínimo para que o animal elimine de seu organismo os resquícios da substância que causa a cirrose e não haja influência dos efeitos agudos da droga.

Embora o quadro bioquímico tenha apresentado evidências de recuperação da função hepática, o estudo morfológico revelou o desenvolvimento de um estágio avançado de cirrose. Os grupos tratados com TAA apresentaram desarranjo da arquitetura lobular hepática com o

desenvolvimento de septos fibrosos e nódulos regenerativos, proliferação de células ovas e de ductos biliares. A cirrose desenvolveu-se mais intensamente nos grupos B e C. Ao que parece, as doses de TAA administradas nesses grupos proporcionam uma injúria continuada que age como estímulo ao processo regenerativo e de reparo tecidual, levando ao maior acúmulo de tecido cicatricial.

A proporção volumétrica do colágeno interlobular hepático dos grupos tratados com TAA foi pelo menos 500% superior à do grupo controle. Este resultado sugere que mesmo o grupo A, no qual a cirrose é mais branda, é um modelo suficientemente satisfatório para trabalhos em que a fibrose seja o principal alvo de estudo. As maiores quantidades de colágeno foram observadas nos grupos B e C. O grupo D não apresentou diferença estatística em relação a nenhum dos grupos tratados, mas o seu valor foi bastante próximo ao do grupo A. Como já inferido, o aumento maior na dosagem de TAA desse grupo provocou a morte dos animais mais sensíveis e somente os mais resistentes sobreviveram até o final do experimento, não apresentando bom desenvolvimento do quadro patológico.

Na proporção de colágeno intralobular, observou-se que os animais dos grupos tratados com TAA apresentaram valores muito menores do que os do grupo controle. De fato, nos animais submetidos ao modelo de cirrose não foram observadas fibras colágenas espalhadas pelo parênquima, ao longo dos sinusóides, como no grupo controle. A pequena quantidade de fibras presente nos animais com cirrose encontrava-se, muitas vezes, organizada em pequenos e delgados septos ou como vasos sanguíneos muito pequenos. De modo geral, havia pouco colágeno permeando a densa massa celular que comprimia os sinusóides. Uma possível explicação para esse fato seria que o parênquima que compõem os nódulos regenerativos é formado por hepatócitos provenientes do processo de regeneração e pobre em outros tipos celulares que, mesmo presentes, não seriam capazes de desempenhar suas funções com a mesma eficiência, dado o estado funcional prejudicado do órgão. A regeneração ocorre nas células parenquimais, num processo de hiperplasia compensatória, que restitui o mesmo tipo de tecido lesado (DAGLI; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, 2007). Nesse processo, haveria uma restauração da massa hepática, em busca do funcionamento adequado do fígado, mais rápida ou urgente do que a reconstrução do arcabouço estrutural do órgão, composto pelas fibras de sustentação. Dentre os grupos tratados, o grupo D apresentou uma proporção maior de colágeno intralobular, mostrando a reestruturação mais eficiente do fígado nesse grupo, apesar do maior aumento de dose.

A cirrose desenvolvida com o modelo empregado neste estudo foi caracterizada por grave acometimento do sistema biliar, já verificado pela análise bioquímica dos marcadores

de lesão hepática. Níveis elevados de GGT foram observados desde o princípio da indução. É bem documentado que a administração de TAA por 14 semanas, via oral, promove intensa proliferação de ductos biliares e colangiocarcinoma (AL BADER et al., 2000). O tratamento prolongado com esta droga leva à displasia do epitélio biliar com produção de mucinas similarmente ao que é observado em colangiocarcinomas humanos (YEH et al., 2004; ZEN et al., 2006). A produção de mucinas pelo epitélio biliar pode estar relacionada ao fato de que as células epiteliais detêm fenótipos gástrico e intestinal (AISHIMA et al., 2008), destacando o padrão glandular de organização dessas estruturas (RIO TINTO et al., 2003). No presente estudo, grandes áreas de proliferação de ductos contendo mucopolissacarídeos ácidos, correspondem às características descritas para colangiocarcinomas, que geralmente acompanham a cirrose, e apontam para o potencial carcinogênico da TAA.

Outro fato que vem confirmar o estágio avançado do quadro cirrótico e a ação carcinogênica da droga, alcançados por esse modelo de indução, é o aparecimento de lesões pré-neoplásicas. Essas lesões foram identificadas pela imuno-histoquímica anti-GST-P (glutathione S-transferase forma placentar). A GST-P, assim como a GGT, tem sua expressão aumentada em focos e nódulos de hepatócitos, em modelos de hepatocarcinogênese (WOOD; KORKOLA; ARCHER, 2002). Cabe lembrar que a GST-P é considerada um marcador para células pré-neoplásicas, pois apresenta baixa atividade em tecidos normais ou em regeneração (SATO et al., 1985). Nesses casos, a concentração de GSTs é suficiente para promover a proteção da célula contra substâncias nocivas provenientes dos alimentos ou subprodutos do próprio metabolismo. Todavia, essas enzimas encontram-se aumentadas frente à injúria hepática, participando da fase II do processo de detoxificação (SHEEHAN et al., 2001).

Sabe-se que a TAA é ativada pela ação catalítica do sistema enzimático citocromo P-450, que faz a oxidação dos compostos. O estímulo constante provocado por essa substância, aliado à toxicidade dos seus metabólitos ativados na fase I, leva a modificações bioquímicas e moleculares nas células. Essas modificações, que incluem dano ao DNA e possíveis mutações, quando irreversíveis promovem a iniciação de algumas células (PITOT, 2001). A neoplasia começa a se desenvolver quando da ocorrência de um ciclo de proliferação celular, o qual fixará a mutação (FARBER; SARMA, 1987). A segunda etapa da carcinogênese – a promoção – é caracterizada pela proliferação seletiva de hepatócitos já iniciados, considerados pré-neoplásicos, frente à manutenção do estímulo. Assim, as lesões pré-neoplásicas apresentam expressão alterada de GST-P no citosol, região celular onde é sintetizada (FERNANDEZ-CHECA; KAPLOWITZ, 2005). A TAA provoca o aumento da atividade da GST-P, devido à ação citotóxica dos seus metabólitos, em modelo de

administração a longo prazo. A administração de determinados carcinogênicos, a curto prazo, não é capaz de induzir a atividade dessa enzima (SATO et al., 1985).

A presença de GST-P, identificada pela imuno-histoquímica, representa que a TAA pode ter um efeito carcinogênico por provocar a iniciação de hepatócitos. A sua administração a longo prazo contribui para a fase de promoção da hepatocarcinogênese, perpetuando as lesões. A fase final – progressão – não foi observada neste estudo, dado que as lesões não apresentaram característica invasiva ou de crescimento autônomo.

Em diversos processos patológicos, a degradação de glicogênio é deprimida, resultando em acúmulos intracelulares anormais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). As lesões pré-neoplásicas apresentaram grande acúmulo de glicogênio quando coradas por PAS. A degradação prejudicada é observada pela distribuição homogênea desse polissacarídeo nos fígados cirróticos, ao passo que no órgão sadio há maior acúmulo em torno da veia centrolobular. Isto, talvez, se deva ao fato de que as alterações vasculares prejudiquem a circulação do sangue pelo fígado e, conseqüentemente, a captação do glicogênio armazenado.

