

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
PEDIATRIA

**Estudo da Permeabilidade Intestinal ao ⁵¹Cr-EDTA
em ratos com cirrose induzida por Tetracloreto de
Carbono**

ANA REGINA LIMA RAMOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Porto Alegre, Brasil
2005**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
PEDIATRIA

**Estudo da Permeabilidade Intestinal ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$
em ratos com cirrose induzida por Tetracloreto de
Carbono**

ANA REGINA LIMA RAMOS

**Orientadora: Themis Reverbel da Silveira
Co-orientadora: Ursula Matte**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

“A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Pediatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.”

2005

R175e Ramos, Ana Regina Lima

Estudo da permeabilidade intestinal ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$ em ratos com cirrose induzida por tetracloreto de carbono / Ana Regina Lima Ramos ; orient. Themis Reverbel da Silveira ; co-orient. Ursula Matte. – 2005.
95 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria. Porto Alegre, BR-RS, 2005.

1. Cirrose hepática experimental 2. Permeabilidade da membrana celular 3. Intestinos 4. Ratos 5. Tetracloreto de carbono 6. Acido edérico 7. $^{51}\text{Cr-EDTA}$ I. Silveira, Themis Reverbel da II. Matte, Ursula III. Título.

NLM: WI 725

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

“Na barriga deste mundo existe um mundo melhor.”

Eduardo Galeano
Porto Alegre, janeiro de 2005.

“Na natureza, não existe um efeito sem causa; compreenda a causa e você não terá necessidade do experimento.”

Leonardo da Vinci
1452-1519

Ao meu esposo Sergio

Aos meus pais, Luiz Jobayr e Lúcia Regina

Aos meus irmãos, Ana Isabel e Luiz

Eduardo

Aos meus avós

Aos meus sobrinhos

Agradecimentos Especiais:

À professora Dra. Themis Reverbel da Silveira, pela confiança que demonstrou propondo-me este trabalho, pelo entusiasmo durante toda a realização do mesmo e pelo carinho com que me acolheu.

À minha grande amiga e co-orientadora:

Dra. Ursula Matte, que participou com dedicação, amizade e companheirismo de todas as etapas deste trabalho.

Agradecimentos:

Às queridas amigas e colaboradoras Sandra Maria Gonçalves Vieira e Helena Ayako Sueno Goldani, pela atenção e pelo apoio demonstrados durante este trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Hepatologia Experimental do Centro de Pesquisas do HCPA: Dr. Carlos Kieling, Dra. Raquel Borges Pinto, Dra. Cristina Targa Ferreira e Dr. Jorge Santos, pelo carinho e pela atenção.

Às minhas queridas colegas de mestrado e de laboratório Renata Rocha, Ana Cláudia Schneider e Andréa Bulhões pela amizade e pela oportunidade de compartilhar experiências comuns.

Aos meus queridos bolsistas de iniciação científica: Sabrina Lima Alves, Leonardo Winkelmann, Julia Borges Guimarães, Anibal Pires Borges, Marcelo Fernando Ronsoni, Tiago Gnocchi Costa e Laura Prates Vitória, pelo imprescindível auxílio durante toda a fase experimental deste trabalho.

Aos queridos colegas do Centro de Terapia Gênica: Fernanda Santos Oliveira, doutoranda, e Guilherme Baldo, bolsista de iniciação científica, pelo precioso auxílio durante os experimentos assim como pela amizade e constante apoio.

Às queridas biólogas Ana Helena Paz e Paula Terraciano, assim como à Profa. Elizabete Cirne Lima, pela ajuda essencial durante os experimentos.

Ao chefe do Serviço de Medicina Nuclear, Dr. Bernardo Leão Spiro, pelo apoio entusiasmado durante a elaboração deste projeto e pelo apoio logístico, sem o qual não seria possível a realização do mesmo.

Ao farmacêutico-bioquímico Osmar Luiz Magalhães de Oliveira, pelo auxílio teórico quanto à utilização dos radio fármacos, assim como pela elaboração das soluções de ^{51}Cr -EDTA para os experimentos. À farmacêutica-bioquímica Maria Janilde de Almeida, pelas excelentes sugestões.

Ao chefe do setor de radioimunoensaio, Dr. José Romildo de Jesus, por permitir o uso do contador gama, assim como às bioquímicas Eгна Regina Rossatto e Rosana Scalco, pelo constante apoio.

À médica patologista Luise Meurer pela análise histológica de todos os animais utilizados neste estudo, assim como pelo constante apoio durante todo o período experimental.

À estatística Daniela Benzano Bumaguin, pela eterna paciência e alegria, tornando mais suave esta fase tão árdua da elaboração da dissertação.

À Profa. Dra. Norma Possa Marroni, pelas excelentes sugestões que possibilitaram o pleno desenvolvimento do modelo de cirrose experimental.

Ao Dr. Carlos Felipe Bernardes-Silva, pelo auxílio imprescindível quanto à técnica de verificação da Permeabilidade Intestinal ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$.

Às médicas residentes da gastroenterologia pediátrica Aline Friedrichs de Souza, Cristiane Hallal, Stefânia Simon e Luciana Krause Santana pela agradável e estimulante convivência nos dois anos em que participei dos ambulatórios.

À chefe da Unidade de Experimentação Animal, profa. Roseli Mollerke, pelo apoio constante desde a elaboração do projeto até as fases finais. Aos funcionários da UEA Marcos Eugênio Soares Duarte e Eduardo Mottola Silveira, pela atenção dedicada aos animais, pela boa-vontade, e principalmente, pela paciência.

À administradora do Centro de Pesquisas Rosane Schllater, pela objetividade que sempre facilita o trabalho dos pesquisadores, e a secretária Fabiana da Silva, pela competência e dedicação.

À laboratorista do Departamento de Fisiologia Maria da Glória Tavares Souza, por ter me ensinado a coleta de sangue nos ratos.

Aos funcionários da Patologia Jorge Alberto Lopes, Neiva Copetti e Flávia Rejane Giusti Grossmann, pela confecção das lâminas para análise histológica.

À funcionária da Unidade de Pesquisa Clínica Patrícia Franke Conceição, pelo apoio logístico quanto aos exames laboratoriais.

Aos funcionários do CREAL, em especial o Sr. Ernani da Rosa Carmona e a Sra. Geni Fernandes da Silva, pela simpatia e boa vontade intermináveis, demonstradas em todos os contatos que tivemos.

Às funcionárias do GPPG Marta Regina Dotto e Eliane Reisdorfer pelo apoio.

À ex coordenadora do Programa de Pós-Graduação de Pediatria, Profa. Newra Telechea Rotta, pelos preciosos ensinamentos e conselhos durante os Seminários de Pesquisa.

À professora Juçara Bueno Ricciardi pela revisão ortográfica e gramatical.

À secretária da Pós-Graduação em Pediatria, Rosane Blanguer, pela atenção.

Ao FIPE e CAPES PROF, pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 PERMEABILIDADE INTESTINAL.....	2
1.1.1 Conceito.....	2
1.1.2 Vias de Permeabilidade Intestinal.....	5
1.1.3 Métodos de verificação da Permeabilidade Intestinal.....	8
1.1.4 Fatores que alteram a Permeabilidade Intestinal.....	9
1.1.5 Utilidade clínica da verificação da Permeabilidade Intestinal.....	12
1.2 ⁵¹ CR-EDTA.....	15
1.3 CIRROSE EXPERIMENTAL.....	15
1.4 PERMEABILIDADE INTESTINAL E CIRROSE.....	17
1.4.1 Alterações Intestinais na Cirrose.....	20
1.4.2 O papel da Hipertensão Porta nas alterações intestinais na Cirrose.....	22
1.4.3 Estudos clínicos e experimentais evidenciando alterações na Permeabilidade Intestinal na Cirrose.....	24
1.4.4 Estudos Clínicos utilizando o ⁵¹ Cr-EDTA para acessar a PI em vigência de Cirrose	

2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA.....	33
4.2 DELINEAMENTO.....	33
4.3 LOCAL DE REALIZAÇÃO	33
4.4 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	34
4.5 INDUÇÃO DE CIRROSE	34
4.6 GRUPO CONTROLE	35
4.7 CONTROLE DA FUNÇÃO RENAL	37
4.8 TESTE DO ⁵¹ CR-EDTA	38
4.9 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA	40
4.10ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4.11CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	42
5 RESULTADOS	43
5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA	43
5.1.1 Análise histológica hepática	43
5.1.2 Análise histológica intestinal.....	46
5.1.3 Análise histológica renal.....	47
5.2 PESO DOS ANIMAIS	48
5.3 PESO DOS ÓRGÃOS	50
5.4 FUNÇÃO RENAL	51
5.5 PERMEABILIDADE INTESTINAL AO ⁵¹ CR-EDTA.....	51
5.5.1 PI ao ⁵¹Cr-EDTA nos ratos cirróticos em relação à presença de ascite	52
5.5.2 PI ao ⁵¹Cr-EDTA no grupo Indometacina.....	54
6 DISCUSSÃO.....	56
6.1 MODELO EXPERIMENTAL	56
6.2 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS	58
6.3 FUNÇÃO RENAL NOS ANIMAIS CIRRÓTICOS	60
6.4 VERIFICAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL	61
7 CONCLUSÕES.....	66
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

ANEXOS
DADOS BRUTOS

LISTA DE ABREVIATURAS

μCi	micro Curies
μm	Micrômetros
$^{51}\text{Cr-EDTA}$	Ácido Etilenodiaminotetraacético marcado com cromo 51
$^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$	Ácido Dietilenotriaminopentaacético marcado com tecnécio 99
AINE	Antiinflamatório não esteróide
ATP	Trifosfato de Adenosina
CCl_4	Tetracloroeto de Carbono
CREAL	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
cr_s	Creatinina sérica
cr_u	Creatinina urinária
Da	Dalton
DCE	Depuração da Creatinina Endógena
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
g	gramas

<i>GALT</i>	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
GLP-2	Peptídeo Semelhante ao Glucagon
GMPc	GMP cíclico
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IFN γ	Interferon-gama
IGF-I	Fator de Crescimento semelhante à Insulina I
IGF-II	Fator de Crescimento semelhante à Insulina II
IL-1	Interleucina 1
IL-13	Interleucina 13
IL-4	Interleucina 4
keV	kilo elétron volts
kg	kilogramas
mg	miligramas
mL	mililitros
<i>NIH</i>	<i>National Institutes of Health</i>
PBE	Peritonite Bacteriana Espontânea
PI	Permeabilidade Intestinal
PP	Permeabilidade Para-celular
TB	Translocação Bacteriana
TGF- α	Fator de Crescimento Transformador-alfa
TGF- β 1	Fator de Crescimento Transformador-beta 1
TNF α	Fator de Necrose Tumoral-alfa

UFRGS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema demonstrando as vias de permeabilidade de acordo com a teoria dos poros	5
Figura 2 - Modelo proposto de diferenças entre as junções firmes do epitélio das vilosidades e das criptas intestinais	6
Figura 3 - A estrutura das junções firmes entre as células epiteliais do intestino delgado	7
Figura 4 - Proteínas formadoras das junções firmes	8
Figura 5 - Possíveis inter-relações responsáveis pelas complicações infecciosas na cirrose... ..	18
Figura 6 - Fórmula para o cálculo da Depuração da Creatinina Endógena (DCE)	37
Figura 7 - Esquema dos ensaios de Permeabilidade Intestinal ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$	39
Figura 8 - Fórmulas para o cálculo da Permeabilidade Intestinal (%)	40
Figura 9 - Distribuição dos ratos em relação ao score para fibrose (METAVIR)	44
Figura 10 - Aspectos histológicos dos fígados dos animais cirróticos e não expostos ao CCl_4	45
Figura 11 - Aspectos histológicos dos intestinos dos ratos cirróticos	46
Figura 12 a e b - Aspectos histológicos dos intestinos dos ratos do grupo Indometacina	47
Figura 13 - Aspecto histológico normal de rim de rato cirrótico	48
Figura 14 - Peso dos animais ao final do experimento	49
Figura 15 - Permeabilidade Intestinal ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$ nos ratos cirróticos e não expostos ao CCl_4	52
Figura 16 - Permeabilidade Intestinal ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$ em relação à presença de ascite nos ratos cirróticos	53
Figura 17 - Permeabilidade Intestinal ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$ nos grupos de ratos cirróticos, não expostos ao CCl_4 e Indometacina	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes da Barreira Intestinal	4
Tabela 2 - Substâncias-teste mais comumente utilizadas na verificação da Permeabilidade Intestinal.....	9
Tabela 3 - Fatores possivelmente envolvidos em alterações da Barreira Intestinal	11
Tabela 4 - Entidades clínicas estudadas em relação à Permeabilidade Intestinal	14
Tabela 5 - Logística dos experimentos.....	36
Tabela 6 - Avaliação laboratorial	36
Tabela 7 - Pesos em gramas (g) dos animais cirróticos e do grupo de não expostos ao CCl ₄ , no início e no final do experimento	49
Tabela 8 - Pesos em gramas dos órgãos dos animais dos grupos de cirróticos e de não expostos ao CCl ₄	50
Tabela 9 - Valores de creatinina sérica e DCE dos ratos cirróticos	51
Tabela 10 - Permeabilidade Intestinal ao ⁵¹ Cr-EDTA nos ratos cirróticos e não expostos ao CCl ₄	52
Tabela 11 - Distribuição dos valores percentuais de Permeabilidade Intestinal ao ⁵¹ Cr-EDTA entre os ratos cirróticos, considerando-se a presença ou não de ascite.....	53
Tabela 12 - Distribuição dos valores percentuais de Permeabilidade Intestinal ao ⁵¹ Cr-EDTA entre os grupos de ratos cirróticos, não expostos ao CCl ₄ e Indometacina.....	54

RESUMO

Permeabilidade Intestinal (PI) é conceituada como a propriedade da membrana intestinal em se deixar atravessar por determinadas substâncias em um dado período de tempo. A Barreira Intestinal é formada por diversos componentes imunológicos e não imunológicos que visam evitar a exposição do organismo a elementos potencialmente nocivos. A integridade da Barreira Intestinal pode ser estimada quantitativamente pela PI a macromoléculas. A PI pode ser verificada *in vivo* de modo não invasivo através do uso de substâncias-teste que são ingeridas, recuperando-se, depois, uma fração na urina. Uma dessas substâncias é o radio-fármaco ácido etilenodiaminotetracético marcado com cromo⁵¹ (⁵¹Cr-EDTA).

Existem diversas sugestões de que uma alteração na Barreira Intestinal pode estar relacionada a um dos principais fenômenos fisiopatológicos da cirrose: a translocação bacteriana, que pode contribuir para complicações infecciosas importantes como por exemplo, a peritonite bacteriana espontânea.

O objetivo do presente estudo foi verificar a PI ao ⁵¹Cr-EDTA em ratos com cirrose induzida por Tetracloreto de Carbono (CCl₄).

Foram utilizados ratos machos, com pesos entre 150 e 180 gramas, mantidos em gaiolas de plástico com ambiente controlado. A cirrose foi induzida através de CCl₄

0,25mL/kg diluído em óleo de oliva, semanalmente, por gavagem, por 10 semanas. Foi utilizado fenobarbital adicionado à água de beber e realizada restrição alimentar de 12g/ração/rato/dia. O grupo controle foi subdividido em dois grupos: o primeiro formado por ratos que receberam somente óleo de oliva e também sofreram também restrição dietética, e o segundo por ratos que sofreram inflamação intestinal induzida por Indometacina, como controle positivo para a técnica de detecção da PI.

Quarenta e seis animais foram utilizados ao todo. Vinte e um ratos com cirrose confirmada por análise histológica, 12 ratos não expostos ao CCl₄ e 13 ratos no grupo Indometacina foram submetidos ao estudo da PI ao ⁵¹Cr-EDTA. Os valores observados de PI no grupo de ratos cirróticos foram: mediana 0,90% (percentil 25: 0,63 e percentil 75: 1,79%); e nos ratos não expostos ao CCl₄ foram: mediana de 0,90% (percentil 25: 0,60 e percentil 75: 1,52) sem haver diferença estatisticamente significativa (p= 0,65, Teste U de Mann-Whitney). Não houve diferença significativa na PI ao ⁵¹Cr-EDTA entre os ratos cirróticos com e sem ascite: mediana: 0,75% (0,46 – 1,32%) nos ratos com ascite e 0,90% (0,70 – 1,95%) nos ratos sem ascite, (p =0,295, Teste U de Mann-Whitney). O grupo Indometacina apresentou PI ao ⁵¹Cr-EDTA significativamente maior do que os outros dois grupos (p<0,001 Teste de Kruskal-Wallis)

Conclusões: o modelo experimental utilizado para induzir cirrose e a técnica de verificação da PI ao ⁵¹Cr-EDTA foram padronizados. Não houve diferença estatisticamente significativa na PI ao ⁵¹Cr-EDTA entre ratos com cirrose induzida por CCl₄ e ratos não expostos ao CCl₄, mas houve quanto ao grupo com inflamação intestinal induzida por Indometacina.

ABSTRACT

Intestinal Permeability (IP) is the property of the intestinal membrane to be crossed by some substances in a given period of time. The Intestinal Barrier is formed by several immunological and non-immunological components that aim avoiding the exposition of the organism to potentially hazardous elements. The integrity of the Intestinal Barrier can be quantitatively estimated by IP to macromolecules. IP can be verified *in vivo* non invasively using probes that must be ingested and recovered in urine after some time. One of these probes is ^{51}Cr -EDTA. There are suggestions that alterations in Intestinal Barrier can be related to one of the most important physiopathogenic features of cirrhosis: Bacterial Translocation, that contributes to important infections complications like Spontaneous Bacterial Peritonitis.

The objective of the present study was to verify IP to ^{51}Cr -EDTA in rats with Carbon Tetrachloride (CCl_4) induced cirrhosis.

Male Wistar rats weighting 150-180 g were kept in plastic cages in a controlled environment. Cirrhosis was induced using CCl_4 0.25mL/kg diluted in olive oil weekly by gavage for ten weeks. Phenobarbital was added to drinking water (350mg/L) and food was restricted to 12g/rat/day. Control animal were divided in two groups: the first formed by rats that suffered dietary restriction and received the same volume of olive oil and Phenobarbital.

Rats in the other group used Indomethacin to induce intestinal inflammation and to be positive controls for PI detection method.

Overall forty six animals were used. IP to ^{51}Cr -EDTA was performed in twenty one rats with cirrhosis confirmed by histological analysis, twelve rats not exposed to CCl_4 and thirteen rats exposed to Indomethacin. IP values for cirrhotic rats were: median 0.90% (25th percentile 0.63 and 75th percentile 1.79%). For rats no exposed to CCl_4 values were: median 0.90% (25th percentile 0.60 and 75th percentile 1.52%). There was no statistical significant difference between these groups ($p=0.65$ Mann-Whitney U test). There was no statistical significant difference between rats with or without ascites: median 0.75% (0.46-1.32%) and median 0.90 (0.70-1.95%) respectively ($p= 0.295$ Mann-Whitney U test). Indomethacin exposed rats had IP to ^{51}Cr -EDTA significantly higher than the other two groups ($p<0.001$ Kruskal-Wallis test). The experimental approach used to induce cirrhosis and to measure IP to ^{51}Cr -EDTA were both established. There was no statistical significant difference in IP to ^{51}Cr -EDTA in rats with cirrhosis induced by CCl_4 and rats non exposed to CCl_4 , but there was difference when compared to Indomethacin induced intestinal inflammation rats.

1 INTRODUÇÃO

1.1 PERMEABILIDADE INTESTINAL

1.1.1 Conceito

O conceito de Permeabilidade Intestinal (PI) se refere à propriedade da membrana em se deixar atravessar por determinadas substâncias em um período de tempo, por difusão não mediada (Travis & Menzies 1992; Bjarnason, MacPherson, Hollander 1995). Difusão não mediada significa a passagem de moléculas sob um gradiente de pressão ou concentração, porém sem o auxílio de qualquer sistema carreador, tanto ativo quanto passivo. A PI relaciona-se com a passagem de moléculas com massa molecular maior do que 150 Daltons (Da), evitando-se este termo quando há referência à permeabilidade da membrana, relacionada à passagem de íons como sódio ou cloro (Travis & Menzies 1992). Assim, também, muitas vezes, o termo PI é empregado erroneamente como Absorção, a qual é mediada ou não por carreador, porém objetiva a nutrição celular (Bjarnason, MacPherson, Hollander 1995).

O trato gastrointestinal constitui o maior local de exposição ao ambiente externo do organismo humano (DeMeo et al. 2002; Farhadi et al. 2003). O epitélio intestinal funciona como uma barreira seletiva, permitindo a passagem de substâncias nutritivas, eletrólitos e água, mas impedindo a entrada de elementos potencialmente nocivos, como antígenos, toxinas ou microorganismos (Hollander 1992; DeWitt & Kudsk, 1999; DeMeo et al. 2002; Farhadi et al., 2003). Esta função do intestino é conhecida como função de Barreira Intestinal.