Outro aspecto importante relacionado à extensa proliferação ductular e às lesões pré-neoplásicas observadas nas amostras, é a grande quantidade de células ovais presentes nos animais com cirrose, tanto nas áreas de proliferação de ductos quanto ao longo dos septos fibrosos. Particularmente quando a cirrose está presente, há uma íntima associação entre a proliferação de células ovais e o aumento do risco de desenvolvimento de hepatocarcinoma (LOWES et al., 1999). Em humanos, em casos de hepatites crônicas, o número de células ovais está diretamente relacionado ao grau da doença e pode indicar o futuro desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (TSAMANDAS et al., 2007).

As células ovais podem formar estruturas ductulares (LOWES et al., 1999). Estas células têm similaridades com os hepatócitos e com as células dos ductos biliares e aparecem quando a regeneração de hepatócitos maduros é suprimida. As células ovais proliferam à medida que a fibrose avança. Durante o estabelecimento da cirrose, a replicação dos hepatócitos maduros é prejudicada e isto leva à ativação das células ovais (TSAMANDAS et al., 2007). Desse modo, os hepatócitos podem não responder adequada ou suficientemente ao processo de regeneração que se estabelece face à injúria aplicada ao órgão, e a ativação das células ovais seria um evento auxiliar na manutenção e regeneração do tecido hepático. Foi verificado que as células ovais estão associadas ao tecido fibroso do fígado, proliferando ao longo dos septos que circundam os nódulos regenerativos. Esta observação é pertinente dado que as células ovais se desenvolvem nas áreas periportais e os septos se constituem em extensões dessas áreas.

Em modelos animais, a proliferação de células ovas está associada à presença de células inflamatórias no fígado. Quando colocadas em cultura, as células ovas de animais submetidos a modelos de cirrose se deterioram rapidamente, sugerindo que fatores exógenos sejam fundamentais para sua manutenção. Assim, citocinas ou outros fatores produzidos pelas células associadas a fibrogênese, como as células estreladas e células de Kupffer, podem ser responsáveis por estimular a proliferação e a migração de células ovas (TSAMANDAS et al., 2007). Esta explicação é plausível neste estudo, visto que células inflamatórias puderam ser vistas entre as células ovas, embora em quantidade muito pequena. Conquanto a maioria dos estudos que envolvem algum grau de fibrose sempre descreva a infiltração de células inflamatórias como característica marcante, esse evento não é indispensável: doenças metabólicas, como a hemocromatose, são notáveis pela ausência de infiltrado inflamatório, ainda que possam culminar em cirrose e risco de carcinoma hepatocelular (FRIEDMAN, 2008a).

Nas observações realizadas, as células ovas foram encontradas aprisionando hepatócitos individuais, em regiões de necrose em saca bocado, e isto se deu com tal frequência que lhe permitiu ser incorporado aos parâmetros histopatológicos avaliados, ao qual convencionou-se chamar de hepatócito encarcerado. A presença das células ovas foi significativamente maior nos grupos B e C, assim como a proliferação de ductos biliares e a ocorrência dos hepatócitos encarcerados, embora nos dois últimos não tenha havido diferença estatística.

As outras lesões identificadas, porém menos significativas, também merecem destaque. As figuras de mitose apareceram em quantidades similares em todos os grupos tratados, denotando a constante tentativa de recuperação do tecido hepático, independentemente do grau da injúria. As figuras mitóticas eram, aparentemente, normais e não foram relacionadas a eventos carcinogênicos. A ocorrência de lesões nucleares indica degeneração do material genético e, aliadas a megalocitose, balonização e apoptose de hepatócitos, demonstram “sofrimento” celular em virtude da agressão química.

A ocorrência de megalocitose está relacionada com a presença de hepatócitos com núcleos poliplóides. Estas células são caracterizadas pelo seu tamanho maior, que é proporcional à ploidia (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O processo de poliploidização dos hepatócitos é considerado um mecanismo de adaptação evolutiva que reflete um grau de diferenciação irreversível da célula hepática. Esse mecanismo é adotado a fim de diminuir o alto risco de dano genômico a que o hepatócito está exposto (TORRES et al., 1999). Segundo estudos, no fígado do rato adulto normal, apenas 19,6% dos hepatócitos são diplóides (2n). A

maioria das células (75,1%) são tetraplóides (4n) e uma pequena parcela (5,3%) é constituída por células octaplóides (8n). Estas últimas apresentam um estado de diferenciação terminal sendo, por conseguinte, senescentes (GANDILLET et al., 2003).

Portanto, a existência de tipos celulares poliplóides no fígado normal não é um evento raro. No fígado cirrótico, entretanto, essa presença torna-se mais marcante por se destacar contra o fundo de células diplóides, que aparecem em maior quantidade. Segundo Torres et al. (1999), no processo de regeneração há uma expansão da população de células diplóides, o que é lógico considerando-se que a ploidia maior significa maior estado de conservação da célula. Assim, hepatócitos com núcleos pequenos passam a ser a maioria no fígado em regeneração. As células grandes observadas, e classificadas como megalocitose, provavelmente são hepatócitos octaplóides que não participam da regeneração. Dessa forma, a indentificação de megalocitose é um indício do processo regenerativo em resposta à injúria infligida.

A presença de hemossiderina foi notável em todos os animais dos grupos tratados com TAA. A deposição deste pigmento ocorre pela sobrecarga de ferro decorrente da sua absorção intestinal ou da destruição excessiva de hemácias. Normalmente o ferro é acumulado em proteínas (ferritina), mas, nos casos citados, as moléculas de ferritina tornam-se saturadas e formam depósitos granulares de hemossiderina. Neste estudo, a quebra de hemácias é a condição mais provável, visto que lesões hemorrágicas foram observadas macroscopicamente no fígado de vários animais.

O acúmulo de ferro no fígado tem sido descrito no citoplasma de células de Kupffer, em cães acometidos por hepatite e carcinoma hepatocelular, principalmente nas áreas periportais (FUENTEALBA et al., 1997; SCHULTHEISS et al., 2002). A deposição de hemossiderina pode ser observada também em hepatócitos, células endoteliais da zona 1 e no tecido conjuntivo do espaço porta, além das células de Kupffer (SOUBASIS et al., 2006). Nas observações realizadas, foi verificado o acúmulo de ferro mais concentrado na região periportal, além de ser verificado também ao longo dos septos de tecido conjuntivo, o que é esperado considerando-se que esses septos são expansões das regiões portais.

As inclusões nucleares foram consideradas entre os parâmetros histopatológicos por aparecerem em grande quantidade nos animais submetidos ao tratamento com TAA. Entretanto, mesmo no grupo controle foram observados os núcleos supercorados pela eosina e de formato irregular. A ocorrência dessas inclusões não foi encontrada na literatura e sua natureza permanece desconhecida.

No presente estudo, as análises dos testes comportamentais dos animais injetados com TAA revelaram que o modelo de cirrose induzida foi capaz de modificar o estado emocional

dos animais. De acordo com os resultados obtidos, o tratamento com TAA reduziu o número de entradas nos braços fechados e o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE), a partir da 10ª semana de tratamento, em relação aos valores obtidos nos animais não tratados.

O teste comportamental utilizado foi desenvolvido a partir dos trabalhos de Montgomery (1955) e, tem sido muito utilizado com ratos (PELLOW; FILE, 1985). O LCE é um dos vários métodos existentes para avaliação do estado emocional, no qual o animal é colocado no centro do cruzamento das duas plataformas e permanece livre para locomover-se por elas, por um período de cinco minutos. É importante ressaltar a diferença destas plataformas: enquanto uma delas é desprotegida, a outra é protegida por paredes laterais. Assim, quando o animal se locomove pela plataforma protegida, toca as paredes laterais com suas vibrissas, o que se supõe proporcionar-lhe proteção.