A Barreira Intestinal é formada por muitos componentes que constituem mecanismos de defesa imunológicos e não imunológicos (Hollander 1992; Uil et al. 1997) – tabela (1). Os mecanismos não imunológicos consistem nos intraluminais como a acidez gástrica, a digestão proteolítica e a peristalse, e nos fatores da superfície da mucosa como a mucina e a membrana microvilositária. Os mecanismos imunológicos incluem a resposta humoral, através da ação da IgA secretória e as células mediadoras da resposta celular (tecido linfóide associado ao intestino, do original: *Gut-associated lymphoid tissue-GALT*). O *GALT* contém aproximadamente 70 a 80% de todas as células produtoras de imunoglobulinas do organismo e é um dos maiores tecidos linfóides do corpo humano. O *GALT* é formado pelas placas de Peyer, os linfócitos da lâmina própria e os linfócitos intraepiteliais. (DeWitt & Kudsk 1999). As células do Sistema Retículo Endotelial do fígado e do baço atuam como um sistema de reserva para filtrar e apreender componentes que conseguem penetrar a Barreira.

Tabela 1 - Componentes da Barreira Intestinal

1. Mecanismos não imunológicos	
Fatores intraluminais:	pH intragástrico Proteólise Peristalse intestinal
Fatores de superfície:	Mucina Membrana microvilositária
2. Mecanismos imunológicos	
Resposta humoral:	IgA secretória
Resposta celular:	Macrófagos Sistema Linfóide (linfócitos intraepiteliais, linfócitos da lâmina própria, placas de Peyer, folículos linfóides solitários)
3. Sistema de Reserva	Sistema Retículo Endotelial (fígado e baço)

Fonte: Adaptado de Sawamura, Fernandes e Troncon, 1994.

Existem evidências de que tais mecanismos formadores da Barreira Intestinal agem de maneira integrada e sinérgica, objetivando uma maior proteção contra a penetração de agentes nocivos. A formação de complexos antígeno-anticorpo, por exemplo, aumentaria a liberação de muco pelas células caliciformes (Walker 2002).

A integridade da Barreira Intestinal pode ser estimada pela PI a macromoléculas (Uil et al. 1997). As discussões em torno da PI geralmente se limitam a um componente da Barreira Intestinal que é a camada epitelial. Esta camada forma a porção física mais superficial da Barreira (Hollander 1992; DeMeo et al. 2002) e é composta por estruturas distintas: a membrana celular lipoprotéica da borda em escova dos enterócitos e o espaço paracelular com suas junções firmes. As junções firmes (*tight junctions*) são um espaço ativo e dinâmico entre as células que se abrem ou fecham e permitem a entrada de quantidades relativamente grandes de fluidos, nutrientes e compostos de tamanho médio na lâmina própria do intestino (Hollander, 1992).

1.1.2 Vias de Permeabilidade Intestinal

A hipótese clássica que explica as diferenças entre as taxas de permeabilidade é a de que poros de diferentes dimensões poderiam existir através do epitélio intestinal. Um grande número de poros menores e um menor número de poros maiores poderia explicar a maior permeabilidade a substâncias menores e vice-versa. Existiriam pelo menos 3 vias distintas de PI: para-celular, transcelular através dos poros lipofílicos e transcelular através dos poros hidrofílicos ou aquosos. O ^{51}Cr -EDTA e a lactulose utilizariam a via para-celular, ou seja, atravessariam a membrana através dos espaços entre as células (Bjarnason, Peters, Levi, 1986; DeMeo et al. 2002; Thomson et al. 2003); a L-ramnose utilizaria a via transcelular através de poros aquosos e o PEG 400 utilizaria a via transcelular através de poros lipofílicos – figura 1.

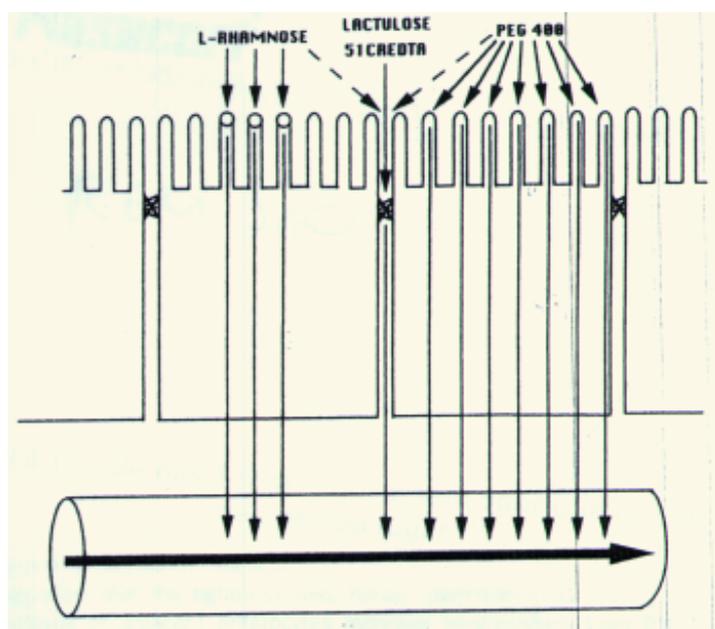


Figura 1 - Esquema demonstrando as vias de permeabilidade de acordo com a teoria dos poros. Substâncias-teste e suas prováveis vias de permeabilidade: L-Ramnose: via transcelular, poros hidrofílicos; ^{51}Cr -EDTA: via para-celular; PEG 400: via transcelular, poros lipofílicos.

Fonte: adaptado de Bjarnason, MacPherson, Hollander, 1995

Hollander, em 1992, propôs uma hipótese alternativa, mais consistente com os conhecimentos das estruturas e das funções do epitélio intestinal, em que as vias de

permeabilidade, através da camada epitelial, devem ser representadas pelas junções firmes dos espaços paracelulares e não por poros. O autor argumentou que a natureza lipofílica da membrana celular dificilmente permitiria a penetração de moléculas hidrossolúveis. Baseado no fato de que as junções firmes do epitélio das vilosidades têm um número maior de cordões estruturais e uma maior resistência elétrica do que as junções firmes das criptas, o autor propôs que a permeabilidade nessas duas regiões deveria ser diferente. As junções firmes das vilosidades, sendo mais acessíveis a componentes luminares, mas ao mesmo tempo, mais “firmes” e mais seletivas, deveriam ser atravessadas somente por moléculas de baixo peso molecular, enquanto que substâncias de maior peso molecular poderiam penetrar a Barreira epitelial somente através das junções firmes mais frouxas do epitélio das criptas que, por estarem em área de acesso limitado, permitiriam apenas a absorção de pequenas quantidades dessas moléculas (figura 2). Essa teoria foi confirmada pelo estudo de Fihn, Sjöqvist e Jodal em 2000.

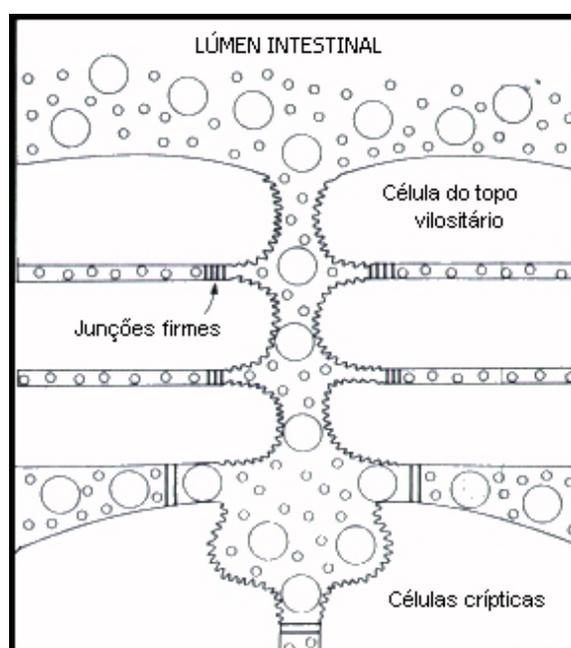


Figura 2 - Modelo proposto de diferenças entre as junções firmes do epitélio das vilosidades e das criptas intestinais

Fonte: adaptado de Hollander por Sawamura, Fernandes e Troncon, 1994.

As junções firmes são visualizadas em estudos de microscopia eletrônica de transmissão como séries de conexões focais entre as membranas plasmáticas das células (Mitic, Itallie e Anderson 2000) – Figura 3.

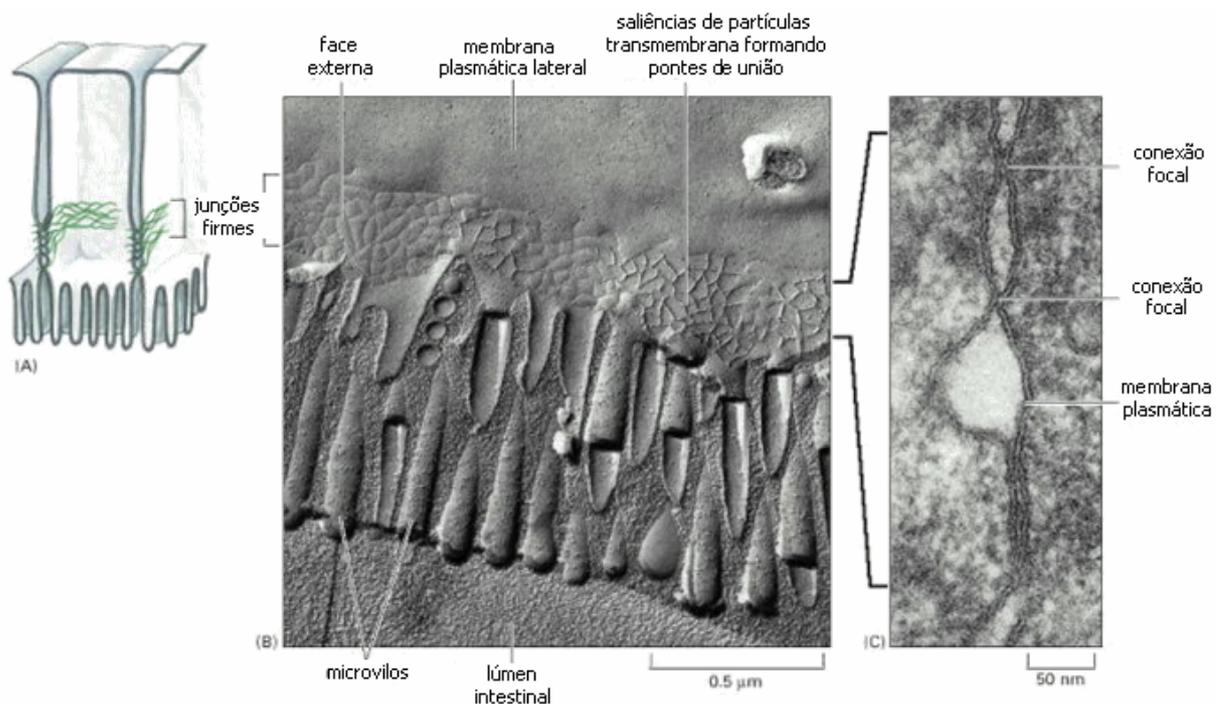


Figura 3 - A estrutura das junções firmes entre as células epiteliais do intestino delgado

a) esquematicamente; b) em uma eletro-micrografia de crio-fratura e c) microscopia eletrônica convencional.

Fonte: adaptado de: Alberts et al. 2002.

Já a microscopia eletrônica de crio fratura demonstra que esses contatos correspondem a fibrilas ramificadas e contínuas de partículas transmembrana que circundam o segmento apical da superfície lateral de cada célula – Figura 4. As fibrilas de uma célula provavelmente interagem com as fibrilas da célula adjacente para fechar o espaço paracelular e definir as características da Permeabilidade para-celular (PP). Essas fibrilas agora são conhecidas como sendo formadas por pelo menos dois tipos de proteínas transmembrana: as Ocludinas e as Claudinas (família de proteínas formada por pelo menos 20 membros). A Ocludina é uma

fosfoproteína adesiva de 65 kDa, originalmente considerada como a principal proteína seladora (Mitic, Itallie e Anderson, 2000).

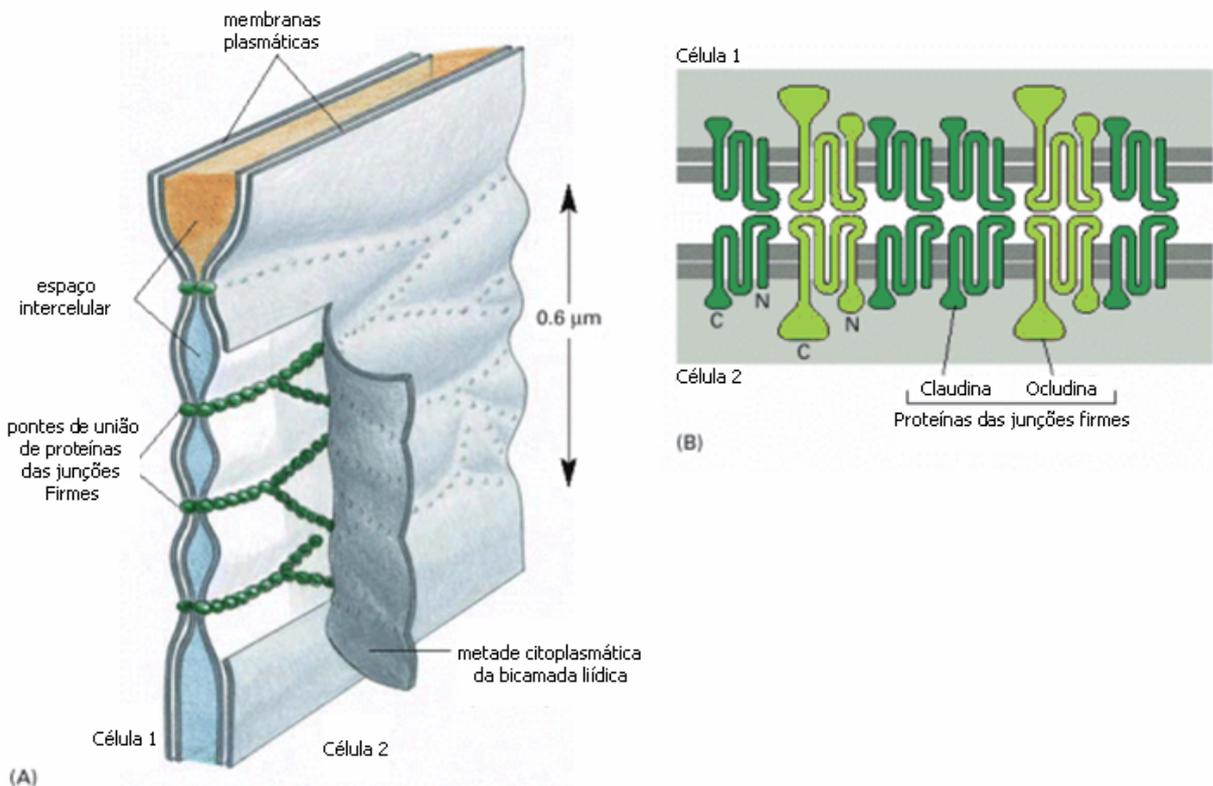


Figura 4 - Proteínas formadoras das junções firmes

Fonte: adaptado de: Alberts et al. 2002.

1.1.3 Métodos de verificação da Permeabilidade Intestinal

A PI é verificada por método não invasivo *in vivo* medindo-se a excreção urinária de substâncias-teste administradas oralmente (Hollander 1992). Uma molécula ideal para testar a PI nos seres humanos deve acumular certas características: ser hidrossolúvel, inerte, atóxica, não degradável por bactérias intestinais, ter excreção urinária rápida e completa e não ser metabolizada pelo organismo antes, durante e após a sua permeação (Hollander 1992; Bjarnason, MacPherson, Hollander, 1995). A substância teste deve ser ingerida, uma fração deve penetrar a Barreira epitelial e atingir a circulação sistêmica, sendo captada rapidamente

pelos rins e excretada para a urina em proporção direta à quantidade que penetrou a Barreira epitelial. Deve apresentar, portanto, um alto *clearance* renal, de modo que a excreção renal reflita a absorção intestinal desses marcadores.

As substâncias-teste mais comumente utilizadas são: açúcares (lactulose, manitol, l-ramnose, etc.); polímeros de etileno glicol (PEG 400) e marcadores radioativos: $^{51}\text{Cr-EDTA}$ e $^{99\text{m}}\text{-Tc-DTPA}$ - tabela (2).

Tabela 2 - Substâncias-teste mais comumente utilizadas na verificação da Permeabilidade Intestinal

TIPOS DE SUBSTÂNCIAS-TESTE:	EXEMPLOS:	Massa Molecular (Da)
Açúcares	lactulose,	342
	manitol,	182
	l-ramnose,	164
	celobiose	342
	rafinose	504
Polímeros de Etileno-glicol	PEG 400	194 - 502
Radioativos	$^{51}\text{Cr-EDTA}$	359
	$^{99\text{m}}\text{-Tc-DTPA}$	549

Fonte: adaptado de Travis & Menzies 1992

1.1.4 Fatores que alteram a Permeabilidade Intestinal

Os principais mecanismos que afetam a PI estão listados na tabela 3.

A manutenção da integridade e da natureza dinâmica da Barreira intestinal é um processo que requer energia. Assim, além do dano físico que pode lesar as células epiteliais e alterar a função da Barreira, a diminuição de trifosfato de adenosina (ATP) também pode comprometer a função de Barreira intestinal (DeMeo et al. 2002).

Um outro possível mecanismo envolve as citocinas pró-inflamatórias. Estudos *in vitro* sugerem que as citocinas podem mediar esses efeitos na permeação através de alterações na produção de óxido nítrico (DeMeo et al. 2002).

Existem evidências sugerindo que o sistema imune tem um papel importante na modulação da PI. Duas citocinas, o interferon-gama (IFN γ) e o fator de necrose tumoral- α (TNF α) são encontrados em altos níveis na mucosa intestinal envolvida na doença inflamatória intestinal. Essas mesmas citocinas também diminuem a função da Barreira em cultura de células intestinais. Tais alterações na permeabilidade para-celular causadas pelo TNF α e IFN-gama são associadas com aumento na fosforilação da cadeia leve da miosina (Nusrat, Turner e Madara 2000; Clayburg, Shen e Turner, 2004).

Baixos níveis de óxido nítrico seriam importantes para a manutenção da função de Barreira intestinal. Os mecanismos pelos quais uma superprodução de óxido nítrico induziriam disfunção da Barreira intestinal seriam: oxidação de proteínas, S-nitrosilação, ativação do GMP cíclico (GMPc) e depleção de ATP celular (Farhadi et al, 2003).

Os mastócitos parecem ter um papel muito importante na regulação da PI, induzida por várias condições clínicas (Farhadi et al, 2003). Tais células estariam envolvidas na patogênese da alteração da PI induzida por estresse, alergia alimentar e processos inflamatórios intestinais.

Também existem sugestões de que as espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) estejam envolvidas na alteração da função de Barreira Intestinal (Farhadi et al, 2003).

O álcool pode afetar a integridade da mucosa gastrointestinal através de citotoxicidade direta (especialmente em doses maiores, ocorrendo no lúmen imediatamente após a ingestão) ou por alterações na função de Barreira intestinal em doses não citotóxicas. O etanol parece afetar as junções firmes através de lesão ao citoesqueleto. Existem sugestões de que a citotoxicidade induzida pelo uso de álcool seja mediada através do excesso de óxido nítrico e seus metabólitos como o peroxinitrito (Farhadi et al, 2003).

O aumento na PI que resulta do uso de vários oxidantes pode ser prevenido com o uso

de EGF (fator de crescimento epidérmico) e TGF- α (fator de crescimento transformador alfa).

A proteção dos microtúbulos e da Barreira intestinal necessita da ativação da transdução do sinal da proteína quinase C e da normalização da concentração de cálcio citoplasmático. A ativação da proteína quinase C pode aumentar a permeabilidade transepitelial, talvez através da modulação do estado de fosforilação da ocludina. O peptídeo semelhante ao glucagon-2 (GLP-2) aumenta a função da Barreira intestinal afetando tanto as vias para-celular quanto transcelular (Thomson et al. 2003).

Tabela 3 - Fatores possivelmente envolvidos em alterações da Barreira Intestinal

MECANISMO/SUBSTÂNCIA	REFERÊNCIAS	Efeito sobre a PI
Álcool	Farhadi et al, 2003	↑
EGF	Thomson et al. 2003	↓
Estresse	Meddings & Swain 2000 Söderholm & Perdue 2001 Thomson et al. 2003	↑
Estresse oxidativo	Farhadi et al, 2003	↑
Giardíase	Scott et al. 2002	↑
GLP-2	Benjamin et al. 2000 Thomson et al. 2003	↓
Glutamina	DeWitt & Kudsk, 1999 Thomson et al. 2003	↓
IFN γ	Nusrat, Turner e Madara 2000 Thomson et al. 2003 Clayburg, Shen e Turner, 2004	↑
IGF-I	Nusrat, Turner e Madara 2000 Thomson et al. 2003	↑
IGF-II	Nusrat, Turner e Madara 2000	↑
IL-1	Nusrat, Turner e Madara 2000	↑
IL-13	Nusrat, Turner e Madara 2000	↑
IL-4	Nusrat, Turner e Madara 2000 Thomson et al. 2003	↑
Infecção por Rotavírus	Dickman et al. 2000	↑
Mastócitos	Santos et al. 2001 Farhadi et al, 2003	↑

Óxido nítrico	Farhadi et al, 2003	↑
TGF- α	Nusrat, Turner e Madara 2000	↑
TGF- β 1	Nusrat, Turner e Madara 2000 Thomson et al. 2003	↓
TNF α	Schmitz et al. 1999 Nusrat, Turner e Madara 2000 Thomson et al. 2003 Clayburg, Shen e Turner, 2004	↑

Onde:

IFN γ : interferon-gama

TNF α : fator de necrose tumoral-alfa

TGF- β 1: fator de crescimento transformador-beta 1

IL-1: interleucina 1

IL-4: interleucina 4

IL-13: interleucina 13

TGF- α : fator de crescimento transformador-alfa

EGF: fator de crescimento epidérmico

IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina I

IGF-II: fator de crescimento semelhante à insulina II

GLP-2: peptídeo semelhante ao glucagon

↑: aumento na PI (piora da Barreira intestinal)

↓: diminuição na PI (promoção da Barreira intestinal)

1.1.5 Utilidade clínica da verificação da Permeabilidade Intestinal

Várias entidades clínicas já foram estudadas em relação à PI. Existem indícios de que alterações na Barreira Intestinal podem favorecer a entrada desproporcional de antígenos. Isto somado a uma alteração na regulação imune, poderia iniciar uma super ativação do sistema imune levando a desordens gastrointestinais ou inflamatórias sistêmicas. Portanto, é compreensível que uma grande variedade de doenças gastrointestinais e sistêmicas sejam associadas com alterações na PI – tabela (4). Ainda não se sabe se a PI anormal é a causa ou um efeito de muitas dessas situações (Farhadi et al, 2003).