Embora exista nos roedores uma tendência natural por escolher a plataforma protegida (*drive* interno, relacionado à segurança), esses animais, sob condições normais (não estressados), locomovem-se também pela plataforma desprotegida, devido a outro *drive* interno e oposto, relacionado a sua curiosidade natural. Segundo Pellow et al. (1985), os estados emocionais decorrentes de estimulações aversivas ou estressantes podem ser avaliados pelos locais de maior permanência dos ratos no LCE, ou seja, a menor permanência nos braços abertos indicaria níveis aumentados de estresse dos animais (FILE; LISTER, 1984).

Assim sendo, o teste é um paradigma comportamental que representa um excelente método de avaliação do estado emocional. No caso dos resultados obtidos, verificou-se que os animais tratados com TAA apresentaram menor frequência de entradas nos braços fechados e permaneceram por tempo menor nos braços abertos, indicando a sua preferência pela área protegida, uma vez que exploraram menos a área aberta. Estes resultados permitem sugerir que o *drive* interno da segurança estivesse predominando, o que indica o estado de estresse nos animais devido à doença (LISTER, 1987; HOGG, 1996).

Entretanto, em outros estudos envolvendo cirrose por administração de TAA, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos dados obtidos no LCE (MÉNDEZ et al., 2008). Uma vez que esses autores adicionaram TAA na água ingerida por ratos machos e que o aumento na concentração da toxina não obedeceu aos esquemas de aumento propostos no presente trabalho, as diferenças encontradas podem ser explicadas pela diferente metodologia empregada nos estudos.

Ainda assim, as diferenças comportamentais decorrentes da cirrose induzida por TAA são compatíveis com as descritas para estresse psicológico seguido de reação anafilática (PORTELA et al., 2007), para estresse induzido por estimulação elétrica nas patas (PORTELA et al., 2001, 2002), entre outros estímulos estressores imunológicos (FLESHNER et al., 1995) e de causa toxicológica (RIGHI; PALERMO-NETO, 2003). Este último trabalho, o qual também verifica administração de toxinas, apresenta resultados de maior estresse ou ansiedade dos animais do que os que são apresentados aqui. Porém, a toxina estudada por esses autores (um piretróide) possui efeitos mais específicos sobre o sistema nervoso, o que pode justificar essa diferença, aliado ao fato de que trabalharam com animais machos.

Ademais, analisando-se os resultados encontrados entre os diferentes grupos, verificou-se que o aumento na dosagem de TAA é um agravante no comportamento dos animais. Na 6ª semana, apesar de não haver diferença estatística entre os grupos, o grupo C apresentou menor tempo de permanência nos braços abertos, após ser submetido ao primeiro aumento de dose. Já na 10ª semana, após o aumento de 20% na dose do grupo B e o segundo aumento do grupo C, o grupo B apresentou os menores valores dos parâmetros comportamentais avaliados, indicando que o aumento abrupto da dosagem piorou seu estado emocional. O agravamento repentino da injúria, possivelmente, provoque dores e um profundo mal estar nos animais, uma vez que posição álgica, baixa responsividade à manipulação e cromodacriorréia foram registradas.

Entretanto, na 12ª semana observa-se uma recuperação do grupo B com o aumento no tempo de permanência nos braços abertos, mostrando que os animais recobram a sua atividade e o seu comportamento de exploração do ambiente. Neste período, o grupo C passou pelo terceiro aumento de dose e seu tempo de permanência nos braços abertos é significativamente reduzido. Esta característica de maior estresse, provavelmente, ocorra pelo mesmo motivo de mal estar causado pelo reforço da injúria ao fígado já comprometido. Na 14ª semana, o grupo B se mantém estável, ao passo que os grupos C e D apresentam menor tempo de permanência nos braços abertos e menor número de entradas nos braços fechados. Isto leva a crer que os aumentos progressivos na dosagem de TAA mantêm a injúria constante e estável ao longo da indução, refletida pela piora do aspecto emocional, impedindo a adaptação dos animais à droga. A condição de estresse do animal ocorre em função do seu estado de saúde comprometido pela cirrose hepática.

O grupo B, todavia, não respondeu da mesma forma apresentando melhora do estado emocional, ao final do experimento, mesmo com o quadro cirrótico estabelecido, conforme comprovado pelo exame histopatológico. O grupo D, novamente, mostrou-se controverso ao

apresentar-se como o mais estressado na última semana de indução, porém com cirrose menos grave do que os grupos B e C. Este fato sugere que a droga possua efeitos extrahepáticos e que a cirrose não tenha sido o único fator a influenciar o aspecto comportamental neste experimento.

No grupo D, era esperado que o quadro cirrótico desenvolvido fosse mais acentuado do que nos outros grupos. Contudo, o que se observou foram valores de ganho de peso e bioquímica sanguínea bastante próximos aos dos grupos B e C, com elevada mortalidade e cirrose macroscópica pouco evidente. Por essas observações, considera-se que, em função da alta taxa de mortalidade no grupo, dos custos e do tempo despendido na execução do experimento, os resultados não compensam a adoção deste modelo.

O fato desse grupo ter contrariado as expectativas acerca do desenvolvimento da cirrose, apresentando resistência à TAA, suscita algumas ponderações que possam explicar esse fenômeno.

Estudos sugerem que a ativação metabólica da TAA não é dose-dependente devido à saturação nas etapas de biotransformação dessa toxina, o que ocorre em doses a partir de 300 mg/kg. Além disso, a segunda etapa, a qual forma o composto que reage com as moléculas teciduais (S-dióxido-TAA), corresponde à etapa menos eficiente da bioativação. Assim, a injúria não seria mais grave em doses maiores porque somente uma parte do composto sofreria metabolização, sendo o restante eliminado na urina na forma de TAA ou S-óxido-TAA (CHILAKAPATI et al., 2005). No presente trabalho, em que o terceiro aumento de dose atingiu a proporção de 304,1 mg/kg, supõe-se que a saturação tenha sido atingida moderando a toxicidade e permitindo a sobrevivência dos animais que resistiram até essa etapa. Dessa maneira, como a bioativação não foi proporcional à dose, o rendimento do quadro cirrótico não foi superior aos outros grupos que passaram por aumentos de dose menores.

Há também a possibilidade de que outros fatores influenciem o desenvolvimento da cirrose. Experimento com ratos da linhagem Sprague-Dawley e com ratos mutantes Nagase analbuminêmicos mostra que este último não desenvolve cirrose hepática (DAVID et al., 2002). Neste caso os pesquisadores não acreditam que o efeito protetor seja devido à ausência de albumina nesses animais, porque não obtiveram sucesso mesmo com co-administração dessa proteína. Eles associam a hiperlipidemia e a hipercolesterolemia como fatores de resistência à toxicidade causada pela TAA, por terem demonstrado que a suplementação de colesterol na dieta influencia na prevenção de necrose e inflamação (MOREIRA et al., 1995) e porque os animais Nagase apresentavam níveis mais elevados de triglicérides. No presente estudo, não foi realizada mensuração de lipídios, mas Guerra (2006) mostrou que os seus

animais controle apresentaram níveis de triglicérides de 72 mg/dL, normais para humanos. Pode-se questionar que os animais utilizados nos dois experimentos são de linhagens diferentes, já que Guerra trabalhou com ratos Wistar. Entretanto, os níveis de triglicérides normais para fêmeas desta linhagem é de $0,33 \pm 0,13$ mmol/L (GALAS, 2008), o qual corresponde a 29,37 mg/dL. Mesmo que fossem considerados os valores para machos, 0,51 mmol/L (45,39 mg/dL), esses animais ainda apresentariam lipidemia maior do que o valor considerado normal para a espécie. Diante desses resultados, talvez os ratos Wistar utilizados neste estudo apresentem níveis lipídicos mais elevados, influenciando a susceptibilidade à injúria hepática causada pela TAA.

Contudo, o fator “resistência”, visto neste trabalho como o principal obstáculo na obtenção do quadro cirrótico desejável, compreende uma série de outras implicações muito mais complexas. O mecanismo de resistência é muito estudado na carcinogênese, em terapias anticâncer, pois as células tumorais apresentam grande capacidade de adquirir resistência às drogas. Uma das formas é o aumento da atividade de detoxificação pelas enzimas metabolizantes como a glutathione S-transferase e o citocromo P-450. Como já foi dito, a subfamília de citocromo P-450 CYP2E1 é responsável pela bioativação da TAA. Porém, a detoxificação é realizada pela subfamília CYP3A4, aliada à glicoproteína-P (PgP), uma proteína de membrana que transporta as substâncias para fora da célula (MEIJERMAN; BEIJNEN; SCHELLENS, 2008). É sabido também que drogas que são inativadas no fígado podem induzir um aumento no retículo endoplasmático liso do hepatócito (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Assim, há um aumento na produção de proteínas que aumentarão a capacidade de detoxificação do órgão. Dessa forma, são vários os fatores que podem ter resultado na resistência dos animais à TAA e que influenciam o desenvolvimento do quadro cirrótico nos modelos de indução.

Conquanto esses fatores resultem em frustrações acerca do desempenho metodológico e dos resultados almejados, eles refletem a potencialidade e a diversidade de estratégias que um organismo vivo utiliza para se proteger. Esse conjunto de eventos possibilita a perpetuação da vida e, assim, merecem um olhar de admiração do pesquisador.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Frente aos resultados obtidos, conclui-se que:

- ✘ Os aumentos de dose dos grupos B (20% aos 48 dias) e C (10% a cada 24 dias) são mais eficazes em evitar a recuperação e o ganho de peso dos animais;
- ✘ O aumento de dose do grupo D (15% a cada 24 dias) é excessivo, provocando alta mortalidade e baixo rendimento do quadro patológico;
- ✘ Aumentos progressivos na dosagem de TAA afetam mais o estado emocional dos animais no decorrer da indução da cirrose;
- ✘ Cessada a administração da TAA, o fígado tende a se recuperar funcionalmente, mas a morfologia permanece adequada nos parâmetros que definem a cirrose;
- ✘ O tratamento com TAA, independentemente da dosagem, produz lesões pré-neoplásicas tendo um possível efeito carcinogênico sobre os hepatócitos e sobre o sistema biliar.

Em uma visão geral, percebe-se que os resultados obtidos com os animais dos grupos B e C foram muito semelhantes durante todo o experimento e nenhuma diferença marcante foi observada entre eles. Entretanto, salienta-se o fato de que o grupo B apresentou menor mortalidade e quadro emocional de menor ansiedade ou estresse. Além disso, foi um método de indução mais simples, visto que apenas um aumento de dose foi suficiente para se obter os mesmos resultados do aumento progressivo de 10%.

Portanto, considerando-se a metodologia experimental e os resultados obtidos, recomenda-se iniciar o tratamento com TAA em dose inicial padronizada de 200 mg TAA/kg e, após um período inicial de tratamento, aumentá-la em 20%, mantendo-se esta dose até o final do experimento.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AISHIMA, S.; NISHIHARA, Y.; TSUJITA, E.; TAGUCHI, K.; SOEJIMA, Y.; TAKETOMI, A.; IKEDA, Y.; MAEHARA, Y.; TSUNEYOSHI, M. Biliary neoplasia with extensive intraductal spread associated with liver cirrhosis: a hitherto unreported variant of biliary intraepithelial neoplasia. **Human Pathology**, v. 39, n. 6, p. 939-947, 2008.
- AL-BADER, A.; MATHEW, T. C.; ABUL, H.; AL-SAYER, H.; SINGAL, P. K.; DASHTI, H. M. Cholangiocarcinoma and liver cirrhosis in relation to changes due to thioacetamide. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 208, n. 1-2, p. 1-10, 2000.
- ALBANIS, E.; FRIEDMAN, S. L. Antifibrotic agents for liver disease. **American Journal of Transplantation**, v. 6, n. 1, p.12-19, 2006.
- ANDRADE, Z. A. Regressão da fibrose hepática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 514-520, 2005.
- ARIAS, I. M.; BOYER, J. L.; FAUSTO, N.; JACOBY, W. B.; SCHACHTER, D.; SHAFRITZ, D. A. **The liver: biology and pathobiology**. 3. ed. New York: Raven, 1994. 1628 p.
- BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. 5. ed. Edinburgh; London: Churchill Livingstone, 2002. 796 p.
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. 629 p.
- BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 2, p. 209-218, 2005.
- BEDOSSA, P.; PARADIS, V. Liver extracellular matrix in health and disease. **Journal of Pathology**, v. 200, n. 4, p. 504-515, 2003.
- BIANCHI, G.; MARCHESINI, G.; NICOLINO, F.; GRAZIANI, R.; SGARBI, D.; LOGUERCIO, C.; ABBIATI, R.; ZOLI, M. Psychological status and depression in patients with liver cirrhosis. **Digestive and Liver Disease**, v. 37, n. 8, p. 593-600, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Informações de Saúde. Indicadores e Dados Básicos. 2001. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 11 set. 2008.

- BRISTOW, L. J.; YOUNG, L. Chromodacryorrhea and repetitive hind paw tapping: Models of peripheral and central tachykinin NK1 receptor activation in gerbils. **European Journal of Pharmacology**, v. 253, n. 3, p. 245-252, 1994.
- BRUCK, R.; ASHKENAZI, M.; WEISS, S.; GOLDINER, I.; SHAPIRO, H.; AEED, H.; GENINA, O.; HELPERN, Z.; PINES, M. Prevention of liver cirrhosis in rats by curcumin. **Liver International**, v. 27, n. 3, p. 373-383, 2007.
- BURT, A. D. Pathobiology of the hepatic stellate cells. **Journal of Gastroenterology**, v. 34, n. 3, p. 299-304, 1999.
- CARO, A. A.; CEDERBAUM, A. I. Inhibition of CYP2E1 catalytic activity in vitro by S-adenosyl-L-methionine. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 7, p. 1081-1093, 2005.
- CHÁVEZ, J. H.; CAMPANA, S. G.; HAAS, P. Panorama da hepatite B no Brasil e no Estado de Santa Catarina. **Pan American Journal of Public Health**, v. 14, n. 2, p. 91-96, 2003.
- CHEN, Y. P.; DAI, L.; WANG, J. L.; ZHU, Y. F.; FENG, X. R.; HOU, J. L. Model consisting of ultrasonographic and simple blood indexes accurately identify compensated hepatitis B cirrhosis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, n. 8, p. 1228-1234, 2008.
- CHILAKAPATI, J.; SHANKAR, K.; KORRAPATI, M. C.; HILL, R. A.; MEHENDALE, H. M. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: Role in initiation of liver injury. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 33, n. 12, p. 1877-1885, 2005.
- CLOSE, B.; BANISTER, K.; BAUMANS, V.; BERNOTH, E. M.; BROMAGE, N.; BUNYAN, J.; ERHARDT, W.; FLECKNELL, P.; GREGORY, N.; HACKBARTH, H.; MORTON, D.; WARWICK, C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. **Laboratory Animals**, v. 30, n. 4, p. 293-316, 1996.
- CLOSE, B.; BANISTER, K.; BAUMANS, V.; BERNOTH, E. M.; BROMAGE, N.; BUNYAN, J.; ERHARDT, W.; FLECKNELL, P.; GREGORY, N.; HACKBARTH, H.; MORTON, D.; WARWICK, C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. **Laboratory Animals**, v. 31, n. 1, p. 1-32, 1997.
- CREMONESE, R. V.; PEREIRA-FILHO, A. A.; MAGALHÃES, R.; MATTOS, A. A.; MARRONI, C. A.; ZETTLER, C. G.; MARRONI, N. P. Cirrose experimental induzida pela inalação de tetracloreto de carbono: adaptação da técnica e avaliação da peroxidação lipídica. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 1, p. 40-47, 2001.