Numerosos estudos em humanos demonstram que uma ruptura na Barreira Intestinal poderia mimetizar Doença de Crohn em atividade e se correlaciona com achados em modelos animais. Também já se observou que, em pacientes assintomáticos clinicamente, um aumento na PI pode anteceder uma reagudização da doença em até um ano, indicando que um defeito na PI poderia ser um evento precoce na reativação da doença (Clayburgh, Shen e Turner 2004). Alguns trabalhos também demonstraram um aumento na PI em familiares assintomáticos de pacientes com Doença de Crohn (Peeters et al. 1997).

Defeitos na PI associados à má absorção são também relatados na Doença Celíaca sintomática. Os primeiros estudos de PI e Doença Celíaca iniciaram na década de 80 com Bjarnason e colaboradores, introduzindo o uso do $^{51}\text{Cr-EDTA}$ para verificação da PI. Schulze et al. (1998) estudaram a estrutura das junções firmes em crianças com Doença Celíaca aguda e tratada. Verificaram uma diminuição no número de pontes de união das junções firmes em todas as regiões ao longo do eixo vilo-crípta nos pacientes com doença aguda. Nos pacientes em tratamento, o número de pontes de união não retornou completamente ao normal, apesar de ser considerado como mínima alteração. Alterações nas junções firmes em pacientes com Doença Celíaca já haviam sido descritas por Madara e Trier, em 1980.

Em 2004, Secundulfo et al. descreveram alterações na PI e na mucosa intestinal de 46 pacientes com Diabete Melito Insulino Dependente, sem Doença Celíaca. Eles verificaram aumento estatisticamente significativo na relação lactulose/manitol em 22 dos 46 pacientes com Diabete, porém não encontraram alterações na microscopia óptica dos intestinos. Em microscopia eletrônica, entretanto, os autores encontraram alterações na porção apical dos enterócitos caracterizada por rarefação e desaparecimento parcial dos microvilos e microvilos aberrantes. Também verificaram vacúolos no citoplasma e mitocôndrias edemaciadas, assim como aumento nos espaços intercelulares acompanhado por alterações nas junções firmes.

Tabela 4 - Entidades clínicas estudadas em relação à Permeabilidade Intestinal

ENTIDADE CLÍNICA	TÉCNICA EMPREGADA	REFERÊNCIA
Alcoolismo	⁵¹ Cr-EDTA Lactulose/Manitol	Bjarnason et al. 1984 Hirsch et al. 1997 Keshavarzian et al, 1999 Thomson et al. 2003
Diabete Melito tipo I	Lactulose/Manitol	Secondulfo et al. 2004
Diarréia persistente	⁵¹ Cr-EDTA	Sawamura et al. 1997
Doença Celiaca	⁵¹ Cr-EDTA	Menzies et al 1979 Madara & Trier 1980 Bjarnason et al. 1983a Martin et al. 1994 Schulze et al. 1998
Doença Inflamatória Intestinal	⁵¹ Cr-EDTA	Bjarnason et al. 1983b Troncon et al. 1996 Peeters et al. 1997
Doenças diarréicas	Glicosamina, Manitol, Melibiose e Lactulose Inositol, Sorbitol, Glicose e Lactose	Barboza Jr et al. 1999
Estrongiloidíase	⁵¹ Cr-EDTA	Werneck-Silva et al. 2001
Fibrose Cística	Lactulose/Manitol	Van Elburg et al. 1996
Kwashiorkor	Lactulose/L-ramnose	Brewster et al. 1997
Síndrome de Behçet	⁵¹ Cr-EDTA	Fresko et al. 2001
Urticária crônica	Sacarose, Lactulose/Manitol	Buhner et al. 2004
Uso de AINES (antiinflamatórios não esteróides)		
Naproxeno	⁵¹ Cr-EDTA	Aabakken et al. 1990
Aspirina, indometacina e ibuprofeno	⁵¹ Cr-EDTA	Bjarnason et al. 1986

1.2 ⁵¹CR-EDTA

O ácido etilenodiaminotetracético marcado com Cromo⁵¹ (⁵¹Cr-EDTA) é um marcador radioativo utilizado em estudos de perfusão intestinal e taxas de filtração glomerular. É uma molécula inerte, hidrossolúvel, estável e possui propriedades físico-químicas que a confinam a localizações extracelulares (Aabakken & Osnes 1989). É uma molécula que reproduz, em vários aspectos, as características de uma substância-teste ideal para a avaliação da PI. Possui uma meia-vida de 27 dias e peso molecular de 359 Daltons (Da). Uma vez alcançada a circulação sistêmica, o ⁵¹Cr-EDTA é integralmente excretado por via glomerular renal. É um teste simples, bastante sensível, com radioatividade baixa (Sawamura et al. 1997). O ⁵¹Cr-EDTA não interfere no metabolismo do intestino. Em estudos com ratos, é recomendado que o tempo de coleta de urina seja de 5 horas, para evitar a contaminação com o ⁵¹Cr-EDTA oriundo das fezes (Bjarnason et al., 1985). Esses autores também verificaram não haver influência do tempo de trânsito intestinal sobre a excreção urinária do ⁵¹Cr-EDTA.

O ácido dietilenotriaminopentacético marcado com Tecnécio⁹⁹ (^{99m}Tc-DTPA) é similar em forma e características ao ⁵¹Cr-EDTA e os comentários sobre as propriedades de permeação são aplicáveis a ambas as substâncias (Hollander 1992).

1.3 CIRROSE EXPERIMENTAL

Cirrose é definida do ponto de vista histológico pela presença de septos fibrosos que difusamente envolvem o fígado e subdividem o parênquima em nódulos (Wanless, 1999). Há necrose do parênquima, seguida por proliferação nodular dos hepatócitos remanescentes. A fibrose é uma resposta comum à lesão crônica, de diferentes causas, definida por um aumento nos constituintes da matriz extracelular que coletivamente irão formar a cicatriz hepática (Friedmann 1993).

Dentre os vários modelos de indução de cirrose em animais, Cameron e Karunaratne descreveram em 1936 as alterações histológicas decorrentes do uso crônico do Tetracloreto de Carbono (CCl_4), em ratos. Desde então muito foi acrescentado na melhora do entendimento sobre os mecanismos de lesão e regeneração do fígado, utilizando-se essa e outras hepatotoxinas. Nenhum modelo experimental, porém, é totalmente fidedigno à doença em seres humanos (Tsukamoto, Matsuoka e French, 1990).

O Tetracloreto de Carbono (CCl_4) é um hidrocarboneto halogenado, sendo uma das mais antigas e conhecidas toxinas usadas na indução experimental de fibrose hepática e cirrose (Tsukamoto, Matsuoka e French, 1990). Pode ser administrado por via inalatória (Cremonese et al. 2001), por injeção subcutânea (Zhang et al. 2003) ou intraperitoneal (Rhoden et al. 1991) ou, ainda, por gavagem (Proctor & Chatamra 1982; Rosa et al. 1991). Pensa-se que seu mecanismo de ação seja através da sua bioativação pelo sistema microsomal da citocromo P-450 para o radical livre Triclorometil (CCl_3) e depois sua conversão para o radical Triclorometil peroxi (CCl_3O_2). Os radicais livres, então, reagiriam com os ácidos graxos poliinsaturados para propagar uma reação em cadeia levando à peroxidação lipídica (Rao, Mangipudy, Mehendale, 1997; Tsukamoto, Matsuoka, French, 1990; Losser & Payen 1996). A lesão primária é caracterizada por necrose em zona 3, sendo dose-dependente. O fenobarbital, por ser um indutor da citocromo P-450 é amplamente utilizado para acentuar os efeitos tóxicos do CCl_4 (McLean et al. 1969).

Proctor e Chatamra, em 1982, apresentaram um modelo de cirrose experimental, até hoje utilizado como referência, em que os acréscimos às doses de CCl_4 são definidos pelo ganho ou não de peso dos animais, de modo que haja toxicidade suficiente para gerar uma resposta sem levar à morte. Infelizmente, não foi definido por esses autores os níveis críticos de variações de pesos para serem seguidos. Em 1991, Rosa et al., em nosso país, apresentaram uma sugestão mais prática de modelo, utilizando níveis definidos de variações de pesos para

ajuste das doses e dispensando o uso de anestesia para a administração da toxina aos ratos.

1.4 PERMEABILIDADE INTESTINAL E CIRROSE

Cirrose representa o estágio final de qualquer hepatopatia crônica (Garcia-Tsao e Wiest, 2004). Infecções bacterianas são mais comuns em pacientes com cirrose e são responsáveis por mais de um quarto dos óbitos nesse grupo (Ramachandran & Balasubramanian 2001).

Dois fatores são preditivos do desenvolvimento de infecções bacterianas na cirrose: a gravidade da hepatopatia e a presença de hemorragia gastrointestinal (Garcia-Tsao & Wiest, 2004). Pacientes com cirrose descompensada apresentam uma maior incidência de infecções do que cirróticos compensados.

O espectro de bactérias que causam infecções em pacientes cirróticos em trabalhos mais recentes mostra uma maior taxa de infecções por cocos Gram positivos, provavelmente devido a um aumento no número de procedimentos mais invasivos e ao uso de profilaxia antimicrobiana. Entretanto, as infecções mais comuns, a Peritonite Bacteriana Espontânea (PBE) e a infecção do trato urinário, ainda são causadas principalmente por bacilos Gram negativos (Garcia-Tsao & Wiest, 2004).

Estudos recentes têm sugerido um papel central para a disfunção intestinal na patogênese da sepse relacionada à cirrose e à hipertensão porta. Três fatores, muito provavelmente agindo em conjunto, têm sido implicados: a alteração da motilidade intestinal, o supercrescimento bacteriano e a translocação bacteriana (Quigley, 1996) (Figura 5).

Translocação Bacteriana (TB) é definida como a passagem de bactérias viáveis oriundas do lúmen intestinal para linfonodos mesentéricos e outros locais extra-intestinais (Garcia-Tsao, 2001). A TB é considerada como o principal mecanismo patogênico da PBE.

O intestino parece ser a principal fonte de bactérias na PBE, dada a predominância de germes Gram negativos isolados de líquidos de ascite e a significativa melhora após o uso de antimicrobianos orais não absorvíveis.

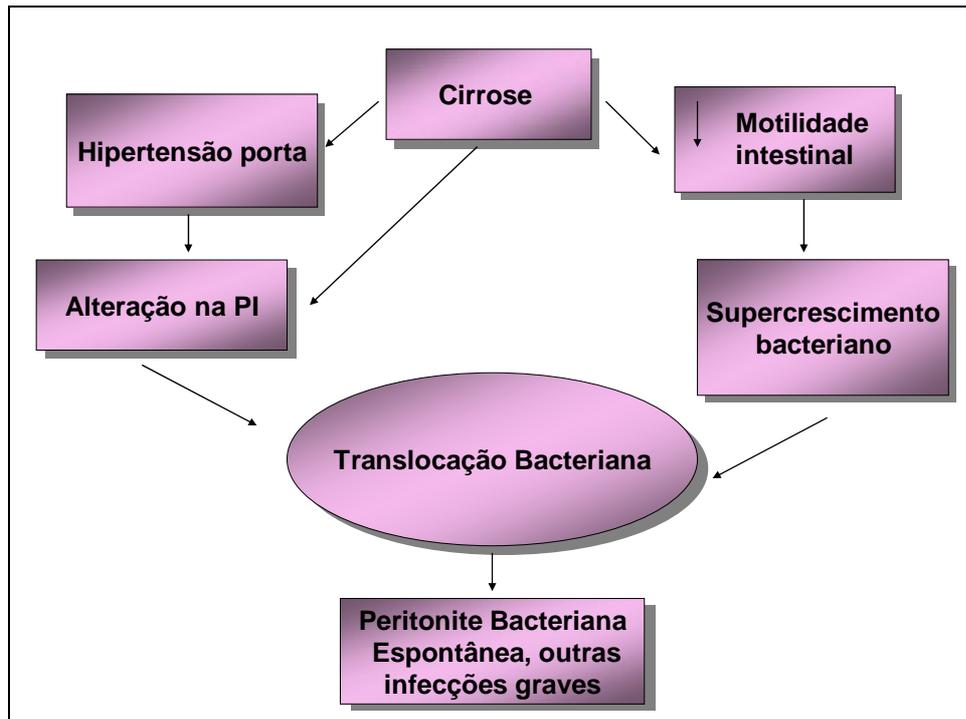


Figura 5 - Possíveis inter-relações responsáveis pelas complicações infecciosas na cirrose

A presença de bacteremia em metade dos casos de PBE e a ocorrência de bacteremia isolada em pacientes cirróticos sem um foco primário evidente de infecção (bacteremia espontânea) sugerem que as bactérias atingem a circulação sistêmica antes de infectarem o líquido peritoneal (Garcia-Tsao & Wiest, 2004).

A prevalência de PBE, segundo Strauss (2003), varia entre 7 e 25%, enquanto o conjunto de infecções bacterianas, em geral, atinge prevalências entre 15 a 47% em pacientes cirróticos. Em nosso meio, Vieira et al. (2005), estudando 31 pacientes pediátricos com ascite por hipertensão porta, na sua maioria cirróticos, verificaram uma prevalência de PBE de 19,5%, sendo os patógenos mais comumente encontrados *Escherichia coli* e *Klebsiella*

pneumoniae.

Um estudo realizado em ratos com cirrose induzida por CCl₄ demonstrou que 56% dos animais cirróticos com ascite apresentaram TB, o que não aconteceu com os animais cirróticos sem ascite e controles (Garcia-Tsao et. al, 1995). Os animais com ascite demonstraram menores níveis séricos de albumina e maiores níveis séricos de bilirrubinas em comparação com os animais cirróticos sem ascite, sugerindo uma pior função hepática. Garcia-Tsao & Wiest (2004) sugerem que, devido à falta de aumento significativo nas taxas de TB em ratos com hipertensão porta com fígados normais e em animais cirróticos sem ascite, a hipertensão porta não seja um fator fundamental na patogênese da TB na cirrose e sim a insuficiência hepática. Os autores lembram, também, que os pacientes com cirrose descompensada apresentam maiores alterações da imunidade, como por exemplo: diminuição da atividade bactericida pelas células fagocíticas, menores níveis de complemento sérico e alteração na atividade do Sistema Retículo Endotelial (representado nas células de Kupffer do fígado).

Estudos experimentais demonstraram que ratos com cirrose, ascite e TB apresentam maiores taxas de supercrescimento bacteriano em comparação com animais sem TB (Pérez-Paramo et al. 2000). Na ausência de supercrescimento bacteriano, a TB acontece raramente – 0-11% (Garcia-Tsao & Wiest, 2004). Entretanto, a TB não ocorre em mais de metade dos animais com supercrescimento bacteriano, o que sugere que o supercrescimento bacteriano seria necessário porém não suficiente para o aparecimento de TB e que algum outro fator, por exemplo, uma diminuição na imunidade, possa representar um papel importante. O supercrescimento bacteriano tem sido relacionado com diminuição do trânsito intestinal, o que foi demonstrado em ratos cirróticos e em pacientes com cirrose, em particular aqueles com doença mais grave (Reilly et al, 1991; Madrid, Cumsille e Defilippi, 1997; Ramachandran & Balasubramanian, 2001; Garcia-Tsao & Wiest, 2004).

1.4.1 Alterações Intestinais na Cirrose

Tem-se demonstrado que o trato gastrointestinal é afetado na vigência de cirrose e existem anormalidades na mucosa secundárias à hipertensão porta (Norman et al., 1980; Nagral et al, 1993; Hashimoto e Ohyanagi, 2002; Xu, Wu e Li, 2002). O transporte de nutrientes através do intestino também é alterado, como verificado no estudo de Castilla-Cortázar et al. (1997), em que a absorção de D-galactose foi significativamente menor em ratos com cirrose induzida por CCl₄ (modelo inalatório) em relação aos ratos do grupo controle. Também verificaram um aumento no comprimento dos microvilos. Tais alterações foram revertidas com o uso de fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-1). O IGF-1 estimula a síntese protéica e de DNA nas células intestinais e evidências sugerem que este hormônio exerce atividades tróficas no intestino. Existem relatos de que os níveis de IGF-1 estão diminuídos na vigência de cirrose.

Mais recentemente, em 2004, esse mesmo grupo de pesquisa realizou um estudo utilizando ratos com cirrose avançada (Castilla-Cortázar et al. 2004). Eles pesquisaram a captação da D-Galactose e vários aminoácidos na borda em escova dos enterócitos em ratos cirróticos, cirróticos tratados com IGF-1 e controles. Também realizaram análise de microscopia eletrônica dos jejunos. Encontraram alterações ultraestruturais semelhantes ao que já foi relatado no parágrafo anterior, porém 30% dos ratos cirróticos com ascite apresentaram microvilos mais curtos, irregulares, parcialmente fusionados. Estas alterações também foram normalizadas com o uso de IGF-1.

Na década de 60, já havia interesse em se pesquisar as alterações histológicas da mucosa intestinal em pacientes com cirrose. Astaldi e Strosselli (1960) realizaram biópsias intestinais por cápsula em 10 pacientes com cirrose avançada e descreveram algumas alterações: intensa estase, principalmente no eixo dos vilos; edema dos vilos, com

degeneração da membrana basal e separação do epitélio de seu estroma; degeneração do epitélio e seu estroma; inflamação intersticial; substituição fibrosa do estroma; destruição das paredes dos vasos e dilatação das criptas de Galeazzi-Lieberkühn, com degeneração e atrofia do epitélio críptico e fibrose. Eles já sugeriram naquela época que esta estase da mucosa intestinal poderia ser resultado da estase portal.

Em 1974, Portela-Gomes et al., estudando biópsias jejunais de pacientes cirróticos, na sua maioria por uso crônico de álcool, encontraram poucas alterações na microscopia ótica com aumento da infiltração celular, principalmente de linfócitos e plasmócitos, edema e congestão vascular em alguns casos. Porém, ao estudo de microscopia eletrônica, todos os casos demonstraram irregularidades na distribuição dos microvilos que eram esparsos, distorcidos, encurtados ou edemaciados.

Posteriormente, em 1997, Misra et al. estudaram as características histológicas dos intestinos delgados de 58 pacientes com cirrose e 30 controles, obtendo biópsias de duodeno e jejuno por endoscopia. Todos os pacientes apresentavam varizes de esôfago e 46% apresentava gastropatia hipertensiva. Os principais achados foram: vasos dilatados com paredes espessadas, sendo o espessamento mais freqüente do que a dilatação; edema da lâmina própria; diminuição da razão vilos/cripta e espessamento da muscular da mucosa. Esse espessamento e o aumento do tecido fibroso na lâmina própria mostraram um aumento da quantidade de colágeno através da coloração de van Gieson. Isso se deve, mais provavelmente, segundo os autores, à isquemia crônica da mucosa em pacientes com hipertensão porta.

Ramachandran et al. (2002), estudando ratos com cirrose induzida por CCl₄, verificaram que a mucosa intestinal mostrou áreas de dano epitelial vilositário, e as células cobrindo os topos dos vilos mostraram encurtamento, desarranjo nuclear e mudanças degenerativas em seus citoplasmas. Ocorreu uma diminuição da viabilidade das células de

todas as populações de enterócitos nos animais cirróticos, em comparação com os controles. Os radicais livres de oxigênio são conhecidos como tendo um papel importante no dano epitelial intestinal, o que pode alterar a função de Barreira Intestinal e facilitar a translocação bacteriana e a liberação de endotoxinas. A enzima xantina oxidase é uma das principais fontes de radicais livres na mucosa intestinal e estava significativamente elevada nos ratos cirróticos e quase indetectável nos controles. Também foi detectado um aumento na peroxidação de lipídios nos enterócitos dos ratos cirróticos, assim como uma diminuição na forma reduzida da glutathiona e nos níveis de catalase, indicando a presença de estresse oxidativo. Os autores também verificaram uma diminuição do transporte de glicose pela membrana da borda em escova.