CROSS, T.; ANTONIADES, C.; HARRISON, P. Non-invasive markers for the prediction of fibrosis in chronic hepatitis C infection. **Hepatology Research**, v. 38, n. 8, p. 762-769, 2008.

DAVID, P.; ALEXANDRE, E.; CHENARD-NEU, M.; WOLF, P.; JAECH, D.; RICHERT, L. Failure of liver cirrhosis induction by thioacetamide in Nagase analbuminaemic rats. **Laboratory Animals**, v. 36, n. 2, p. 158-164, 2002.

DÍAZ-GIL, J. J.; MUÑOZ, J.; ALBILLOS, A.; RÚA, C.; MACHÍN, C.; GARCÍA-CAÑERO, R.; CERECEDA, R. M.; GUIJARRO, M. C.; TRILLA, C.; ESCARTÍN, P. Improvement in liver fibrosis, functionality and hemodynamics in CCl₄- cirrhotic rats after injection of the Liver Growth Factor. **Journal of Hepatology**, v. 30, n. 6, p. 1065-1072, 1999.

DRAGAN, Y. P.; PITOT, H. C. The role of the stages of initiation and promotion in phenotypic diversity during hepatocarcinogenesis in the rat. **Carcinogenesis**, v. 13, n. 5, p. 739-750, 1992.

FARBER, E.; SARMA, D. S. R. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. **Laboratory Investigation**, v. 56, n. 1, p. 4-22, 1987.

FAUSTO, N. Liver regeneration. **Journal of Hepatology**, v. 32, p. 19-31, 2000. Supplementum 1.

FAUSTO, N.; CAMPBELL, J. S.; RIEHLE, K. J. Liver regeneration. **Hepatology**, v. 43, n. 2, p. 45-53, 2006. Supplementum 1.

FERNANDEZ-CHECA, J. C.; KAPLOWITZ, N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, n. 3, p. 263-273, 2005.

FILE, S. E.; LISTER, R. G. Do the reductions in social interactions produced by picrotoxin and pentylentetrazole indicate anxiogenic actions? **Neuropharmacology**, v. 23, n. 7A, p. 793-796, 1984.

FLESHNER, M.; BELLGRAU, D.; WATKINS, L. R.; LAUDENSLAGER, M. L.; MAIER, S. F. Stress-induced reduction in the rat mixed lymphocyte reaction is due to macrophages and not changes in T cell phenotypes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 56, n. 1, p. 45-52, 1995.

FONTANA, L.; MOREIRA, E.; TORRES, M. I.; FERNÁNDEZ, M. I.; RIOS, A.; MEDINA, F. S.; GIL, A. Serum amino acid changes in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. **Toxicology**, v. 106, n. 1-3, p. 197-206, 1996.

FREIRE, R.; MANGUALDE, J.; VIEIRA, A. M.; LOBATO, C.; ALVES, A. L.; CREMERS, M. I.; AUGUSTO, F.; CAETANO, F.; OLIVEIRA, A. P. Síndrome hepatopulmonar em doentes com cirrose hepática: importância da sua pesquisa sistemática e impacto no prognóstico. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 14, p. 176-183, 2007.

FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Gastroenterology**, v. 134, n. 6, p. 1655-1669, 2008a.

FUENTEALBA, C.; GUEST, S.; HAYWOOD, S.; HORNEY, B. Chronic hepatitis: a retrospective study in 34 dogs. **Canadian Veterinary Journal**, v. 38, n. 6, p. 365-373, 1997.

GAINES, D. I.; FALLON, M. B. Hepatopulmonary syndrome. **Liver International**, v. 24, n. 5, p. 397-401, 2004.

GALAS. Clinical Biochemistry, Hematology, Urinalysis. 2008. Disponível em: <http://www.galas.org/WH_data.htm>. Acesso em: 24 set. 2008.

GANDILLET, A.; ALEXANDRE, E.; HOLL, V.; ROYER, C.; BISCHOFF, P.; CINQUALBRE, J.; WOLF, P.; JAECK, D.; RICHERT, L. Hepatocyte ploidy in normal young rat. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 134, n. 3, p. 665-673, 2003.

GARCÍA, L.; HERNÁNDEZ, I.; SANDOVAL, A.; SALAZAR, A.; GARCIA, J.; VERA, J.; GRIJALVA, G.; MURIEL, P.; MARGOLIN, S.; ARMENDARIZ-BORUNDA, J. Pirfenidone effectively reverses experimental liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, v. 37, n. 6, p. 797-805, 2002.

GEORGE, J.; RAO, K. R.; STERN, R.; CHANDRAKASAN, G. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. **Toxicology**, v. 156, n. 2-3, p. 129-138, 2001.

GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 3, p. 367-379, 2005.

GRIGORESCU, M. Noninvasive biochemical markers of liver fibrosis. **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**, v. 15, n. 2, p. 149-159, 2006.

GUERRA, R. R. **Efeito do tratamento com fatores hepatotróficos em ratas (Wistar) induzidas experimentalmente à cirrose por tioacetamida**. 2006. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973 p.

HARPER, R. P.; KERINS, C. A.; MCINTOSH, J. E.; SPEARS, R.; BELLINGER, L. L. Modulation of the inflammatory response in the rat TMJ with increasing doses of complete Freund's adjuvant. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 9, n. 7, p. 619-624, 2001.

HENDERSON, N. C.; IREDALE, J. P. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. **Clinical Science**, v. 112, n. 5, p. 265-280, 2007.

HERLIHY, B.; MAEBIUS, N. K. **Anatomia e fisiologia do corpo humano saudável e enfermo**. São Paulo: Manole, 2002. 555 p.

HOGG, S. A. A review of the validity and variability of the elevated plus maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 21-30, 1996.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 577-580, 1981.

JEONG, D.; JANG, J.; LEE, S.; LEE J.; LIM, I.; LEE, M.; LEE, Y. Expression patterns of cell cycle-related proteins in a rat cirrhotic model induced by CCL₄ or thioacetamide. **Journal of Gastroenterology**, v. 36, n. 1, p. 24-32, 2001.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemical Journal**, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. 488 p.

KAPLOWITZ, N.; EBERLE, D.; YAMADA, T. Biochemical tests for liver disease. In: ZAKIM, D.; BOYER, T. D. **Hepatology: a textbook of liver disease**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1982. v. 1, p. 583-607.

KATO, A.; BAMBA, H.; SHINOHARA, M.; YAMAUCHI, A.; OTA, S.; KAWAMOTO, C.; YOSHIDA, Y. Relationship between expression of cyclin D1 and impaired liver regeneration observed in fibrotic or cirrhotic rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 20, n. 8, p. 1198-1205, 2005.

KNOLLE, P. A.; GERKEN, G. Local control of the immune response in the liver. **Immunological Reviews**, v. 174, p. 21-34, 2000.