Estudando microscopia eletrônica em espécimes de biópsias de duodeno distal de pacientes com cirrose avançada, Such et al. (2002) encontraram um espaço extra-celular marcadamente dilatado entre os enterócitos e um reduzido número de microvilos, que eram mais curtos e mais largos, apesar de não encontrarem alterações nas junções firmes.

Maksan et al. (2005) recentemente publicaram um estudo da microcirculação intestinal em ratos com cirrose induzida por CCl₄ através da técnica de videomicroscopia intravital. Com esta técnica, é possível quantificar-se o fluxo sanguíneo da mucosa e a cinética das hemácias e o contato dos leucócitos com o endotélio. Eles verificaram marcada vasodilatação arterial no fígado e no mesentério. Entretanto, não foi evidenciada alteração no fluxo das arteríolas centrais dos vilos.

1.4.2 O papel da Hipertensão Porta nas alterações intestinais na Cirrose

Segundo Xu, Wu e Li (2002), na hipertensão porta, o fluxo sanguíneo intestinal se dá de uma forma mais lenta, e os capilares e veias submucosos estão ectásicos e congestos. O

tempo de transporte de oxigênio e de nutrientes para a mucosa é prolongado. A microcirculação da mucosa intestinal é perturbada e ocorre isquemia da mucosa da parede. Essa mudança no fluxo sanguíneo leva à hiperemia, ao edema e à erosão na mucosa. As células epiteliais da mucosa e da submucosa demonstram alterações patológicas que enfraquecem a função de Barreira do intestino e aumentam a PI. Eles estudaram a PI à lactulose e ao manitol e a taxa lactulose/manitol em 20 pacientes cirróticos com hipertensão porta. Foi verificado um aumento significativo na excreção de lactulose e lactulose/manitol nos pacientes cirróticos em relação aos controles. Não houve diferenças na excreção do manitol. Esse aumento na excreção urinária dos marcadores de PI melhorou após tratamento cirúrgico para a hipertensão porta. Foi encontrada uma correlação entre a pressão porta e a PI.

Nagral et al., em 1993, estudaram 26 pacientes com hipertensão porta de diversas etiologias. Quatorze pacientes apresentavam ascite e 16 apresentavam circulação colateral. Todos os pacientes foram submetidos à endoscopia digestiva alta e a biópsias de jejuno através de cápsula de Watson. Eles observaram aumento no tamanho dos vasos do fundo gástrico, do antro e do jejuno. No jejuno também observaram um aumento no número dos vasos (mais de 6 por vilo) em 84% dos pacientes. Houve uma correlação positiva entre a presença de jejunopatia congestiva com a gastropatia congestiva do fundo histológica. Não houve correlação entre o calibre da veia porta e a presença de jejunopatia congestiva ou evidência histológica de gastropatia do fundo ou do antro. Também não foi encontrada correlação no subgrupo de pacientes cirróticos da jejunopatia congestiva com escore de Child-Pugh.

Hashimoto e Ohyanagi (2002), estudando translocação bacteriana em ratos com hipertensão porta aguda (após dois dias), verificaram aumento da excreção urinária de fenolftaleína e na análise histológica encontraram congestão venosa, edema, isquemia com atrofia da mucosa e diminuição da altura dos vilos. A translocação bacteriana ocorreu em 15%

dos animais no grupo controle e em 92% dos ratos com hipertensão porta. Os autores também verificaram a atividade da fosfatase alcalina da borda em escova dos enterócitos, um teste que indica a presença de supercrescimento bacteriano, e verificaram ser esta diminuída nos ratos com hipertensão porta. O supercrescimento bacteriano resulta em uma perda da atividade de tal enzima na borda em escova.

1.4.3 Estudos clínicos e experimentais evidenciando alterações na Permeabilidade Intestinal na Cirrose

Em 1985, Budillon et al. utilizando diferentes açúcares com várias rotas de permeabilidade, estudaram 12 pacientes com cirrose e 8 controles e não encontraram diferenças quanto à PI nos dois grupos.

Romiti et al., em 1990, estudaram 25 pacientes com cirrose, sendo 12 com escore de Child-Pugh A, 12 com escore B e um com escore C quanto à excreção urinária e à dosagem sérica dos marcadores: D-xilose, 3-0-metil-D-glicose, L-ramnose e lactulose. Quinze pacientes apresentavam ascite e/ou varizes de esôfago. Os pacientes com ascite foram tratados previamente à entrada no estudo, de modo que no momento do estudo da PI não apresentavam ascite clinicamente significativa. Os pacientes foram avaliados do ponto de vista nutricional e foi realizada dosagem da α 1-antitripsina fecal e esteatócrito. Esteatorréia foi verificada em 8 dos 13 pacientes com evidências de má nutrição e em apenas 3 dos 12 pacientes com estado nutricional normal, o que coincidiu com a classificação de Child-Pugh: estaetorréia foi mais freqüente nos grupo B e C. A presença de hipertensão porta não influenciou a presença da esteatorréia. A excreção urinária da lactulose foi levemente maior nos pacientes cirróticos (no limite superior da normalidade), tornando a taxa lactulose/L-ramnose também mais elevada nos pacientes cirróticos do que nos controles. O *clearance* da α 1-antitripsina fecal foi

semelhante nos dois grupos. Os autores concluíram que os pacientes apresentaram função intestinal normal, apesar da presença de esteatorréia.

Estudando a PI à fenolftaleína em pacientes cirróticos e pacientes submetidos a diversas cirurgias abdominais e controles, Toh et al (1997) encontraram uma maior excreção renal deste marcador nos pacientes com cirrose.

Fuchs et al., em 1997, publicaram uma série de 66 pacientes com cirrose e verificaram a PI à celobiose/manitol e verificaram que 33% dos pacientes com PBE e 46% dos pacientes sem PBE apresentaram aumento da PI.

O estudo de Piquet et al., (1997) em que 51 pacientes com cirrose e 46 pacientes sem cirrose tiveram a PI verificada através da taxa lactulose/manitol, é bastante citado na literatura. Eles encontraram aumento significativo da PI no grupo de pacientes com cirrose (somente em 29% dos pacientes) e não encontraram correlação entre a PI e o gradiente de hipertensão porta. No grupo de pacientes cirróticos com aumento na PI, o escore de Child-Pugh foi significativamente maior do que em relação ao grupo de pacientes cirróticos com PI normal.

Campillo et al. (1999) estudaram 80 pacientes cirróticos, quanto à PI à lactulose, ao manitol e à taxa lactulose/manitol. Muitos desses pacientes apresentavam complicações sépticas como bacteremia e PBE. A excreção de manitol estava significativamente menor nos pacientes cirróticos; e a excreção de lactulose não apresentou diferenças entre os dois grupos. Naturalmente, a taxa lactulose/manitol foi significativamente maior no grupo de pacientes cirróticos. No grupo de pacientes cirróticos sépticos, a excreção de manitol foi ainda menor do que nos cirróticos não sépticos e nos controles; enquanto a excreção de lactulose também não apresentou diferenças entre os grupos. A taxa lactulose/manitol foi significativamente maior no grupo de cirróticos sépticos em relação aos não sépticos e controles. Também houve uma tendência de maior taxa de lactulose/manitol nos pacientes com ascite, mas sem

diferença estatisticamente significativa.

Verificando a excreção urinária ao ^{99m}Tc -DTPA em 44 pacientes com cirrose e comparando com um grupo controle de 10 voluntários saudáveis, Ersöz et al. (1999) verificaram um aumento significativo na excreção do raio-fármaco no grupo de pacientes cirróticos e não houve diferenças quanto à divisão dos pacientes de acordo com o escores de Child-Pugh. Nesse trabalho, não foram encontradas diferenças quanto à PI e à presença ou não de TB.

O estudo de Pérez-Paramo et al (2000), já citado anteriormente, demonstrou uma excreção urinária ao ^{99m}Tc -DTPA em ratos com cirrose induzida por CCl_4 significativamente maior do que no grupo controle e similar nos animais cirróticos com ou sem supercrescimento bacteriano. Entre os ratos com supercrescimento bacteriano, a alteração na PI foi de maior magnitude nos animais com TB em relação aos animais sem TB. A TB aos linfonodos mesentéricos necessitou da presença simultânea de supercrescimento bacteriano e grave distúrbio na Barreira Intestinal.

Em 2001, Fujii et al. verificaram a PI à lactulose e à l-ramnose em 35 pacientes com cirrose e 6 controles, dosando esses marcadores na urina e no sangue. As concentrações sanguíneas e urinárias da lactulose e a taxa de excreção lactulose/l-ramnose foram significativamente maiores no grupo com cirrose. Não houve diferença entre os grupos em relação à classificação de Child-Pugh. A PI também diferiu significativamente entre os pacientes cirróticos com e sem colopatía portal, indicando uma extensão dos efeitos da hipertensão porta no trato gastrointestinal inferior.

Taylor et al. (2002) estudaram a PI de crianças com hepatopatía crônica e hipertensão porta extra-hepática utilizando como substância teste uma solução contendo 3-O-metil-D-glicose, D-Xilose, L-ramnose e melibiose. Encontraram uma significativa má-absorção de monossacarídeos em ambos os grupos, sugerindo que a hipertensão porta tenha sido o

principal fator para o seu desenvolvimento. Eles também constataram um aumento na PI indicada pela taxa de excreção urinária da melibiose/L-ramnose no grupo de hepatopatia crônica.

Pascual et al. (2003) estudaram 79 pacientes cirróticos e 25 controles quanto à PI utilizando a relação lactulose/manitol. Entre os pacientes, 55 apresentaram ascite, 15 apresentaram encefalopatia e 5 já haviam apresentado PBE previamente. O percentual de recuperação urinária de lactulose e a taxa lactulose/manitol foram significativamente maiores nos pacientes cirróticos em relação ao controles. Não houve diferença quanto à PI em relação ao escore Child-Pugh, porém houve uma tendência a uma menor excreção de manitol com a piora da função hepática, e os autores sugerem que isso seja devido a uma diminuição da superfície de absorção. Os pacientes com ascite ou encefalopatia apresentaram maiores valores de PI do que os pacientes cirróticos sem essas complicações.

Zhang et al. (2003a), realizaram um estudo verificando a PI ao $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ em ratos com cirrose induzida por CCl_4 subcutâneo. No dia seguinte aos experimentos, verificavam o tempo de trânsito intestinal, através do ^{51}Cr . Os animais sacrificados tinham os linfonodos mesentéricos retirados para pesquisa de translocação bacteriana, e o conteúdo jejunal puncionado para pesquisa de supercrescimento bacteriano. Os níveis séricos de endotoxina também foram determinados. Quarenta e oito por cento dos animais cirróticos apresentaram translocação bacteriana e 80% apresentaram supercrescimento bacteriano. Os maiores níveis de endotoxina também foram encontrados nos animais com cirrose, sendo ainda maiores nos animais com translocação bacteriana e supercrescimento bacteriano. O trânsito intestinal foi retardado nos animais com cirrose e ainda mais nos com translocação bacteriana. A excreção urinária ao $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ foi significativamente maior nos animais cirróticos do que nos controles, sendo ainda maior nos animais com translocação bacteriana. Alguns animais foram tratados com lactulose, e a PI ao $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ foi menor nesses ratos. Posteriormente, em

outro trabalho (Zhang et al. 2003b), foi verificado o efeito da cisaprida na translocação bacteriana e no supercrescimento bacteriano, sendo ambos diminuídos após o tratamento em relação ao grupo que recebeu placebo.

Zuckerman et al. apresentaram em 2004 um estudo da PI e absorção em 66 pacientes com cirrose, sendo 48 deles com ascite. As substâncias-teste utilizadas foram: D-xilose, 3-O-metil-D-glicose, L-ramnose e lactulose, em uma solução iso-osmolar. A taxa lactulose/manitol foi significativamente maior nos pacientes cirróticos com ascite, em relação aos cirróticos sem ascite e aos controles (estes dois últimos grupos não diferiram), porém, esse aumento foi considerado modesto. Os autores lembram que a dimensão das bactérias relacionadas com translocação bacteriana é muito maior do que a dos dissacarídeos, como a lactulose, e portanto, uma maior permeabilidade à lactulose pode não necessariamente significar que a translocação bacteriana se dê pela mesma via e que esteja aumentada. Não se sabe se o aumento da taxa lactulose/ramnose representa um fator de risco para o desenvolvimento de PBE ou outras infecções causadas por germes entéricos nos pacientes cirróticos. Sugerem, portanto, mais estudos com maior número de pacientes.

1.4.4 Estudos Clínicos utilizando o $^{51}\text{Cr-EDTA}$ para acessar a PI em vigência de Cirrose

São raros os trabalhos disponíveis na literatura que utilizaram o $^{51}\text{Cr-EDTA}$ para verificar a PI na cirrose.

Em 1993, Bac et al. verificaram a PI ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$ em oito pacientes cirróticos (2 com classificação de Child-Pugh A, 4 com Child B e 2 com Child C) e não encontraram aumento na excreção do radiofármaco. Estudaram, também, o *clearance* intestinal da α -1-antitripsina visando verificar a perda protéica do intestino em 16 pacientes do mesmo grupo e

encontraram aumento nos níveis em apenas dois pacientes. Os autores sugeriram que a função de Barreira Intestinal estaria preservada nesses pacientes. Cabe salientar que a pesquisa de supercrescimento bacteriano em todos os pacientes estudados foi dentro dos limites normais.

Em 2001, Huglo et al. verificaram a PI ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$, assim como a Permeabilidade Pulmonar ao $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ em 35 pacientes cirróticos por uso crônico de álcool e não encontraram diferença significativa na PI entre os grupos. O grupo de pacientes cirróticos consistiu em um paciente com escore Child-Pugh A, 19 com escore B e 15 com escore C. A Permeabilidade Pulmonar foi significativamente maior nos pacientes do grupo cirrótico e não houve diferenças na PI ou na Permeabilidade Pulmonar em relação ao escore Child-Pugh, à presença ou não de ascite, encefalopatia ou hipertensão porta. As complicações da cirrose não foram atribuíveis a um aumento na PI, de acordo com esses autores.

2 JUSTIFICATIVA

Infecções bacterianas são mais comuns em pacientes com cirrose e são responsáveis por altas taxas de morbimortalidade. São mais frequentes em pacientes com cirrose avançada e que apresentam ascite e hemorragia gastrointestinal. Uma das principais e mais graves infecções apresentada por pacientes cirróticos é a Peritonite Bacteriana Espontânea (PBE). O intestino parece ser a principal fonte de bactérias na PBE, dada a predominância de germes gram negativos isolados de líquidos de ascite e a significativa melhora após o uso de antimicrobianos orais não absorvíveis. A própria hipertensão porta pode gerar alterações histológicas no intestino e cólon de pacientes cirróticos, tais como edema de mucosa, congestão, etc. Estudos recentes têm sugerido um papel central para a disfunção intestinal na patogênese das infecções relacionadas à cirrose e à hipertensão porta.

Existe a necessidade de melhor compreendermos as inter-relações entre a disfunção da Barreira Intestinal, o supercrescimento bacteriano e a translocação bacteriana, levando a complicações infecciosas tão graves quanto a bacteremia, PBE e sepse. O melhor entendimento desses mecanismos irá auxiliar, em um futuro próximo, o aprimoramento das técnicas terapêuticas e uma diminuição das taxas de morbimortalidade.

O ^{51}Cr -EDTA tem sido considerado o marcador que requer a técnica mais simples e é

de fácil reprodutibilidade, além de ser bastante sensível. Já foi utilizado em estudos de PI em pacientes com Doença de Crohn, alcoolistas, em uso de AINEs, com Doença Celíaca e diarreia persistente. São poucos os estudos utilizando esse marcador com cirrose e os resultados são contraditórios (Bac et al. 1993; Huglo et al.2001).

O presente trabalho pretende estudar a PI ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$ em ratos cirróticos e compará-la com ratos não expostos ao CCl_4 .

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Verificar a PI ao ^{51}Cr -EDTA em ratos com cirrose induzida por CCl_4 e compará-la com um grupo de ratos não expostos ao CCl_4 .

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um modelo de cirrose em ratos utilizando CCl_4 por gavagem e restrição dietética.
- Implantar a técnica de verificação da PI ao ^{51}Cr -EDTA nos animais.
- Verificar eventuais alterações intestinais nos ratos com cirrose, por análise histológica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

Devido à escassez de dados na literatura sobre a utilização do ^{51}Cr -EDTA para investigação da PI em ratos com cirrose foi realizado um estudo piloto. A partir dos dados obtidos e considerando-se um tamanho de efeito de 1,0, um poder de teste de 90% e α de 0,05, foi calculada uma amostra de 23 ratos para cada grupo (cirróticos e não expostos ao CCl_4).

4.2 DELINEAMENTO

Estudo experimental, cujo fator em estudo foi a presença de cirrose, e o desfecho foi a alteração da PI.

4.3 LOCAL DE REALIZAÇÃO

Este estudo foi realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no Centro de Pesquisas. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Hepatologia Experimental, e os procedimentos com animais foram realizados na Unidade de Experimentação Animal. As

análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica. As análises bioquímicas foram realizadas na Unidade de Pesquisa Clínica, e as contagens do $^{51}\text{Cr-EDTA}$ foram realizadas na Unidade de Radioimunoensaio do Serviço de Patologia Clínica.

4.4 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados ratos Wistar, machos, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, com idades entre 45 e 50 dias e pesos entre 150 e 180 gramas. Os ratos foram mantidos em gaiolas de plástico, em número de cinco animais por caixa, com ciclos de claro-escuro de 12 horas e temperatura ambiente constante (18-22°C). Foi respeitado um período de observação dos animais de sete dias antes do início de todos os experimentos. Os cuidados com os animais seguiram as normas do *Guide for the care and use of laboratory animals, National Institutes of Health (NIH), Maryland, National Research Council/Public Health Service, 1996*.

4.5 INDUÇÃO DE CIRROSE

O modelo experimental utilizado foi baseado no estudo de Proctor & Chatamra (1982), modificado por Rosa et al. (1991), com adaptação da dose e inclusão de restrição dietética. A indução de cirrose foi feita através da administração de CCl_4 (Merck, Alemanha, 99,8% de pureza) na dose de 0,25 mL/kg diluídos em óleo de oliva extra-virgem, em um volume final de 1 mL. O CCl_4 foi administrado semanalmente, sempre no mesmo dia, por gavagem, por 10 semanas. O processo de gavagem consistiu na passagem de uma sonda de aspiração traqueal número 6 até o estômago e a administração da solução de CCl_4 foi seguida pela injeção de aproximadamente 1 mL de ar, o suficiente para eliminar a maior parte do resíduo restante na

sonda. A solução de CCl₄ foi sempre preparada no máximo uma hora antes da administração. Todos os ratos foram pesados nos dias em que eram submetidos ao experimento e receberam fenobarbital na concentração de 350 mg/L na água ingerida, *ad libitum*, a partir de uma semana antes do início da indução (Proctor & Chatamra, 1982).

Os animais receberam dieta padronizada (Nuvilab CR-1®, Nuvital nutrientes SA – Colombo - Paraná), baseada em recomendações do *National Research Council* e *NIH* (http://www.nuvital.com.br/produtos_laboratorio_camundongos.php) fornecendo 2900 cal/kg. A partir de dados obtidos em estudos prévios (Goldani et al. 2005, submetido) foi considerado como ingestão média *ad libitum* 22 gramas por rato por dia. Para potencializar o efeito tóxico do CCl₄ (Seki, Kasama e Imai, 2000) foi realizada uma restrição de 44,5%, isto é, os animais receberam 12 gramas/rato/dia (60 gramas/caixa).

4.6 GRUPO CONTROLE

O grupo de ratos não expostos a CCl₄ foi constituído por dois subgrupos: o primeiro grupo é o chamado de não expostos ao CCl₄ que consistiu de ratos Wistar machos, com pesos iniciais entre 150 e 180 gramas que foram submetidos à restrição dietética, receberam fenobarbital na água de beber e uma vez por semana receberam 1 mL de óleo de oliva por gavagem, por 10 semanas, simulando a indução de cirrose.

O segundo grupo (grupo Indometacina) foi constituído para obter-se um controle do método utilizado para verificação da PI ao ⁵¹Cr-EDTA. Foi utilizado um modelo de inflamação intestinal proposto por Antony et al (1993) que utiliza Indometacina via oral, produzindo inflamação intestinal aguda com ulceração. Ratos Wistar machos com pesos entre 200 e 230 gramas, em uso de ração *ad libitum*, receberam uma dose única de 15mg/kg de Indometacina por gavagem, diluída em uma solução de bicarbonato de sódio a 1,25%, sendo

administrado 1 mL para cada 250 gramas de peso. Após 48 horas da administração da Indometacina os ratos foram submetidos ao ensaio com $^{51}\text{Cr-EDTA}$ juntamente com ratos cirróticos e não expostos ao CCl_4 .

A tabela 5 exemplifica como foi a logística do estudo e a tabela 6 demonstra a avaliação laboratorial a que os ratos foram submetidos.

Tabela 5 - Logística dos experimentos.