KOLIOS, G.; VALATAS, V.; KOUROUMALIS, E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 46, p. 7413-7420, 2006.

KOGURE, K.; ISHIZAKI, M.; NEMOTO, M.; KUWANO, H.; MAKUUCHI, M. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. **Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery**, v. 6, n. 2, p. 171-175, 1999.

KUMAR, M.; SARIN, S. K. Is cirrhosis of the liver reversible? **Indian Journal of Pediatrics**, v. 74, n. 4, p. 393-399, 2007.

KUROIWA-TRZMIELINA, J. **Avaliação das eventuais atividades quimiopreventivas da tributirina em ratos Wistar submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese**. 2007. 161 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

LALEMAN, W.; VANDER ELST, I.; ZEEGERS, M.; SERVAES, R.; LIBBRECHT, L.; ROSKAMS, T.; FEVERY, J.; NEVENS, F. A stable model of cirrhotic portal hypertension in rat: thioacetamide revisited. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 36, n. 4, p. 242-249, 2006.

LE COUTEUR, D. G.; FRASER, R.; HILMER, S.; RIVORY, L. P.; MCLEAN, A. J. The hepatic sinusoid in aging and cirrhosis: effects on hepatic substrate disposition and drug clearance. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 44, n. 2, p. 187-200, 2005.

LE COUTEUR, D. G.; WARREN, A.; COGGER, V. C.; SMEDSRØD, B.; SØRENSEN, K. K.; DE CABO, R.; FRASER, R.; MCCUSKEY, R. S. Old age and the hepatic sinusoid. **The Anatomical Record**, v. 291, n. 6, p. 672-683, 2008.

LEE, R. F.; GLENN, T. K.; LEE, S. S. Cardiac dysfunction in cirrhosis. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 21, n. 1, p. 125-140, 2007.

- LI, X.; BENJAMIN, I. S.; ALEXANDER, B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. **Journal of Hepatology**, v. 36, n. 4, p. 488-493, 2002.
- LIDA, V. H.; SILVA, T. J. A.; SILVA, A. S. F.; SILVA, L. F. F.; ALVES, V. A. F. Cirrose hepática: aspectos morfológicos relacionados as suas possíveis complicações. Um estudo centrado em necropsias. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 1, p. 29-36, 2005.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.
- LOW, T. Y.; LEOW, C. K.; SALTO-TELLEZ, M.; CHUNG, M. C. M. A proteomic analysis of thioacetamide-induced hepatotoxicity and cirrhosis in rat livers. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3960-3974, 2004.
- LOWES, K. N.; BRENNAN, B. A.; YEOH, G. C.; OLYNYK, J. K. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. **American Journal of Pathology**, v. 154, n. 2, p. 537-541, 1999.
- LUO, D. Z.; VERMIJLEN, D.; AHISHALI, B.; TRIANTIS, V.; PLAKOUTSI, G.; BRAET, F.; VANDERKERKEN, K.; WISSE, E. On the cell biology of pit cells, the liver-specific NK cells. **World Journal of Gastroenterology**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2000.
- MADDEN, J. W.; GERTMAN, P. M.; PEACOCK, E. E. Dimethylnitrosamine-induced hepatic cirrhosis: a new canine model of an ancient human disease. **Surgery**, v. 68, n. 1, p. 260-268, 1970.
- MANNING, D. S.; AFDHAL, N. H. Diagnosis and quantitation of fibrosis. **Gastroenterology**, v. 134, n. 6, p. 1670-1681, 2008.
- MARCHESINI, G.; BIANCHI, G.; AMODIO, P.; SALERNO, F.; MERLI, M.; PANELLA, C.; LOGUERCIO, C.; APOLONE, G.; NIERO, M.; ABBIATI, R. Factors associated with poor health-related quality of life of patients with cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 120, n. 1, p. 170-178, 2001.
- MASUMI, S.; MORIYAMA, M.; KANNAN, Y.; OHTA, M.; KOSHITANI, O.; SAWAMOTO, O.; SUGANO, T. Changes in hepatic nitrogen metabolism in isolated perfused liver during the development of thioacetamide-induced cirrhosis in rats. **Toxicology**, v. 135, n. 1, p. 21-31, 1999.

- MEIJERMAN, I.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. Combined action and regulation of phase II enzymes and multidrug resistance proteins in multidrug resistance in cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, n. 6, p. 505-520, 2008.
- MÉNDEZ, M.; MÉNDEZ-LÓPEZ, M.; LÓPEZ, L.; ALLER, M. A.; ÁRIAS, J.; CIMADEVILLA, J. M.; ÁRIAS, J. L. Spatial memory alterations in three models of hepatic encephalopathy. **Behavioural Brain Research**, v. 188, n. 1, p. 32-40, 2008.
- MICHALOPOULOS, G. K.; DEFRANCES, M. C. Liver regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 60-65, 1997.
- MILANI, A.; ZACCARIA, R.; BOMBARDIERI, G.; GASBARRINI, A.; POLA, P. Cirrhotic cardiomyopathy. **Digestive and Liver Disease**, v. 39, n. 6, p. 507-515, 2007.
- MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative Physiology and Psychology**, v. 48, n. 4, p. 254-260, 1955.
- MOREIRA, E.; FONTANA, L.; TORRES, M. I.; FERNÁNDEZ, I.; RÍOS, A.; MEDINA, F. S.; GIL, A. Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids influence the recovery of thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 19, n. 6, p. 461-469, 1995.
- MORENO, F. S.; TOLEDO, L. P.; DE CONTI, A.; HEIDOR, R.; JORDÃO JR., A.; VANNUCCHI, H.; CARDOZO, M. T.; ONG, T. P. Lutein presents suppressing but not blocking chemopreventive activity during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis and this involves inhibition of DNA damage. **Chemico-Biological Interactions**, v. 168, n. 3, p. 221-228, 2003.
- MUÑOZ TORRES, E.; PAZ BOUZA, J. I.; LÓPEZ BRAVO, A.; ABAD HERNÁNDEZ, M. M.; CARRASCAL MARINO, E. Experimental thioacetamide-induced cirrosis of the liver. **Histology and Histopathology**, v. 6, n. 1, p. 95-100, 1991.
- MURIEL, P.; ESCOBAR, Y. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. **Journal of Applied Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 103-108, 2003.
- MYRONOVYCH, A.; MURATA, S.; CHIBA, M.; MATSUO, R.; IKEDA, O.; WATANABE, M.; HISAKURA, K.; NAKANO, Y.; KOHNO, K.; KAWASAKI, T.; HASHIMOTO, I.; SHIBASAKI, Y.; YASUE, H.; OHKOHCHI, N. Role of platelets on liver regeneration after 90% hepatectomy in mice. **Journal of Hepatology**, v. 49, n. 3, p. 363-372, 2008.

NAKATA, Y.; IWAI, M.; KIMURA, S.; SHIMAZU, T. Prolonged decrease in hepatic connexin32 in chronic liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. **Journal of Hepatology**, v. 25, n. 4, p. 529-537, 1996.

NAKATANI, K.; KANEDA, K.; SEKI, S.; NAKAJIMA, Y. Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function. **Medical Electron Microscopy**, v. 37, n. 1, p. 29-36, 2004.

NATARAJAN, S. K.; THOMAS, S.; RAMAMOORTHY, P.; BASIVIREDDY, J.; PULIMOOD, A. B.; RAMACHANDRAN, A.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 21, n. 6, p. 947-957, 2006.