	Grupo de expostos ao CCl_4	Grupo de não expostos ao CCl_4	Grupo Indometacina
N	25	12	13
Período de observação (quarentena)	✓	✓	✓
Fenobarbital, restrição dietética	✓	✓	
CCl_4	✓		
Indometacina			✓
Sacrifício	✓	✓	✓

Tabela 6 - Avaliação laboratorial

	Grupo de Expostos ao CCl_4	Grupo de não expostos ao CCl_4	Grupo Indometacina
Avaliação da função renal antes e após o CCl_4	✓		
Estudo da Permeabilidade Intestinal (PI) ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$	✓	✓	✓
Avaliação histológica	✓	✓	✓

4.7 CONTROLE DA FUNÇÃO RENAL

Os ratos expostos ao CCl_4 realizaram testes de função renal que consistiram em: dosagem de creatinina sérica e urinária, e cálculo da Depuração da Creatinina Endógena (DCE), através da fórmula da figura 6.

$$\frac{V}{1.440} \times \frac{Cr_u}{Cr_s}$$

Sendo:
Cr_u creatinina urinária em miligramas por decilitro;
V volume urinário em mililitros e;
Cr_s creatinina sérica em miligramas por decilitro, sendo o resultado expresso em mililitros por minuto.

Figura 6 - Fórmula para o cálculo da Depuração da Creatinina Endógena (DCE)

Fonte: Adaptado de (Rhoden et. al. 1997)

A coleta de sangue foi realizada através de punção do plexo retro-ocular sob anestesia com Quetamina 10% (Dopalen ®) na dose de 50mg/kg e Xilazina 2% (Rompum®) na dose de 20 mg/kg, e a coleta de urina de 24 horas foi realizada em gaiolas metabólicas. Essas coletas eram realizadas aproximadamente uma semana antes do início da indução da cirrose e no dia do ensaio com ^{51}Cr -EDTA.

4.8 TESTE DO ^{51}Cr -EDTA

Foi utilizada uma adaptação da técnica inicialmente proposta por Bjarnason (1983) e modificada por Bernardes-Silva (2002). O ^{51}Cr -EDTA foi cedido pelo Serviço de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A partir de uma solução padrão contendo 100 μCi de ^{51}Cr -EDTA em 40 mL de água, foram feitas alíquotas de 1 mL para cada rato, em seringas de 3 mL (figura 7). Um volume igual da mesma preparação foi utilizado como padrão. As seringas foram pesadas antes e após a administração para cada rato e o seu peso em gramas foi utilizado para os cálculos de PI. Os ensaios para verificação da PI foram realizados na décima primeira semana após o início da indução de cirrose. Todos os ensaios foram iniciados pela manhã, entre 9:30h e 11:00h e finalizados à tarde. Os animais eram colocados em jejum na noite anterior ao ensaio e durante todo o dia anterior permaneciam nas respectivas gaiolas metabólicas, para ambientação. Durante esse período de 24 horas, era coletada urina para medida da DCE.

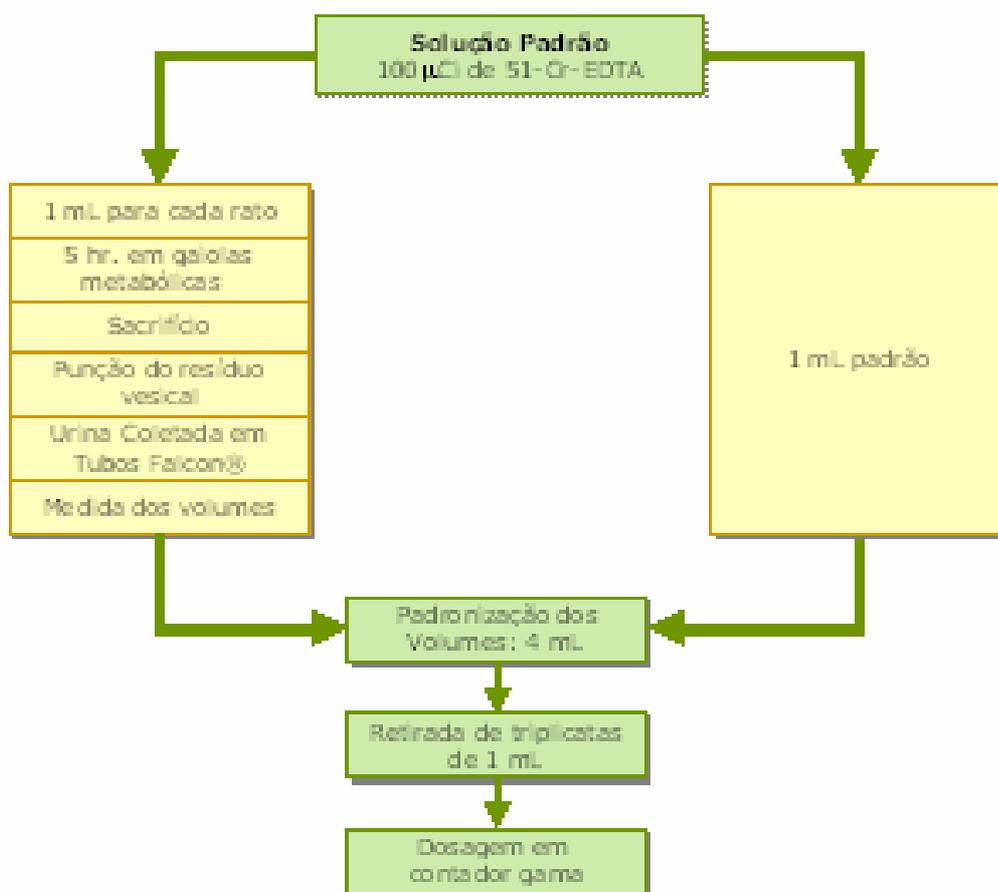


Figura 7 - Esquema dos ensaios de Permeabilidade Intestinal ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$

Nos dias estabelecidos para os testes de PI, os ratos recebiam a dose de $^{51}\text{Cr-EDTA}$ e em seguida eram novamente colocados em gaiolas metabólicas individuais, e a urina coletada em tubos tipo Falcon® de 15 mL. Após 5 horas, os ratos eram sacrificados através da injeção de Quetamina 10% (150 mg/kg) e Xilazina a 2% (60 mg/kg) intraperitoneal. Eram realizadas laparotomia e toracotomia com punção cardíaca para retirada de sangue (para dosagem de creatinina) e punção vesical para coleta do volume urinário residual. A presença de ascite era documentada, o volume de líquido medido e considerado somente a partir de 1 mL (Garcia-Tsao et al., 1995). O volume urinário residual era adicionado aos respectivos tubos Falcon. Os volumes urinários eram medidos e iguados até um volume final de 4 mL, sendo retiradas 3 alíquotas de 1 mL para serem medidas em contador gama. O contador utilizado foi o

Autogamma Cobra modelo 5002, Packard (Meriden, USA), com janela para Cromo entre 240 e 400 KeV. A PI foi calculada através da relação entre o valor da contagem de radioatividade do $^{51}\text{Cr-EDTA}$ presente na urina de 5 horas (média das três contagens) (item número 2 da figura 8), sobre o valor da radioatividade da dose administrada (fórmula número 3), vezes 100 e expressa em porcentagem item 4 da figura 8 (Bernardes-Silva, 2002).

<p>1) $P_{\text{inicial da seringa}} - P_{\text{final da seringa}} = P_{\text{dose administrada}} \text{ OU } P_{\text{dose padrão (g)}}$</p> <p>2) $R_{\text{amostra}} \text{ e } R_{\text{dose padrão (contador gama) (CPM)}}$</p> <p>3) $R_{\text{dose administrada}} = \frac{P_{\text{dose administrada}}}{P_{\text{dose padrão}}} \times R_{\text{dose padrão (CPM)}}$</p> <p>4) $PI_{(\%)} = \frac{R_{\text{amostra}}}{R_{\text{dose administrada}}} \times 100$</p> <p style="text-align: center; border: 1px solid black; padding: 5px;">* P: peso; g: gramas; R: radioatividade; CPM: contagens por minuto e PI: Permeabilidade intestinal.</p>
--

Figura 8 - Fórmulas para o cálculo da Permeabilidade Intestinal (%)

Fonte: Bernardes-Silva, 2002.

4.9 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

Ao final dos testes de PI ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$, após a coleta de sangue e urina, eram retirados e pesados: fígado, baço e rins, para posterior fixação. Estes órgãos eram fixados em formalina tamponada a 10%. Também era retirada a porção proximal do intestino delgado e do ceco, sendo realizado corte longitudinal pela borda anti-mesentérica, lavagem com solução salina e fixação. Após pelo menos 24 horas de fixação em formalina tamponada, dois fragmentos de fígado de aproximadamente 2 mm de espessura eram retirados e encaminhados para o setor de Patologia. Os tecidos eram embebidos em parafina e realizados cortes de 4 μm de espessura, corados com hematoxilina - eosina e picrossírius. A análise histológica do

figado de todos os animais foi realizada utilizando-se um escore para semiquantificação de fibrose (METAVIR, Bedossa et al., 1994) por patologista experiente e sem conhecimento dos grupos experimentais. Este escore consistiu:

- grau 0: sem fibrose;
- grau 1: fibrose portal sem septos;
- grau 2: poucos septos;
- grau 3: numerosos septos sem cirrose;
- grau 4: cirrose.

Os animais do grupo Indometacina tiveram a porção proximal do intestino delgado e do cólon (ceco) retirados, os fragmentos foram lavados com solução salina e fixados em formalina tamponada a 10%, para posterior análise histológica com coloração HE.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram organizados em planilha EXCEL® versão 2003, e para análise estatística foi utilizado o programa SPSS® versão 12.0. Os pesos finais dos animais foram expressos em médias e desvios-padrão e comparados usando-se ANOVA one way. Os valores percentuais de PI foram expressos em medianas e percentis 25 e 75 e comparados utilizando-se o teste U de Mann Whitney. Os percentuais de PI entre os grupos de ratos cirróticos, não expostos ao CCl₄ e Indometacina foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Os valores ranqueados foram comparados entre si, utilizando-se o teste de Tukey. Os percentuais de PI quanto à presença ou não de ascite foram comparados através do teste U de Mann-Whitney. Os valores de função renal antes e após a indução de cirrose foram comparados por teste t para amostras pareadas, e os valores do peso dos órgãos foram estudados usando-se o teste t

para amostras independentes. Os valores de PI em relação à semiquantificação de fibrose foram comparados, utilizando-se o teste de Kruskal Wallis. Foram considerados como significativos os valores $p < 0,05$.

4.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sendo aprovado com o número 03-010 no Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG).

5 RESULTADOS

Foram utilizados no total 90 ratos, sendo que 25 ratos foram controles (12 do grupo de não expostos ao CCl₄ e 13 do grupo Indometacina). Não houve óbitos entre os controles. Dos ratos alocados para receber CCl₄, 25 completaram o estudo, sendo submetidos ao ensaio com ⁵¹Cr-EDTA para verificação da PI. Os demais 40 animais não completaram o estudo devido a óbito, e em 37 ratos o exame *pós mortem* identificou necrose hepática submaciça. Os outros 3 animais morreram por complicações ligadas à gavagem. Portanto, entre o grupo que recebeu CCl₄ a mortalidade foi de 47%.

5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

5.1.1 Análise histológica hepática

A análise histológica do fígado dos 25 ratos que receberam CCl₄ por 10 semanas revelou que 21 animais (84%) desenvolveram franca cirrose micronodular (F4 pelo escore METAVIR de fibrose) (figuras 10.c e d), 3 ratos apresentaram escore F3 (figura 10. f) e

somente 1 animal apresentou escore F2. Figura (10.e). A partir dessa constatação, todas as análises estatísticas foram realizadas com base em 21 ratos com cirrose em relação aos dois grupos controle. A figura 9 ilustra a distribuição dos animais quanto ao escore de fibrose.

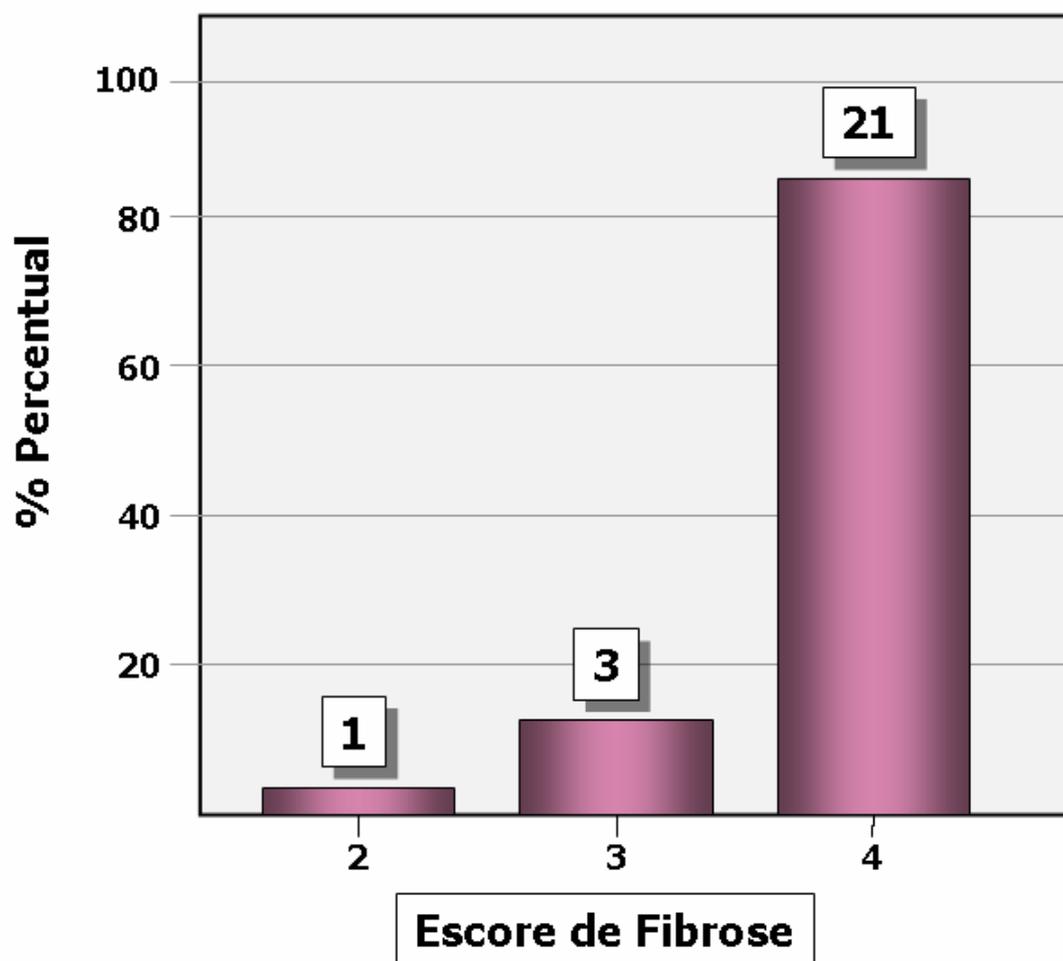


Figura 9 - Distribuição dos ratos em relação ao escore para fibrose (METAVIR)

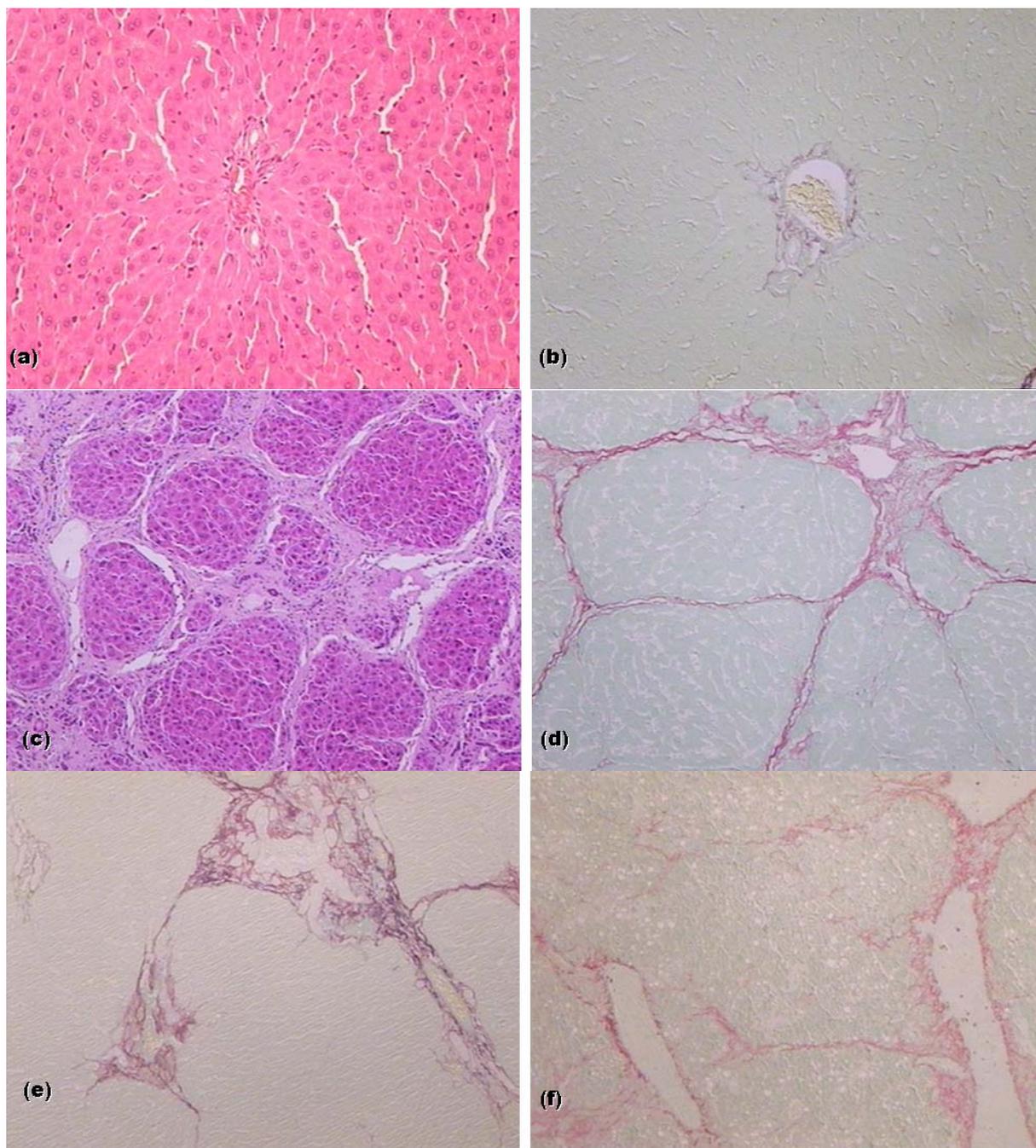


Figura 10 - Aspectos histológicos dos fígados dos animais cirróticos e não expostos ao CCl_4

a e b: fígado de rato controle, 100X, hematoxilina-eosina (a) e picrosíríus (b);

c e d: fígado de rato que recebeu CCl_4 por 10 semanas, evidenciando cirrose micronodular, 50X, hematoxilina-eosina (c) e picrosíríus (d);

e e f: fígado de rato que recebeu CCl_4 por 10 semanas evidenciando fibrose: à esquerda F2 e à direita F3, 50X, picrosíríus.

5.1.2 Análise histológica intestinal

Foram realizadas análises histológicas dos intestinos delgado e grosso em 18 dos animais cirróticos e em 6 dos não expostos ao CCl₄. Em 3 dos animais cirróticos foi verificada necrose do tipo isquêmica superficial dos vilos. Não foram constatadas outras alterações nos intestinos delgado e grosso (figura 11).

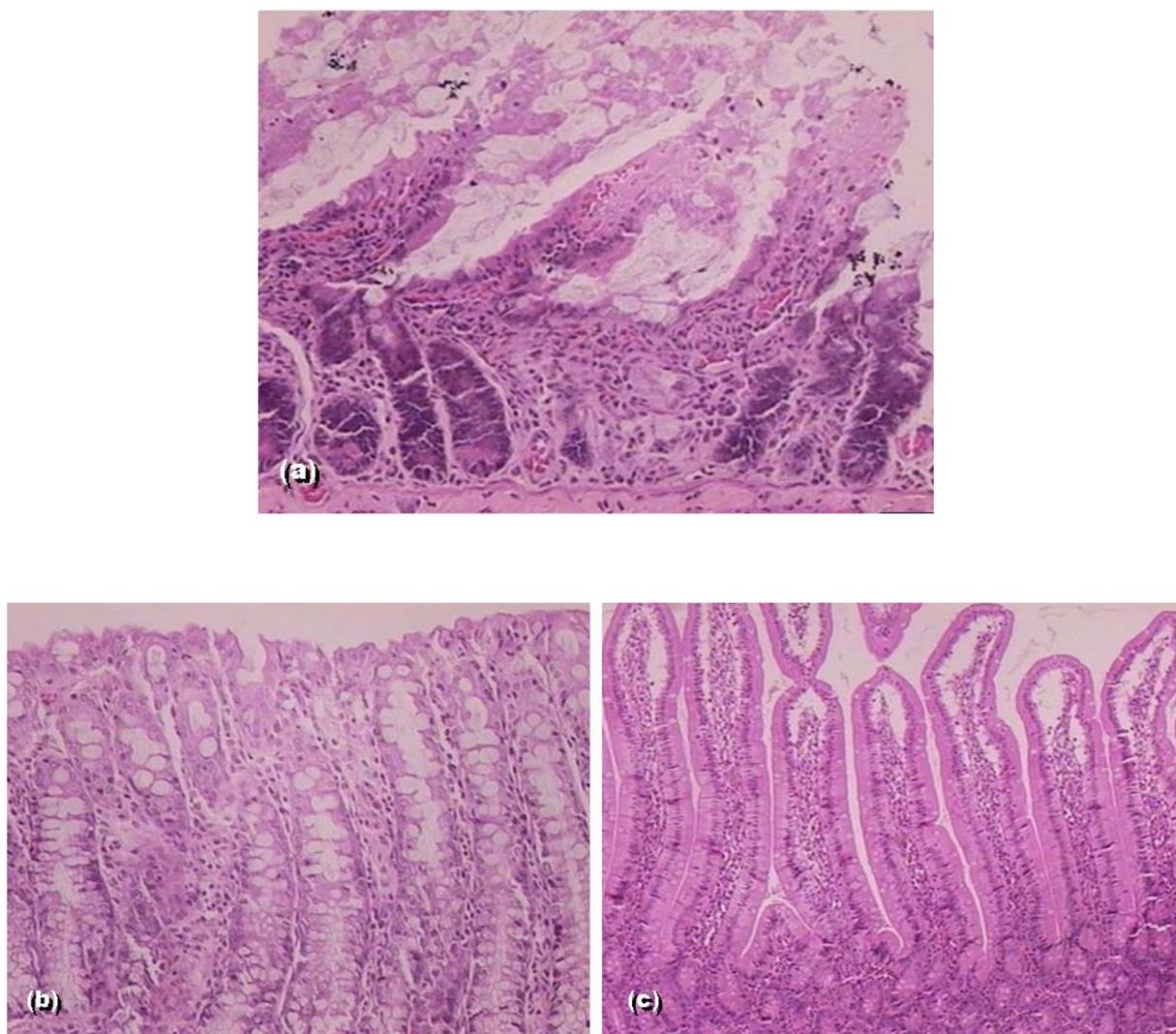


Figura 11 - Aspectos histológicos dos intestinos dos ratos cirróticos

a) necrose em topo dos vilos de intestino delgado em rato cirrótico (HE, 100X)
b) e c) aspecto histológico normal de intestino grosso (b) e delgado (c) em rato cirrótico, HE, 100X e 50X respectivamente.

Quanto aos ratos do grupo Indometacina, foram realizadas análises histológicas de

todos os animais. Os achados mais comuns foram: inflamação aguda com erosões com ou sem ulcerações, rarefação de células caliciformes, alterações regenerativas e em um animal a presença de ulceração transmural (figura 12 a e b). Em três animais não foram evidenciadas alterações.

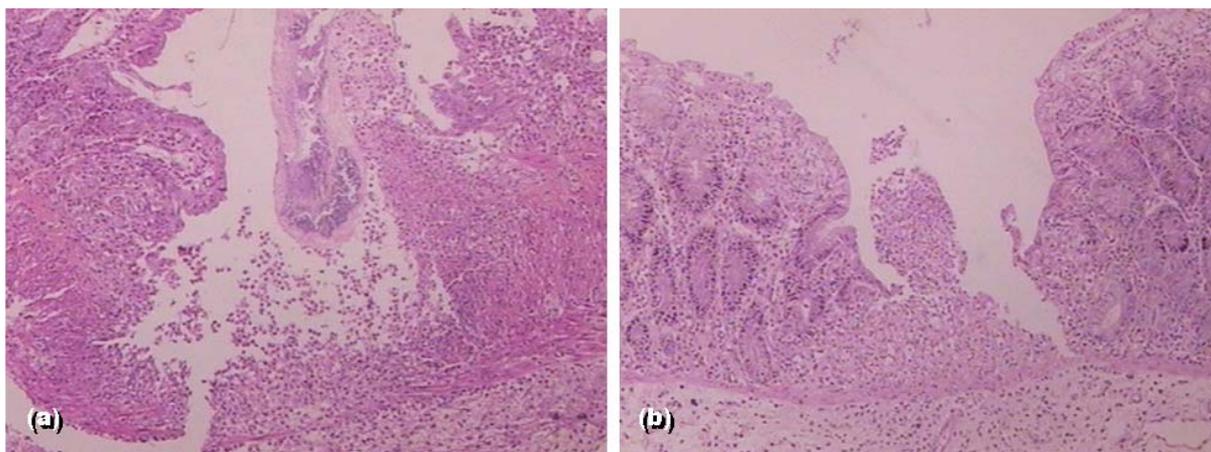


Figura 12 a e b - Aspectos histológicos dos intestinos dos ratos do grupo Indometacina
ulceração extensa em intestino delgado e cólon, respectivamente. HE, 50X

5.1.3 Análise histológica renal

Foram realizadas análises histológicas dos rins em uma subamostra de 10 ratos (cinco cirróticos e cinco não expostos ao CCl_4). Não foram encontradas anormalidades em ambos os grupos (figura 13).

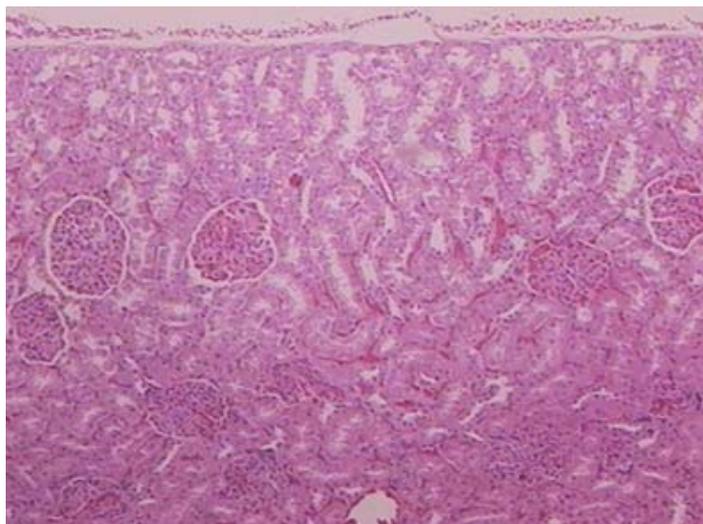


Figura 13 - Aspecto histológico normal de rim de rato cirrótico (HE, 50X).

5.2 PESO DOS ANIMAIS

O peso dos ratos cirróticos e dos não expostos ao CCl_4 está descrito na tabela 7. Não houve diferença entre os grupos de ratos cirróticos e não expostos ao CCl_4 quanto ao peso inicial e final ($p = 0,257$ e $p = 0,055$ respectivamente) (teste t para amostras independentes). Também não houve diferença intra-grupo quanto a peso final e inicial no grupo de ratos cirróticos ($p=0,263$). No grupo de ratos não expostos ao CCl_4 , houve um ganho de peso significativo durante o experimento, ($p = 0,014$) (teste t para amostras pareadas). Entretanto, o ganho de peso que os animais não expostos ao CCl_4 apresentaram foi muito pequeno, ficando muito aquém do esperado para animais de experimentação desta idade, sugerindo que a restrição dietética aplicada foi bastante importante.

Tabela 7 - Peso em gramas (g) dos animais cirróticos e do grupo de não expostos ao CCl₄, no início e no final do experimento

Ratos	N	Peso Inicial (média e desvio padrão)	Peso Final (média e desvio padrão)
Cirróticos	21	182,2±13,0	188,3±24,4
Não expostos ao CCl ₄	12	189,0±21,1	205,5±16,1

teste t para amostras pareadas

O peso final dos grupos de cirróticos e de não expostos ao CCl₄ também não diferiu do peso dos ratos do grupo indometacina ($p= 0,055$) (ANOVA), conforme demonstrado na figura 14.

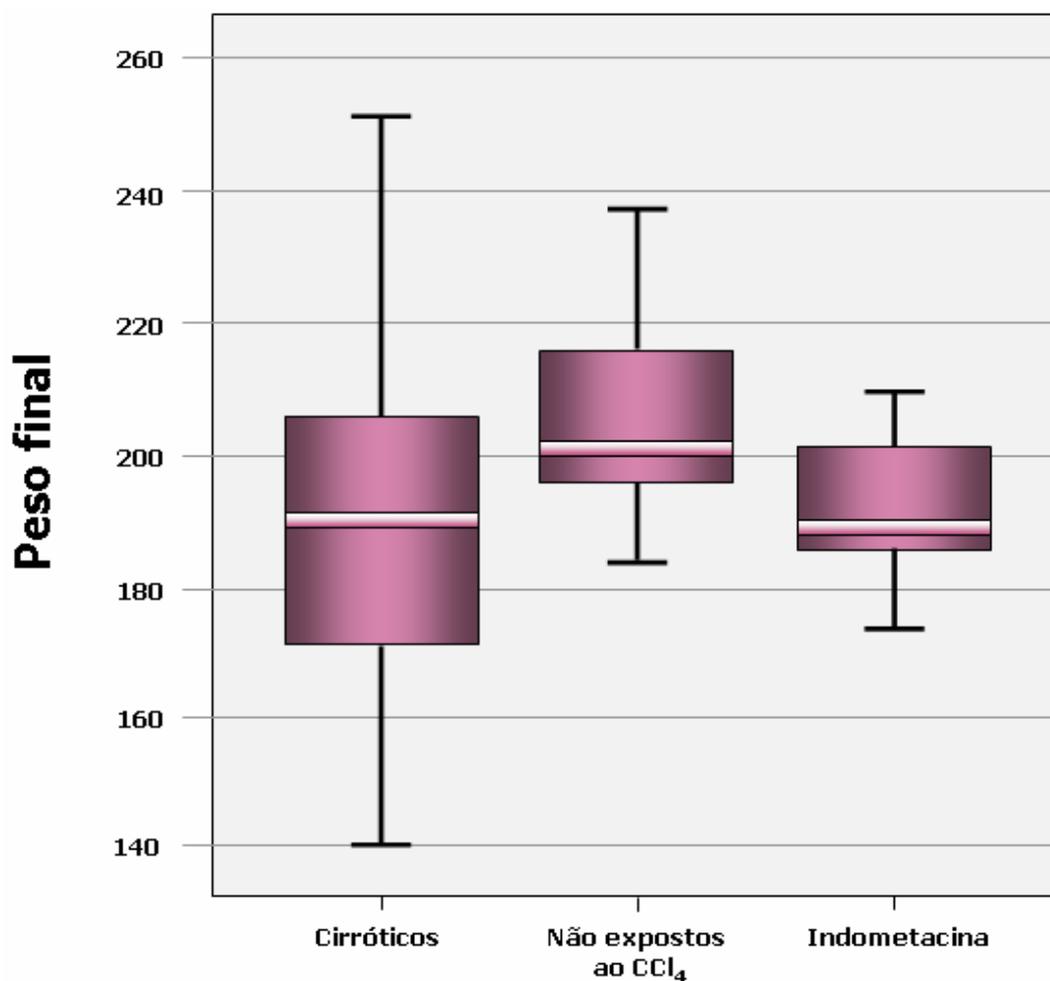


Figura 14 - Peso dos animais ao final do experimento

ANOVA, $p= 0,055$

5.3 PESO DOS ÓRGÃOS

Os valores de peso absoluto e relativo (peso do órgão em relação ao peso corporal total) dos ratos cirróticos e não expostos ao CCl₄ estão representados na tabela 8.

O peso do baço, tanto absoluto quanto relativo, foi estatisticamente diferente entre os cirróticos e não expostos ao CCl₄, sendo maior no grupo de ratos cirróticos ($p < 0,001$). O peso dos rins direito e esquerdo também foi significativamente superior no grupo de ratos cirróticos ($p < 0,001$ para o peso relativo e 0,013 e 0,004 respectivamente para peso absoluto de rim direito e esquerdo) (teste t para amostras independentes).

Em relação ao peso do fígado, não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,069$ para o peso absoluto e $p = 0,861$ para o peso relativo e isto confirmou-se retirando-se da análise os quatro ratos que apresentaram ascite ($p = 0,157$ para peso absoluto e $p = 0,899$ para o peso relativo) (teste t para amostras independentes).

Tabela 8 - Pesos em gramas dos órgãos dos animais dos grupos de cirróticos e de não expostos ao CCl₄

	n	Peso absoluto (média e desvio padrão)	p	Peso relativo (média e desvio padrão)	p
Peso fígado					
Cirróticos	21	8,33±1,59		4,43±0,61	
Não expostos ao CCl ₄	12	9,10±0,73	0,069	4,47±0,57	0,861
Peso baço					
Cirróticos	21	0,91±0,18		0,49±0,11	
Não expostos ao CCl ₄	12	0,60±0,08	<0,001	0,30±0,04	<0,001

teste t para amostras independentes

5.4 FUNÇÃO RENAL

Os valores de creatinina sérica e Depuração da Creatinina Endógena (DCE) antes e após a indução de cirrose estão apresentados na tabela 9. Houve perda de material em um animal, não sendo possíveis as dosagens.

Houve diferença significativa entre os valores de creatinina sérica antes e depois da indução de cirrose ($p = 0,019$), sendo que os valores após a indução foram menores do que os valores antes da indução. Também houve um aumento na DCE dos ratos após as 10 semanas de utilização de CCl_4 ($p = 0,005$) (teste t para amostras pareadas).

Tabela 9 - Valores de creatinina sérica e DCE dos ratos cirróticos

n = 20	Pré-indução	Pós-indução	P
Creatinina (mg/dL)	0,57±0,06	0,51±0,10	0,019
DCE (mL/min)	0,32±0,13	0,50±0,26	0,005

legenda: mg/dL: miligramas por decilitro
 mL/min: mililitros por minuto
 teste t para amostras pareadas

5.5 PERMEABILIDADE INTESTINAL AO ^{51}Cr -EDTA

Os valores da PI medida pela eliminação urinária do ^{51}Cr -EDTA nos grupos de ratos cirróticos e não expostos ao CCl_4 estão apresentados na tabela 10 e figura 15. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,65$) (teste U de Mann Whitney).

Tabela 10 - Permeabilidade Intestinal ao ^{51}Cr -EDTA nos ratos cirróticos e não expostos ao CCl_4

Ratos	n	PI: mediana	PI: percentil 25:	PI: percentil 75:
Cirróticos	21	0,90%	0,63%	1,79%
Não expostos ao CCl_4	12	0,90%	0,60%	1,52%

teste U de Mann Whitney, $p=0,65$

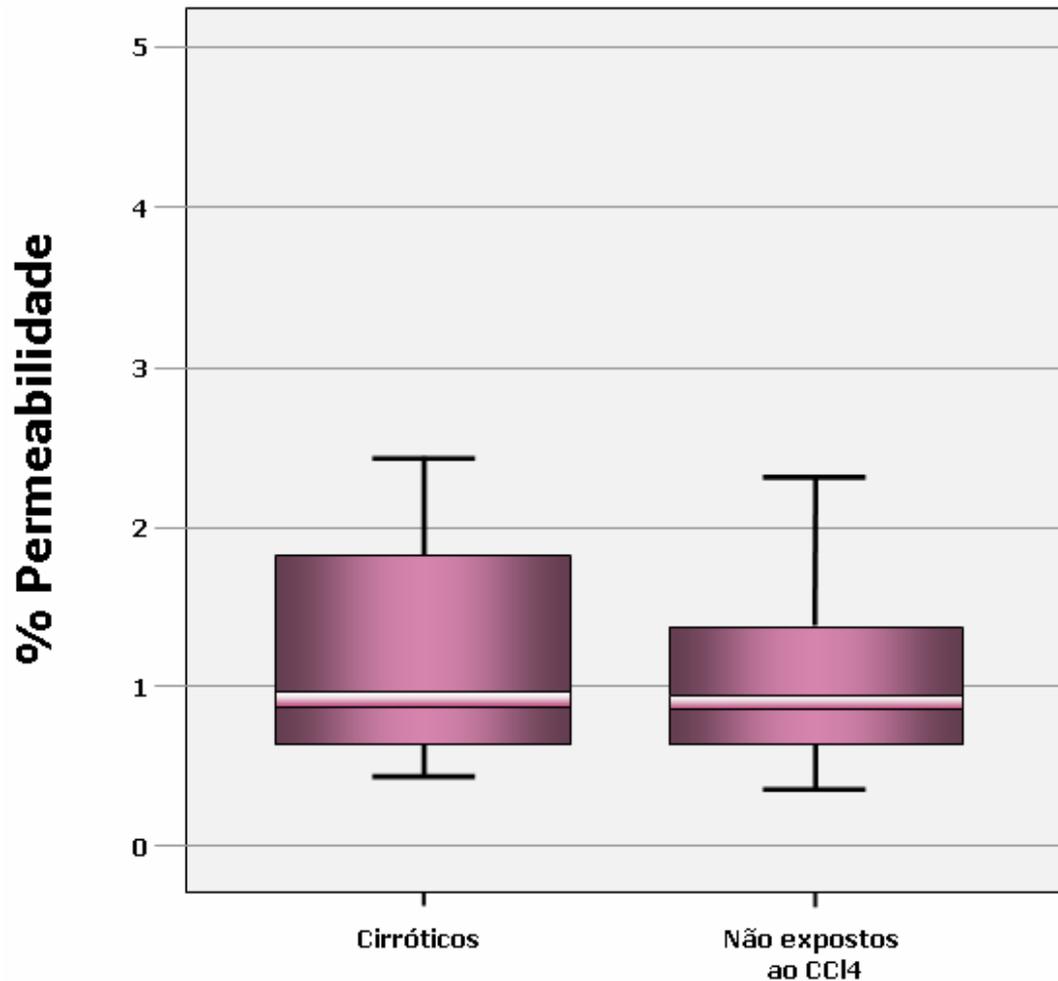


Figura 15 - Permeabilidade Intestinal ao ^{51}Cr -EDTA nos ratos cirróticos e não expostos ao CCl_4

teste U de Mann Whitney, $p=0,65$

5.5.1 PI ao ^{51}Cr -EDTA nos ratos cirróticos em relação à presença de ascite

Dos 21 ratos com cirrose, quatro apresentaram ascite com volumes entre 1,0 e 9,0 mL.

Comparando-se o percentual de PI ao ^{51}Cr -EDTA entre os ratos cirróticos com e sem ascite,

não houve diferença significativa ($p=0,295$) (teste U de Mann Whitney), conforme demonstrado na tabela 11 e na figura 16.

Tabela 11 - Distribuição dos valores percentuais de Permeabilidade Intestinal ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$ entre os ratos cirróticos, considerando-se a presença ou não de ascite

Ratos cirróticos	n	PI: mediana	PI: percentil 25	PI: percentil 75
Com ascite	4	0,75%	0,46%	1,32%
Sem ascite	17	0,90%	0,70%	1,95%

teste U de Mann Whitney, $p=0,295$

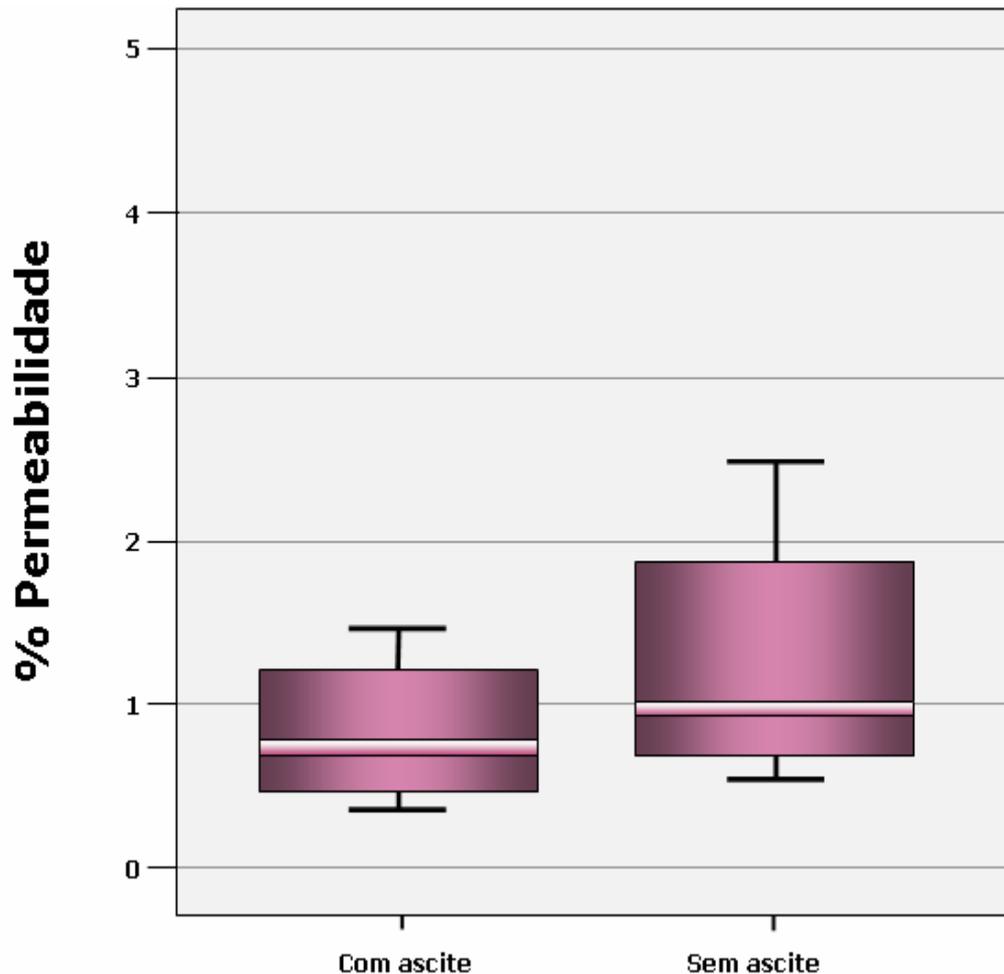


Figura 16 - Permeabilidade Intestinal ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$ em relação à presença de ascite nos ratos cirróticos

teste U de Mann Whitney, $p=0,295$

5.5.2 PI ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$ no grupo Indometacina

Em relação ao grupo de ratos expostos à Indometacina, a mediana dos valores de PI foi de 7,3 com percentis 25 e 75 de 5,1 e 14,7 respectivamente, havendo diferença entre este grupo e os outros dois grupos, de ratos cirróticos e não expostos ao CCl_4 , com $p < 0,001$, (teste de Kruskal –Wallis), conforme demonstrado na tabela 12 e figura 17.