NEWELL, P.; VILLANUEVA, A.; FRIEDMAN, S. L.; KOIKE, K.; LLOVET, J. M. Experimental models of hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 5, p. 858-879, 2008.

OLSSON, R.; REHNSTRÖM, B. Studies on serum protein fractions after partial hepatectomy in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. **Acta Chirurgica Scandinavica**, v. 366, p. 64-69, 1966.

PALERMO-NETO, J.; FONSECA, E. S. M.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; CORREIA, C. S. C.; SAKAI, M. Effects of individual housing on behavior and resistance to Ehrlich tumor growth in mice. **Physiology and Behavior**, v. 95, n. 3, p. 435-440, 2008.

PALMA, D. T.; FALLON, M. B. The hepatopulmonary syndrome. **Journal of Hepatology**, v. 45, n. 4, p. 617-625, 2006.

PARK, Y. N.; RONCALLI, M. Large liver cell dysplasia: a controversial entity. **Journal of Hepatology**, v. 45, n. 5, p. 734-743, 2006.

PELLOW, S. Can drug effects on anxiety and convulsions be separated? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 9, n. 1, p. 55-73, 1985.

PELLOW, S.; CHOPPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. The effects of putative anxiogenic compounds (FG 7142, CGS 8216 and Ro 15-1788) on the rat corticosterone response. **Physiology and Behavior**, v. 35, n. 4, p. 587-590, 1985.

PEREIRA, H. M. **Efeito do tratamento com fatores hepatotróficos sobre o fígado de ratas (Wistar) com fibrose induzida experimentalmente**. 2003. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PINES, M.; KNOPOV, V.; GENINA, O.; LAVELIN, I.; NAGLER, A. Halofuginone, a specific inhibitor of collagen type I synthesis, prevents dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis. **Journal of Hepatology**, v. 27, n. 2, p. 391-398, 1997.

PINZANI, M.; ROMBOUTS, K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. **Digestive and Liver Disease**, v. 36, n. 4, 231-242, 2004.

PINZANI, M.; ROMBOUTS, K.; COLAGRANDE, S. Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. **Journal of Hepatology**, v. 42, p. 22-36, 2005. Supplementum 1.

PITOT, H. C. Pathways of progression in hepatocarcinogenesis. **The Lancet**, v. 358, n. 9285, p. 859-860, 2001.

PITOT, H. C.; DRAGAN, Y. P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **The FASEB Journal**, v. 5, n. 9, p. 2280-2286, 1991.

PORTELA, C. P.; MASSOCO, C. O.; TAVARES DE LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Stress-induced increment on total bronchoalveolar count in OVA sensitized rats. **Physiology and Behavior**, v. 72, n. 3, p. 415-420, 2001.

PORTELA, C. P.; LEICK-MALDONADO, E. A.; TIBÉRIO, I. F. L. C.; PALERMO-NETO, J. Effects of diazepam and stress on lung inflammatory edema in OVA-sensitized rats. **American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 282, n. 6, p. 1289-1295, 2002.

PORTELA, C. P.; LEICK-MALDONADO, E. A.; KASAHARA, D. I.; PRADO, C. M.; CALVO-TIBÉRIO, I. F.; MARTINS, M. A.; PALERMO-NETO, J. Effects of stress and neuropeptides on airway responses in ovalbumin-sensitized rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, n. 2, p. 105-111, 2007.

QUINN, P. S.; HIGGINSON, J. Reversible and irreversible changes in experimental cirrhosis. **American Journal of Pathology**, v. 47, n. 3, p. 353-369, 1965.

RAMADORI, G.; SAILE, B. Inflammation, damage repair, immune cells, and liver fibrosis: specific or nonspecific, this is the question. **Gastroenterology**, v. 127, n. 3, p. 997-999, 2004.

RAMAIAH, S. K.; APTE, U.; MEHENDALE, H. M. Cytochrome p4502e1 induction increases thioacetamide liver injury in diet-restricted rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 29, n. 8, p. 1088-1095, 2001.

RIGHI, D. A.; PALERMO-NETO, J. Behavioral effects of type II pyrethroid cyhalothrin in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 191, n. 2, p. 167-176, 2003.

RIO TINTO, R.; REDONDO, I.; DELGADO, C.; MARTINS, J.; MARTINS NEVES, M. Hepato-colangiocarcinoma: a propósito de um caso clínico. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 10, p. 160-163, 2003.

SALINAS, A. E.; WONG, M. G. Glutathione s-transferases – a review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 279-309, 1999.

SANZ, N.; DÍEZ-FERNÁNDEZ, C.; FERNÁNDEZ-SIMÓN, L.; ALVAREZ, A.; CASCALES, M. Necrogenic and regenerative responses of liver of newly weaned rats against a sublethal dose of thioacetamide. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1384, n. 1, p. 66-78, 1998.

SANCHES FILHO, P. J.; ZANIN, K. D.; CARAMÃO, E. B.; GARCIA, R. C.; RIOS, A.; VALCÁRCEL, M. Pré-concentração de nitrosaminas a partir de amostras aquosas por extração em fase sólida e cromatografia capilar eletrocínética micelar. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 193-196, 2003.

SATO, Y.; MURASE, K.; KATO, J.; KOBUNE, M.; SATO, T.; KAWANO, Y.; TAKIMOTO, R.; TAKADA, K.; MIYANISHI, K.; MATSUNAGA, T.; TAKAYAMA, T.; NIITSU, Y. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 431-442, 2008.

SATOH, K.; KITAHARA, A.; SOMA, Y.; INABA, Y.; HATAYAMA, I.; SATO, K. Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase: a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 12, p. 3964-3968, 1985.

SCHINDHELM, R. K.; DIAMANT, M.; DEKKER, J. M.; TUSHUIZEN, M. E.; TEERLINK, T.; HEINE, R. J. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 22, n. 6, p. 437-443, 2006.

SCHULTHEISS, P. C.; BEDWELL, C. L.; HAMAR, D. W.; FETTMAN, M. J. Canine liver iron, copper, and zinc concentrations and association with histologic lesions. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 5, p. 396-402, 2002.

SCHUPPAN, D.; KREBS, A.; BAUER, M.; HAHN, E. G. Hepatitis C and liver fibrosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, p. 59-67, 2003. Supplementum 1.

SCHUPPAN, D.; AFDHAL, N. H. Liver cirrhosis. **Lancet**, v. 371, n. 9615, p. 838-851, 2008.

SHEA, S. M.; MANSEAU, E. J. Experimental toxic cirrhosis in the rat. II. Kinetics of hepatocyte proliferation during intermittent thioacetamide intoxication. **American Journal of Pathology**, v. 52, n. 1, p. 55-68, 1968.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. M.; DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, v. 360, n. 1, p. 1-16, 2001.

SILVA-OLIVEIRA, E. M. **Efeito modulador do café sobre a carcinogênese hepática induzida em ratos**. 2007. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SIMILE, M. M.; BANNI, S.; ANGIONI, E.; CARTA, G.; DE MIGLIO, M. R.; MURONI, M. R.; CALVISI, D. F.; CARRU, A.; PASCALE, R. M.; FEO, F. 5'-Methylthioadenosine administration prevents lipid peroxidation and fibrogenesis induced in rat liver by carbon-tetrachloride intoxication. **Journal of Hepatology**, v. 34, n. 3, p. 386-394, 2001.

SOUBASIS, N.; RALLIS, T. S.; VLEMMAS, J.; ADAMAMA-MORAITOU, K. K.; ROUBIES, N.; PRASSINOS, N. N.; BRELOU, G. Serum and liver iron concentration in dogs with experimentally induced hepatopathy. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 21, n. 3, p. 599-604, 2006.