Tabela 12 - Distribuição dos valores percentuais de Permeabilidade Intestinal ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$ entre os grupos de ratos cirróticos, não expostos ao CCl_4 e Indometacina

Grupos de Tratamento	n	PI: mediana	PI: percentil 25	PI: percentil 75
Ratos cirróticos	21	0,90%	0,61	1,78%
Ratos não expostos ao CCl_4	12	0,90%	0,60	1,52%
Ratos Indometacina	13	7,3%	5,1	14,7%

teste de Kruskal –Wallis, $p < 0,001$

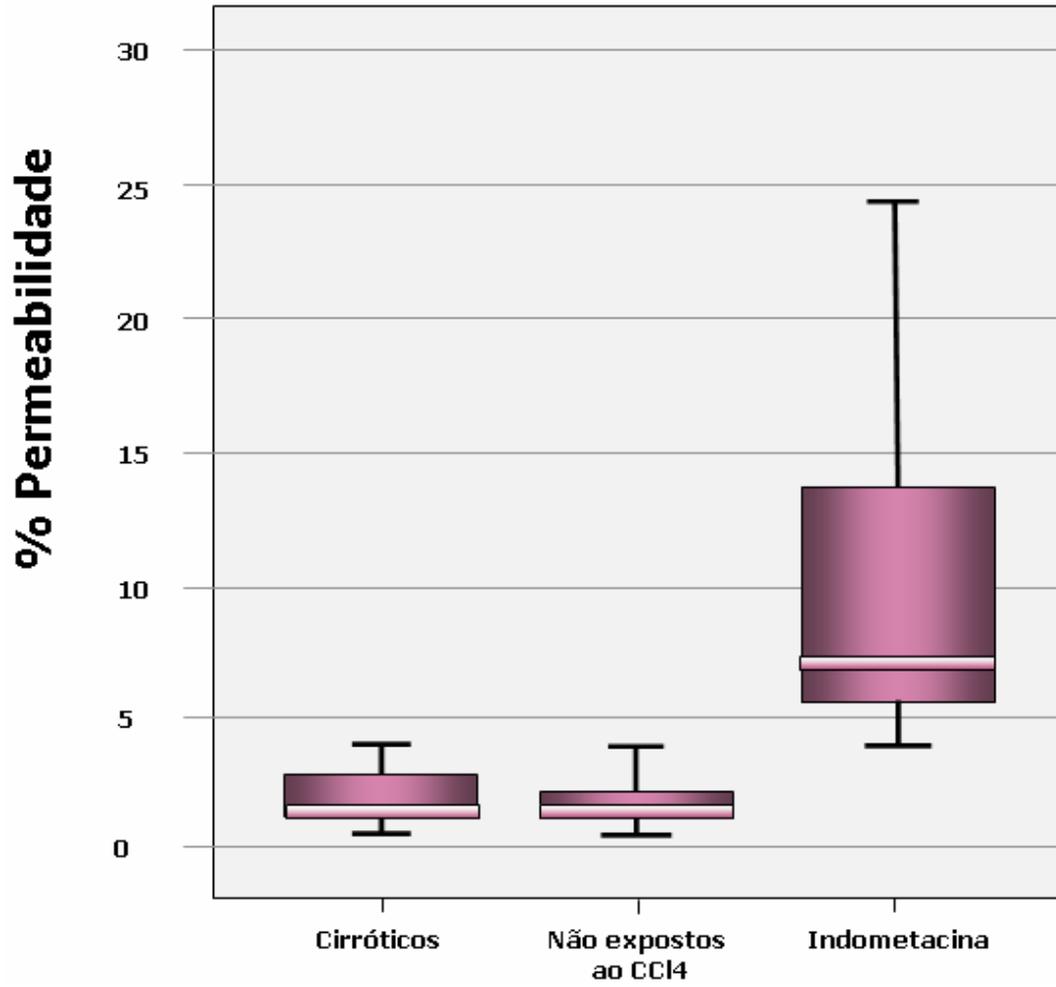


Figura 17 - Permeabilidade Intestinal ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$ nos grupos de ratos cirróticos, não expostos ao CCl_4 e Indometacina

teste de Kruskal –Wallis, $p < 0,001$

6 DISCUSSÃO

6.1 MODELO EXPERIMENTAL

O modelo de cirrose experimental utilizado neste estudo foi uma adaptação de modelos já descritos na literatura (Proctor & Chatamra, 1982; Rosa et al. 1991).

Nosso grupo de pesquisas (Zim et al. 2002) já havia utilizado o modelo de Rosa et al. (1991) com sucesso. Iniciamos o trabalho utilizando este modelo, que usa a variação semanal de peso dos ratos para o cálculo da dose subsequente de CCl_4 . Porém, em projeto paralelo, após as dez semanas preconizadas pelo modelo, nenhum rato apresentou cirrose. Inicialmente verificou-se a pureza do CCl_4 utilizado e confirmou-se ser esta de 99,8% em laboratório independente. Visando melhorar o resultado final, passamos a utilizar fenobarbital como indutor enzimático (McLean, McLean e Sutton, 1969) e iniciamos uma restrição dietética, relatada como um fator auxiliar na indução de cirrose (Seki, Kasama, Imai, 2000). O próximo passo foi determinar qual a dose de CCl_4 a ser ministrada. Realizamos um estudo piloto utilizando várias doses (0,5, 0,4, 0,3 e 0,25mL/kg uma vez por semana, por dez semanas) verificando que alguns ratos morriam devido à necrose hepática submaciça. A dose de CCl_4

capaz de induzir cirrose com a menor mortalidade foi a de 0,25mL/kg, o que equivaleria, utilizando um rato com peso inicial de 180 gramas a 45 microlitros, com bastante semelhança à dose inicial de Rosa et al. 1991, que era de 40 microlitros. Houve uma variação na concentração das soluções de CCl₄, o que poderia contribuir para a variável resposta à droga.

O modelo experimental para a indução de cirrose proposto neste estudo, demonstrou uma mortalidade bastante significativa (47%), porém semelhante a alguns trabalhos encontrados na literatura. Wensing et al. em 1990, Runyon et al em 1991 e Pérez-Paramo et al. em 2000, todos baseados no modelo clássico de Proctor & Chatamra que consiste em administração de CCl₄ por gavagem verificaram respectivamente 40%, 52,9% e 57% de mortalidade. Rosa et al. (1991) utilizando também CCl₄ por gavagem, obtiveram somente 20% de mortalidade, porém convém salientar que estes autores não utilizaram fenobarbital como indutor enzimático, o que talvez, tenha contribuído para tal resultado. Zhang et al. (2003) aplicando um modelo de indução de cirrose utilizando CCl₄ por via subcutânea verificaram 51,8% e mortalidade. Cremonese et al. (2001) utilizando um modelo com CCl₄ inalatório obtiveram somente 20% de mortalidade. O modelo inalatório apesar de apresentar menor mortalidade, implica em 15 semanas de indução, ou seja, 50% de tempo a mais para a obtenção de cirrose e necessita de um aparato específico, com câmara de inalação, compressor de ar, capela de fluxo laminar, que não dispúnhamos. Jiang et al. (2001), utilizando um modelo com CCl₄ intraperitoneal, obtiveram 25% de mortalidade. Tal modelo utiliza aproximadamente 25 aplicações intraperitoneais de CCl₄, o que pode contribuir para a morbidade destes animais. Em nosso estudo observamos em alguns animais necrose de parede abdominal após injeção intra abdominal para anestesia.

Em projeto paralelo (Goldani et al. 2005, submetido) verificou-se o efeito da restrição alimentar sobre a mortalidade e a ocorrência de cirrose em ratos recebendo CCl₄ na mesma dose de 0,25mL/kg e testaram-se vários níveis de restrição. A restrição que demonstrou

melhores resultados foi a de 16,5 gramas de ração por rato por dia (25% de restrição em relação ao *ad libitum*), atingindo uma mortalidade praticamente nula. Este modelo é o que será adotado nos próximos trabalhos de nosso grupo.

6.2 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

O escore semi-quantitativo utilizado para avaliação de fibrose foi o de Bedossa et al. (1994) (METAVIR). Escolhemos utilizar esse escore por ser o utilizado em nosso serviço de Patologia, estando os profissionais mais familiarizados com tal escore. Em outro estudo (Zim et al. 2002), nosso grupo utilizou o escore de Jiang et al. (1992), que foi desenvolvido em ratos e é bastante semelhante ao de Bedossa et al. (1994). Ele utiliza os seguintes parâmetros: Grau zero: normal ou aumento inconclusivo no tecido fibrótico; grau 1: aumento definido no tecido fibrótico, sem formação de septos; grau 2: aumento definido no tecido fibrótico com septos incompletos; grau 3: aumento definido no tecido fibrótico e septos finos e completos dividindo o parênquima em fragmentos separados; grau 4: aumento definido com septos completos e espessos ou com evidência de cirrose (Jiang et al., 1992).

Apesar de não haver uma diferença significativa entre o peso inicial e o final dos ratos cirróticos e dos controles, os ratos não expostos ao CCl₄ ganharam um peso considerável, o que sugere uma ação direta do CCl₄ sobre o ganho de peso. Isto também foi observado no estudo de Jiang et al. (1992) utilizando um modelo com CCl₄ por via intraperitoneal. No presente estudo, os animais não expostos ao CCl₄ demonstraram uma tendência ($p=0,055$) a serem mais pesados do que os ratos cirróticos.

Quanto ao peso dos órgãos, tanto o absoluto quanto o relativo do fígado não foram diferentes entre os grupos de animais cirróticos e não expostos ao CCl₄, mesmo excluindo-se os 4 animais que apresentaram ascite, sendo esta pouco volumosa.

O peso absoluto e o peso relativo do baço foram significativamente maiores no grupo de ratos cirróticos, o que sugere já existir um quadro de hipertensão porta. Entretanto, no estudo de Pérez-Paramo et al. (2000) o peso absoluto médio do baço dos animais cirróticos foi $1,79 \pm 0,4$ g (o dos nossos animais foi $0,91 \pm 0,18$ g) em comparação com os animais do grupo controle que foi $0,61 \pm 0,1$ g (o dos nossos animais foi $0,60 \pm 0,08$ g). Esse grupo utilizou animais Sprague-Dawley, diferentemente do nosso grupo que utilizou ratos Wistar, e com peso inicial um pouco menor do que o dos nossos: 120-150g, enquanto nossos animais possuíam 150-180g no início do experimento. Esses resultados, porém, vão ao encontro da hipótese de que provavelmente os animais utilizados no presente estudo apresentaram um quadro de cirrose menos intensa e apesar de o peso do baço ser significativamente maior do que o do grupo controle, sugerindo a presença de hipertensão porta, isto não teria sido suficiente para induzir uma alteração na PI.

Não foram encontradas alterações significativas nos intestinos dos animais cirróticos. As lesões necróticas de topo dos vilos podem dever-se à situação de isquemia decorrente do sacrifício. Essa ausência de lesões características pode ser explicada pela ausência de doença descompensada. Também convém lembrar que vários estudos mostram poucas alterações em nível de microscopia ótica, e alterações mais significativas são visualizadas em nível de microscopia eletrônica. (Portela-Gomes, Martins e Correia, 1974; Castilla-Cortázar et al. 2004). Entretanto, Ramachandran et al. (2002) utilizando um modelo experimental semelhante ao presente estudo, encontraram áreas de dano epitelial no intestino delgado e as células cobrindo o topo dos vilos demonstraram encurtamento, desarranjo nuclear e mudanças degenerativas no citoplasma. Extrusão de células mortas foi também visto com frequência. No estudo citado, os animais foram mortos após 10 dias da décima primeira dose, ou seja, eram expostos aos danos do CCl_4 por 17 dias a mais do que os animais do presente estudo, o que poderia, talvez, explicar a escassez de achados intestinais do ponto de vista histológico.

6.3 FUNÇÃO RENAL NOS ANIMAIS CIRRÓTICOS

No presente estudo não foi evidenciada piora dos níveis de creatinina sérica e Depuração da Creatinina Endógena (DCE) nos ratos submetidos à indução de cirrose pelo CCl₄. Ao contrário, houve diminuição significativa dos níveis de creatinina sérica após as dez semanas de indução e um aumento na DCE. Esses resultados coincidem com os de Rhoden et al. (1991), que não encontraram diferença entre os valores de uréia, creatinina e eletrólitos em ratas com cirrose induzida por CCl₄ intraperitoneal e seus controles.

Os estudos a respeito de função renal em ratos com cirrose apresentam resultados diversos e muitas vezes contraditórios.

No estudo de Wensing et al., (1990a), utilizando o modelo de Proctor & Chatamra (1982), houve uma correlação positiva entre a perda de função hepática, medida pelo teste respiratório da aminopirina e a diminuição da taxa de filtração glomerular, neste estudo medida pelo *clearance* do ⁹⁹Tc-DTPA. Esses autores afirmam que, em ratos tratados com CCl₄, a aminopirina permanece constante nas primeiras semanas de tratamento, para então ir diminuindo linearmente até o final do experimento. Em cada rato, esse declínio é relativamente constante, porém costuma-se observar uma grande variação entre os animais. Eles também afirmam que a determinação da taxa de filtração glomerular pelo ⁹¹Tc-DTPA é mais precisa do que pelo *clearance* de creatinina, que tende a superestimar a filtração glomerular.

Posteriormente, esses autores (1990b) utilizando a mesma técnica de indução de cirrose e mantendo os animais em uso de CCl₄ até apresentarem sinais clínicos de ascite, observaram que os animais não apresentavam alterações no teste respiratório da aminopirina até a nona semana de uso do CCl₄, e a partir deste ponto, apresentavam piora progressiva e linear da função hepática. O tempo do início da retenção de sódio nestes animais variou entre

9 e 19 semanas. Ao chegar a esse ponto, a taxa de eliminação da aminopirina estava marcadamente reduzida. Os autores não encontraram diferenças no sódio sérico, na creatinina sérica ou na DCE entre os ratos controles e os tratados com CCl_4 quando iniciou-se a retenção de sódio, entretanto, o peso dos fígados dos animais cirróticos era significativamente menor do que o dos controles. Apesar do início da ascite, o peso final dos ratos cirróticos e controles não era diferente, provavelmente devido à perda de massa muscular, aparentemente visível nesses animais e ocorrendo concomitantemente com a retenção de sódio.

É possível que os nossos animais submetidos à indução de cirrose por CCl_4 não tenham apresentado piora dos níveis de creatinina sérica e DCE devido à provável perda de massa muscular. Dos 21 ratos que foram submetidos à indução de cirrose por CCl_4 e tiveram o diagnóstico de cirrose confirmado por estudo anátomo-patológico, 9 animais tiveram um peso final inferior ao peso inicial de 10 semanas antes. Os outros 12 animais apresentaram acréscimos de peso bastante modestos, em média 22,7 gramas (3 -62 g).

6.4 VERIFICAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL

O tamanho da amostra inicialmente calculado após estudo piloto foi de 23 ratos no grupo de cirróticos e 23 no grupo de não expostos ao CCl_4 . Entretanto, verificamos que face a não existência de diferença entre os grupos de cirróticos e não expostos ao CCl_4 o número de animais necessário para a demonstração de diferença estatisticamente significativa seria de pelo menos 114 animais para cada grupo, o que tornaria o estudo inviável, tanto do ponto de vista econômico quanto ético. Optamos então em manter o número de animais e criar um terceiro grupo como controle positivo para a técnica de verificação da PI ao ^{51}Cr -EDTA. Esse grupo consistiu de animais submetidos à inflamação intestinal induzida por um AINE, a Indometacina. Em estudo recentemente publicado, Bernardes-Silva et al. (2004), utilizando

também Indometacina para indução de inflamação intestinal, verificaram um percentual de PI de $7,9 \pm 1,3\%$ no grupo tratado contra $2,3 \pm 0,2\%$ no grupo controle ($p < 0,0001$). O efeito protetor do metronidazol sobre a enteropatia induzida por AINE também utilizando Indometacina foi verificado por Leite et al. (2001). Esses autores encontraram um percentual de PI de $8,9\%$ contra $2,0\%$ do grupo controle. Ambos os grupos, apesar de algumas diferenças quanto a dosagens e formas de aplicação da droga, obtiveram resultados macro e microscópicos bastante semelhantes. Em nosso trabalho, utilizamos o modelo proposto por Antony et al. (1993), que utiliza uma dose única de 15 mg/kg de Indometacina por gavagem, com sacrifício do animal após 48 horas, período este em que se espera que ocorra ulceração grave do intestino delgado. Em nosso grupo de 13 animais submetidos a este modelo de inflamação intestinal, somente três apresentaram mucosa intestinal sem alterações. Esses mesmos ratos apresentaram valores de PI de $3,6\%$, 5% e 30% . Em nossos experimentos, após o sacrifício, o intestino delgado dos animais era retirado em bloco, lavado com solução salina e identificadas lesões macroscópicas a olho nu. Há a possibilidade de áreas menos atingidas terem sido utilizadas para a análise histológica, uma vez que um rato apresentou um percentual de PI de 30% , valor bastante elevado. Os outros dois ratos, com valores de $3,6$ e 5% , talvez tenham apresentado um quadro de enteropatia menos intensa. Cabe lembrar que esses valores continuam sendo mais elevados do que o dos nossos animais cirróticos e não expostos ao CCl_4 , sendo difícil crer que pudessem pertencer a animais completamente normais.

A PI ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$ nos ratos do grupo cirrótico ($n=21$) não diferiu da PI nos ratos do grupo não exposto ao CCl_4 ($n=12$): $p=0,65$, teste U de Mann-Whitney: as medianas foram iguais ($0,90\%$), os percentis 25 foram respectivamente $0,63$ e $0,60\%$ e os percentis 75 foram respectivamente $1,79$ e $1,52\%$. A partir desses resultados, formulamos algumas hipóteses para a ausência de diferença entre os grupos de tratamento:

A) Os ratos cirróticos poderiam apresentar um quadro pouco intenso, demonstrado pelo pequeno número de animais com ascite. Ou tivessem um quadro de cirrose instalado há pouco tempo, sem ter desenvolvido um quadro de alteração da PI que pudesse ser detectado. Isso poderia ser confirmado através de um novo estudo, em que os animais recebessem CCl_4 por mais tempo (15 semanas) e com uma restrição dietética de 25%, esperando-se obter, com essas medidas, maior número de animais com cirrose descompensada e com menor mortalidade.

B) Os ratos cirróticos poderiam apresentar uma queda da função renal, mascarada pelos valores normais de creatinina, impedindo a plena detecção de um aumento de excreção do $^{51}\text{Cr-EDTA}$. Esses valores de creatinina poderiam ser reduzidos devido ao quadro de desnutrição que esses animais apresentaram, resultante da restrição dietética que sofreram durante o andamento do estudo. Esperaríamos que com uma restrição dietética menor os ratos não perdessem tanto peso e a dosagem da creatinina sérica fosse mais confiável. Também poderiam ser utilizadas outras técnicas de verificação da função renal, como a taxa de filtração glomerular pelo $^{99}\text{Tc-EDTA}$.

C) O $^{51}\text{Cr-EDTA}$ não seria a substância-teste ideal para detectar alterações na PI em situações de cirrose, devido à sua via de permeabilidade. O $^{51}\text{Cr-EDTA}$ de acordo com os conhecimentos atuais atravessaria livremente a camada epitelial do intestino delgado utilizando a via para-celular, através das junções firmes. Esta passagem segundo Hollander (1992) se daria principalmente nas junções firmes localizadas próximo às criptas, onde os cordões estruturais seriam menos espessos. Essa teoria foi ratificada pelo estudo de Fihn, Söqvist e Jodal (2000) que confirmaram a diferença de raio dos poros localizados na porção apical dos vilos (menores), e localizados nas criptas (maiores). Os poros localizados na porção basal dos vilos apresentariam poros de tamanho intermediário. A permeação do $^{51}\text{Cr-EDTA}$ através das junções firmes das criptas confirmaria os achados de vários estudos em que em

situações de agressão profunda da mucosa, como Doença Inflamatória Intestinal e Doença Celíaca levariam a um aumento na sua excreção urinária. Talvez a lesão intestinal associada à cirrose não se associe com alterações grosseiras da mucosa, que atinjam as junções firmes das criptas. No estudo de Campillo et al., (1999) a excreção de lactulose (que utiliza a mesma via de permeação do $^{51}\text{Cr-EDTA}$) não estava alterada. Por outro lado, a excreção de manitol estava diminuída nos pacientes cirróticos, o que causou um aumento da taxa lactulose/manitol. Devido ao manitol ser uma molécula menor e poder permear a camada epitelial tanto pela via transcelular quanto pela via para-celular, é mais influenciado pelas mudanças na área de superfície do intestino delgado. Os autores sugeriram que uma diminuição da superfície absorptiva seria o principal mecanismo envolvido nas anormalidades da PI em pacientes cirróticos.