SPIRA, G.; MAWASI, N.; PAIZI, M.; ANBINDER, N.; GENINA, O.; ALEXIEV, R.; PINES, M. Halofuginone, a collagen type I inhibitor improves liver regeneration in cirrhotic rats. **Journal of Hepatology**, v. 37, n. 3, p. 331-339, 2002.

SU, Q.; BANNASCH, P. Relevance of Hepatic Preneoplasia for Human Hepatocarcinogenesis. **Toxicologic Pathology**, v. 31, n. 1, p. 126-133, 2003.

TOLEDO, L. P.; ONG, T. P.; PINHO, A. L. G.; JORDÃO JR., A.; VANUCCHI, H.; MORENO, F. S. Inhibitory effects of lutein and lycopene on placental glutathione S-transferase-positive preneoplastic lesions and DNA strand breakage induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model of hepatocarcinogenesis. **Nutrition and Cancer**, v. 47, n. 1, p. 62-69, 2003.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. Barueri: Manole, 2003. p 331.

TORRES, S.; DÍAZ, B. P.; CABRERA, J. J.; DÍAZ-CHICO, J. C.; DÍAZ-CHICO, B. N.; LÓPEZ-GUERRA, A. Thyroid hormone regulation of rat hepatocyte proliferation and polyploidization. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 276, n. 1, p. 155-163, 1999.

TSAMANDAS, A. C.; ANTONACOPOULOU, A.; KALOGEROPOULOU, C.; TSOTA, I.; ZABAKIS, P.; GIANNOPOULOU, E.; LIAVA, A.; TZELEPI, V.; TEPETES, K.; PETSAS, T.; KARDAMAKIS, D.; KALOFONOS, H. P. Oval cell proliferation in cirrhosis in rats: an experimental study. **Hepatology Research**, v. 37, n. 9, p. 755-764, 2007.

TÚNEZ, I.; MUNÓZ, M. C.; VILLAVIVENCIO, M. A.; MEDINA, F. J.; PRADO, E. P.; ESPEJO, I.; BARCOS, M.; SALCEDO, M.; FEIJÓO, M.; MONTILLA, P. Hepato- and neurotoxicity induced by thioacetamide: protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 3, p. 223-228, 2005.

WANG, T.; SHANKAR, K.; RONIS, M. J. J.; MEHENDALE, H. M. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 294, n. 2, p. 473-479, 2000.

WATANABE, T.; KUDO, M.; CHIBA, T.; WAKATSUKI, Y. Molecular mechanisms of portal vein tolerance. **Hepatology Research**, v. 38, n. 5, p. 441-449, 2008.

WATSON, P. J. Chronic hepatitis in dogs: A review of current understanding of the aetiology, progression, and treatment. **Veterinary Journal**, v. 167, n. 3, p. 228-241, 2004.

WESIERSKA, M.; KLINOWSKA, H. D.; ADAMSKA, I.; FRESKO, I.; SADOWSKA, J.; ALBRECHT, J. Cognitive flexibility but not cognitive coordination is affected in rats with toxic liver failure. **Behavioural Brain Research**, v. 171, n. 1, p. 70-77, 2006.

WOOD, G. A.; KORKOLA, K. E.; ARCHER, M. C. Tissue-specific resistance to cancer development in the rat: phenotypes of tumor-modifier genes. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 1, p. 1-9, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 10 facts about cancer. 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/features/factfiles/cancer>>. Acesso em: 26 ago. 2008.

YEH, C.; MAITRA, A.; LEE, K.; JAN, Y.; CHEN, M. Thioacetamide-induced intestinal-type cholangiocarcinoma in rat: an animal model recapitulating the multi-stage progression of human cholangiocarcinoma. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 4, p. 631-636, 2004.

YOUNOSSI, Z.M.; BOPARAI, N.; PRICE, L. L.; KIWI, M. L.; MCCORMICK, M.; GUYATT, G. Health-related quality of life in chronic liver disease: The impact of type and severity of disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 96, n. 7, p. 2199-2205, 2001.

ZAIDAN DAGLI, M.L.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J. Roles of gap junctions and connexins in non-neoplastic pathological processes in which cell proliferation is involved. **Journal of Membrane Biology**, v. 218, n. 1-3, p. 79-91, 2007.

ZARAGOZA, A.; ANDRÉS, D.; SARRIÓN, D.; CASCALES, M. Potenciation of thioacetamide by phenobarbital pretreatment in rats. Inducibility of FAD monooxygenase system and age effect. **Chemico-Biological Interactions**, v. 124, n. 2, p. 87-101, 2000.

ZEN, Y.; SASAKI, M.; FUJII, T.; CHEN, T.; CHEN, M.; YEH, T.; JAN, Y.; HUANG, S.; NIMURA, Y.; NAKANUMA, Y. Different expression patterns of mucin core proteins and cytokeratins during intrahepatic cholangiocarcinogenesis from biliary intraepithelial neoplasia and intraductal papillary neoplasm of the bile duct—an immunohistochemical study of 110 cases of hepatolithiasis. **Journal of Hepatology**, v. 44, n. 2, p. 350-358, 2006.

ZHANG, Z.; ZOU, Z. S.; FU, J. L.; CAI, L.; JIN, L.; LIU, Y. J.; WANG, F. S. Severe dendritic cell perturbation is actively involved in the pathogenesis of acute-on-chronic hepatitis B liver failure. **Journal of Hepatology**, v. 49, n. 3, p. 396-406, 2008.

ZHENG, W. D.; ZHANG, L. J.; SHI, M. N.; CHEN, Z. X.; CHEN, Y. X.; HUANG, Y. H.; WANG, X. Z. Expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hepatic stellate cells during rat hepatic fibrosis and its intervention of IL-10. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 12, p. 1753-1758, 2005.

ZIM, M. C. A.; SILVEIRA, T. R.; SCHWARTSMANN, G.; CERSKI, T.; MOTTA, A. Potenciation of carbon tetrachloride hepatotoxicity by pentosan polysulfate in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 11, p. 1339-1346, 2002.

ANEXO

ANEXO A – VALORES DE REFERÊNCIA DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS FORNECIDOS PELO ANALISADOR BIOQUÍMICO *VetTest®* PARA RATOS

Provisional Reference Ranges: Rat

Test	U.S. Units		S.I. Units	
ALB	3.8-4.8	g/dL	38-48	g/L
ALKP	16-302	IU	16-302	IU
ALT	20-61	IU	20-61	IU
AMYL	326-2246	IU	326-2246	IU
AST	39-111	IU	39-111	IU
BUN	9-21	mg/dL	3.2-7.5	mmol/L
Ca ²⁺	5.3-11.6	mg/dL	1.33-2.90	mmol/L
CHOL	20-92	mg/dL	0.52-2.37	mmol/L
CK	48-340	IU	48-340	IU
CREA	0.05-0.65	mg/dL	4.4-57	μmol/L
GGT	1-6	IU	1-6	IU
GLU	50-135	mg/dL	2.8-7.5	mmol/L
LDH	167-1428	IU	167-1428	IU
LIPA	10-150	IU	10-150	IU
PHOS	5.8-11.2	mg/dL	1.9-3.6	mmol/L
TBIL	0.1-0.7	mg/dL	1.7-12	μmol/L
TP	5.3-6.9	g/dL	53-69	g/L
TRIG	26-108	mg/dL	0.29-1.22	mmol/L
GLOB	1.5-2.8	g/dL	15-28	g/L
URIC	0.8-4.4	mg/dL	48-262	μmol/L