Alguns estudos utilizando o $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ (Pérez-Paramo et al., 2000; Zhang et al., 2003a) demonstraram aumento da PI a esta substância, que se assemelha do ponto de vista físico-químico ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$. Cabe lembrar, que em ambos os estudos, os animais cirróticos apresentaram maiores percentuais de PI relacionados à presença de supercrescimento bacteriano. A diversidade de resultados nos vários estudos de PI e cirrose também pode se dever a variabilidade dos quadros clínicos e da gravidade da hepatopatia. A presença de hipertensão porta e do supercrescimento bacteriano parecem ter um papel importante na disfunção da Barreira Intestinal na cirrose, como demonstrado nos estudos de Campillo et al., 1999; Pascual et al., 2003 e Zuckermann et al., 2004.

Finalmente, um melhor entendimento das várias interações de citocinas pró-inflamatórias, hormônios, substâncias oxidantes e/ou óxido nítrico poderia esclarecer melhor o papel da Barreira Intestinal nas complicações infecciosas da cirrose.

Em resumo, padronizamos o método de verificação da PI ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$, demonstrando uma elevação dos valores percentuais utilizando um modelo de inflamação

intestinal induzida por um AINE, a Indometacina. Entretanto, a utilidade deste método para identificar alterações na PI em ratos com cirrose não pode ser demonstrada.

7 CONCLUSÕES

- Não houve diferença significativa na PI ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$ entre ratos cirróticos por CCl_4 e ratos não expostos ao CCl_4 .
- O modelo de indução de cirrose através do uso do CCl_4 por gavagem foi implantado com sucesso em 84% dos ratos.
- A técnica de verificação da PI ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$ foi implantada com sucesso e ratificada, confirmando-se sua elevação, em um modelo de inflamação intestinal induzida por Indometacina.
- Não foram encontradas alterações histológicas significativas nos intestinos delgado e grosso dos animais cirróticos e não expostos ao CCl_4 , com exceção de 3 animais que demonstraram necrose isquêmica focal do topo dos vilos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aabakken L. Cr-ethylenediaminetetraacetic acid absorption test. Methodologic aspects. *Scand J Gastroenterol.* 1989; 24:351-8.

Aabakken L, Osnes M. ⁵¹Cr-Ethylenediaminetetraacetic Acid Absorption Test: Effects of Naproxen, a non Steroidal, Anti-inflammatory Drug. *Scand J Gastroenterol.* 1990; 25:917-24.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Cells in their Social Context. In: *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition, Galrland Science, USA, 2002.

Antony A, Dhillon AP, Nygard G, Hudson M, Piasecki C, Strong P, et al. Early Histological Features of Small Intestinal Injury Induced by Indomethacin. *Aliment Pharmacol Ther* 1993; 7: 29-40.

Astaldi G, Strosselli E. Peroral Biopsy of the Intestinal Mucosa in Hepatic Cirrhosis. *Am J Dig Dis* 1960; 5: 603-612.

Bac DJ, Swart GR, van den Berg JWO, Wilson JHP. Small bowel wall function in patients with advanced liver cirrhosis and portal hypertension: studies on permeability and luminal bacterial overgrowth. *Eur J Gastroentrol Hepatol* 1993; 5: 383-387.

Barboza Jr MS, Silva TMJ, Guerrant RL, Lima AAA. Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32: 1499-1504.

Bedossa P, Poynard T. An Algorithm for the Grading of Activity in Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 1996;24: 289-293.

Benjamin MA, McKay DM, Yang PC, Cameron H, Perdue MH. Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse. *Gut* 2000; 47: 112-119.

Bernardes-Silva C, Lesão Intestinal Experimental Induzida pela Indometacina – Efeito Protetor do Ácido Ursodesoxicólico. Tese de Doutorado, USP, 2002.

Bernardes-Silva CF, Damião AO, Sipahi AM, Laurindo FR, Iriya K, Lopasso FP, et al. Ursodeoxycholic acid ameliorates experimental ileitis counteracting intestinal barrier dysfunction and oxidative stress. *Dig Dis Sci*. 2004;49:1569-74.

Bjarnason I, Peters TJ, Veall N. A Persistent Defect in Intestinal Permeability in Coeliac Disease demonstrated by a ⁵¹Cr-Labelled EDTA absorption test. *Lancet* 1983a; 323-325.

Bjarnason I, O'Morain C, Levi A.J, Peters T. Absorption of ⁵¹Chromium-Labeled Ethylenediaminetetraacetate in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 1983b; 85:318-322.

Bjarnason I, Ward K, Peters TJ. The Leaky Gut of Alcoholism: possible route of entry for toxic compounds. *Lancet*, 1984; 179-182.

Bjarnason I, Smethurst P, Levi AJ, Peters TJ. Intestinal Permeability to ⁵¹Cr-EDTA in rats with experimentally induced enteropathy. *Gut* 1985; 26: 579-585.

Bjarnason I, Peters TJ, Levi J. Intestinal Permeability: Clinical Correlates. *Dig Dis* 1986a; 4: 83-92.

Bjarnason I, Williams P, Smethurst P, Peters TJ, Levi AJ. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on the permeability of the human small intestine. *Gut* 1986b; 27: 1292-1297.

Bjarnason I, Macpherson A, Hollander D. Intestinal Permeability: An Overview. *Gastroenterology*, 1995; 108: 1566-1581.

Brewster DR, Manary MJ, Menzies IS, O'Loughlin EV, Henry RL. Intestinal Permeability in Kwashiorkor. *Arch Dis Child* 1997; 76: 236-241.

Budillon G, Parrilli G, Pacella M, Cuono R, Menzies IS. Investigation of Intestine and Liver Function in Cirrhosis using combined Sugar Oral Loads. *J Hepatol* 1985; 1: 513-524.

Buhner S, Reese I, Kuehl F, Lochs H, Zuberbier T. Pseudoallergic reactions in chronic urticaria are associated with altered gastroduodenal permeability. *Allergy* 2004; 59: 1118-1123.

Cameron GR, Karunaratne WAE. Carbon Tetrachloride Cirrhosis in Relation to Liver Regeneration. *J Pathol Bact* 1936; 42:1-21.

Campillo B, Pernet P, Bories PN, Richardet JP, Devanlay M, Aussel C. Intestinal permeability in liver cirrhosis: relationship with severe septic complications. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 755-759.

Castilla-Cortázar I, Prieto J, Urdaneta E, Pascual M, Nuñez M, Zudaire E, Garcia M, Quiroga J, Santidrian S. Impaired Intestinal Sugar Transport in Cirrhotic Rats: Correction by low doses of Insulin-like Growth Factor I. *Gastroenterology* 1997; 113: 1180-1187.

Castilla-Cortázar I, Pascual M, Urdaneta E, Pardo J, Puche Je, Vivas B, Díaz-Casares A, García M, Díaz-Sanchez M, Varela-Nieto I, Castilla A, González-Barón S. Jejunal microvilli

atrophy and reduced nutrient transport in rats with advanced liver cirrhosis: improvement by Insulin-like Growth Factor I. *BMC Gastroenterology* 2004; 4: 12.

Clayburgh DR, Shen L, Turner JR. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest* 2004; 84: 282-291.

Cremonese RV, Pereira-Filho AA, Magalhães R, Mattos A.A., Marroni,CA, Zettler CG, Marroni NP. Cirrose experimental induzida pela inalação de Tetracloro de Carbono: adaptação da técnica e avaliação da peroxidação lipídica. *Arq Gastroenterol* 2001; 38: 40-47.

DeMeo MT, Mutlu EA, Keshavarzian A, Tobin MC. Intestinal Permeation and Gastrointestinal Disease. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34: 385-396.

DeWitt RC, Kudsk KA. The Gut's Role in Metabolism, Mucosal Barrier Function and Gut Immunology. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13: 465-481.

Dickman KG, Hempson SJ, Anderson J, Lippe S, Zhao L, Burakoff R, Shaw R. Rotavirus alters paracellular permeability and energy metabolism in Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G757-G766.

Ersöz G, Aydin A, Erdem S, Yüksel D, Akarca U, Kumanlioglu K. Intestinal Permeability in Liver Cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 409-412.

Farhadi A, Banan A, Fields J, Keshavarzian A. Intestinal barrier: An interface between health and disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 479-497.

Fihn BM, Sjöqvist A, Jodal M. Permeability of the Rat Small Intestinal Epithelium along the Villus-Crypt Axis: Effects of Glucose Transport. *Gastroenterology* 2000; 119: 1029-1036.

Fresko I, Hamuryudan V, Demir M, Hizh N, sayman H, Melikoglu M, Tunç R, Yurdakul S, Yazici H. Intestinal Permeability in Behçet's Syndrome. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 65-66.

Friedmann SL. The cellular basis of hepatic fibrosis – mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1835.

Fuchs M, Pfeiffer A, Kuntzen O, Kaess H. Intestinal permeability in liver cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis [abstract]. *Gastroenterology* 1997; 112(suppl):A1266.

Fujii, T.; Seki, T.; Maruoka, M.; Tanaka, J.; Kawashima, Y.; Watanabe, T.; Sawamura, T.; Inoue, K. Lactulose-L-rhamnose intestinal permeability test in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2001; 19: 158-169.

Garcia-Tsao G, Lee FY, Barden GE, Cartun R, West AB. Bacterial Translocation to Mesenteric Lymph Nodes is Increased in Cirrhotic Rats with Ascites. *Gastroenterology* 1995; 108: 1835-1841.

Garcia-Tsao G. Bacterial translocation: cause or consequence of decompensation in cirrhosis? *J Hepatol* 2001; 34: 150-155.

Garcia-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 353-372.

Goldani HAS, Matte US, Ramos ARL, Costa TG, Winkelmann LV, Meurer L, Vieira SMG, Kieling CO, Silveira TR. Effect of food restriction on hepatic fibrosis and cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats. (no prelo)

Hashimoto N, Ohyanagi H. Effect of acute portal hypertension on gut mucosa. *Hepatogastroenterology*. 2002; 49:1567-70

Hirsch SB, Chaves GL, Gotteland MR, Maza PC, Petermann MT, Barrera PP, Bunout DB. Permeabilidad intestinal en alcohólicos sin daño hepático. *Rev Méd Chile* 1997; 125: 653-658.

Hollander D. The Intestinal Permeability Barrier: A Hypothesis as to Its Regulation and Involvement in Crohn's Disease. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 721-726.

Huglo D, De Botton S, Canva-Delcambre V, Colombel JF, Wallaert B, Steinling M, Marchandise X. Simultaneous determination of pulmonary and intestinal permeability in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Eur J Nucl Med* 2001; 28:1505-11.

Jiang Z, You D, Chen X, Wu J, Monitoring of serum markers for fibrosis during CCl₄ – induced liver damage. Effects of anti-fibrotic agents. *J Hepatol* 1992; 16: 282-289.

Keshavarzian A, Holes EW, Patel M, Iber F, Foelds JZ, Pethkar S. Leaky Gut in Alcoholic Cirrhosis: A Possible Mechanism for Alcohol-Induced Liver Damage. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 200-207.

Leite AZ, Sipahi AM, Damiao AO, Coelho AM, Garcez AT, Machado MC, Buchpiguel CA, Lopasso FP, Lordello ML, Agostinho CL, Laudanna AA. Protective effect of metronidazole on uncoupling mitochondrial oxidative phosphorylation induced by NSAID: a new mechanism. *Gut* 2001; 48:163-7.

Losser MR, Payen D. Mechanisms of liver damage. *Semin Liver Dis* 1996; 16: 357-367.

Madara JL, Trier JS. Structural Abnormalities of Jejunal Epithelial Cell Membranes in Celiac Sprue. *Lab Invest* 1980; 43: 254-261.

Madrid AM, Cumsille F, Defilippi C. Altered Small Bowel Motility in Patients with Liver Cirrhosis depends on Severity of Liver Disease. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 738-742.

Maksan SM, Ryschich E, Ülger Z, Gebhard MM, Schmidt J. Disturbance of hepatic and intestinal microcirculation in experimental liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11:846-849.

Martin, M.B.R. et al. Estudio de la Permeabilidad Intestinal en Enfermos Celíacos con EDTA-Cr⁵¹. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1994; 24: 37-40.

McLean EK, McLean AEM, Sutton PM. An improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. *Br J Exp Path* 1969, 50; 502-506.

Meddings JB, Swain MG. Environment Stress-Induced Gastrointestinal permeability is mediated by Endogenous Glucocorticoids in the Rat. *Gastroenterology* 2000; 119: 1019-1028.

Menzies IS, Pouder R, Heyer S, Laker MF, Bull J, Wheeler PG, Creamer B. Abnormal intestinal permeability to sugars in villous atrophy. *Lancet* 1979; 1107-1109.

Mitic LL, Itallie CMV, Anderson JM. Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G250-G254.

Misra V, Misra SP, Dwivedi M, Gupta SC. Histomorphometric Study of Portal Hypertensive Enteropathy. *Am J Clin Pathol* 1997; 108: 652-657.

National Institutes of Health. Guide for the care and use of laboratory animals. Maryland, National Research Council/Public Health Service, 1996.

Nagrál AS, Joshi AS, Bhatia SJ, Abrahan P, Mistry FP, Vora IM. Conjestive Jejunopathy in Portal Hypertension. *Gut* 1993; 34: 694-697.

Norman DA, Atkins JM, Seelig LL, Gomez-Sanchez C, Krejs GJ. Water and Electrolyte Movement and Mucosal Morphology in the Jejunum of Patients with Portal Hypertension. *Gastroenterology* 1980; 79: 707-715.

Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G851-G857.

Nuvital www.nuvital.com.br/produtos_laboratorio_camundongos.php acesso em 26/03/2004.

Pascual S, Such J, Esteban A, Zapater P, Casellas JA, Aparicio JR, Girona E, Gutierrez A, Carnices F, Palazon JM, Sola-Vera J, Perez-Mateo M. Intestinal permeability is increased in patients with advanced cirrhosis. *Hepato-gastroenterology* 2003;50:1482-6.

Peeters M, Geypens B, Claus D, Nevens H, Ghoois Y, Verbeke G, Baert F, Vermeire S, Vlietinck R, Rutgeerts P. Clustering of Increased Small Intestinal Permeability in Families with Crohn's Disease. *Gastroenterology* 1997; 113: 802-807.

Pérez-Paramo M, Muñoz J, Albillos A, Freile I, Portero F, Santos M, Ortiz-Berrocal J. Effect of Propranolol on the Factors promoting Bacterial Translocation in Cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 2000; 31: 43-48.

Piquet MA, Laurent D, Manceau S, Even C, Collet T, Arsène D, Jauzac P, Verwaerde JC, Dao T. Increased Intestinal Permeability in patients with cirrhosis [abstract]. *Gastroenterology* 1997; 112(suppl):A1266.

Portela-Gomes, G, Martins, MM, Correia, JP. Ultrastructural Changes of Jejunal Epithelial Cells in Liver Cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 1974; 9, 657-663.

Proctor E, Chatamra K. High Yield Micronodular Cirrhosis in the Rat. *Gastroenterology* 1982; 83: 1183-90.

Quigley EMM. Gastrointestinal Dysfunction in Liver Disease and Portal Hypertension: Gut-Liver Interactions Revisited. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 557-563.

Ramachandran A, Balasubramanian KA. Intestinal dysfunction in liver cirrhosis: Its role in spontaneous bacterial peritonitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16:607-12.

Ramachandran A, Prabhu R, Thomas S, Reddy JB, Pulimmod A, Balasubramanian KA. Intestinal Mucosal Alterations in Experimental Cirrhosis in the Rat: Role of Oxygen Free Radicals. *Hepatology* 2002; 35: 622-629.

Rao PS, Mangipudy RS, Mehendale HM. Tissue injury and repair as parallel and opposing responses to CCl₄ hepatotoxicity: a novel dose-response. *Toxicology* 1997; 118: 181-193.

Reilly JA, Quigley EMM, Forst CF, Rikkers LF. Small Intestinal Transit in the Portal Hypertensive Rat. *Gastroenterology* 1991; 100: 670-674.

Rhoden EL, Pereira-Lima J, Rhoden CR, Zettler CG, Barros EG. Modelo experimental de indução de cirrose hepática em ratos por tetracloreto de carbono. *GED*, 1991; 10: 149-152.

Rhoden EL, Mauri M, Petteffi L, Dacanal F, Pilla M, Barros E, Belló-Klein A, Telöken C, Rhoden CR. Efeitos do Alopurinol na função renal após isquemia e reperfusão do rim: Estudo experimental em ratos. *Revista Brasileira de Cirurgia*, 1997; 87: 225-22.

Romiti A, Merli M, Martorano M, Parrili G, Martino F, Riggio O, Truscetti A, Capocaccia L, Budillon G. Malabsorption and nutritional abnormalities in patients with liver cirrhosis. *Ital J Gastroenterol* 1990; 22: 118-123.

Rosa H, Parise ER, Paranhos FRL, Braga AL, Freitas ASO, Hidalgo AN, Mor MBL. Controlled Production of Cirrhosis in the Rat. *Arq Gastroenterol* 1991; 28: 39-43.

Runyon BA, Sugano, S, Kanel, G, Mellencamp A. A rodent model of cirrhosis, ascites and bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1991; 100: 489-493.

Santos J, Yang PC, Söderholm JD, Benjamin M, Perdue MH. Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut* 2001; 48: 630-636.

Sawamura R, Fernandes, MIM, Troncon LEA. Alterações da Permeabilidade Intestinal em Crianças. *Arq Gastroenterol* 1994; 31: 30-38.

Sawamura R., Fernandes MIM, Troncon LEA, Yazigi N. Aumento da Permeabilidade Intestinal ao ⁵¹Cr-EDTA em Crianças com Diarréia Persistente. *Arq Gastroenterol* 1997; 34: 55-61.

Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO, Schulzke JD. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 1999; 112: 137-146.

Scott KGE, Meddings JB, Kirk DR, Lees-Miller SP, Buret AG. Intestinal Infection with *Giardia* spp. Reduces Epithelial Barrier Function in a Myosin Light Chain Kinase-Dependent Fashion. *Gastroenterology* 2002; 123: 1179-1190.

Secondulfo M, Iafusco D, Carratù R, deMagistris L, Sapone A, Generoso M, Mezzogiorno A, Sasso FC, Carteni M, DeRosa R, Prisco F, Esposito V. Ultrastructural mucosal alterations and increased intestinal permeability in non-celiac, type I diabetic patients. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 35-45.

Seki M, Kasama K, Imai K. Effect of food restriction on hepatotoxicity of carbon tetrachloride in rats. *J Toxicol Sci* 2000; 25: 33-40.

Seki T, Maruoka M, Tanaka J, Kawashima Y, Watanabe T, Sawamura T, Inoue K. Lactulose-L-rhamnose intestinal permeability test in patients with liver cirrhosis *Hepatol Res* 2001;19:158-169.

Söderholm JD, Perdue MH. Stress and the Gastrointestinal Tract II. Stress and intestinal barrier function. *Am J Physiol Gastroint Liver Physiol* 2001; 280: G7-G13.

Strauss E, Caly WR. Peritonite Bacteriana Espontânea. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36: 711-717.

Such J, Guardiola JV, de Juan J, Casellas JA, Pascual S, Aparicio JR, Sola-Vera J, Perez-Mateo M. Ultrastructural characteristics of distal duodenum mucosa in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14:371-6.

Schulze JD, Bentzel CJ, Chulze I, Riecken EO, Fromm M. Epithelial Tight Junction Structure in the Jejunum of Children with Acute and Treated Celiac Sprue. *Pediatr Res* 1998; 43: 435-441.

Taylor RM, Bjarnason I, Cheeseman M, Davenport M, Baker AJ, Mieli-Vergani G, Dhawan A. Intestinal Permeability and Absorptive Capacity in Children with Portal Hypertension. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 807-811.

The French METAVIR Cooperative Study Group. Intraobserver and Interobserver Variations in Liver Biopsy Interpretation in Patients with Chronic Hepatitis C. *Hepatology*. 1994;20(1 Pt 1):15-20.

Thomson ABR, Drozdowski L, Iordache C, Thomson BKA, Vermeire S, Clandinin MT, Wild G. Small Bowel Review – Normal Physiology, part 2. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1565-1581.

Toh Y, Korenaga D, Maekawa S, Matsumata T, Muto Y, Ikeda T, Sigimachi K. Assessing the Permeability of the Gastrointestinal Mucosa after Oral Administration of Phenolsulfonphthalein. *Hepato-gastroenterology* 1997; 44: 1147-1151.

Travis S, Menzies I. Intestinal Permeability: Functional Assessment and Significance. *Clin Sci*, 1992; 82: 471-488.

Troncon LEA, Pires CR, Kraus OA, Yazigi N. Estudo da Permeabilidade Intestinal pelo Teste do ⁵¹Cr-EDTA: Utilidade Clínica na detecção de Alterações Estruturais do Epitélio do Intestino Delgado. *Arq Gastroenterol* 1996; 33: 66-73.

Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin Liver Dis* 1990; 10:56-65.

Uil JJ, Van Elburg FM, Overbeek CJJ, Mulder CJJ, Vanberge-Henegouwen, Heymans HAS. Clinical implications of the sugar absorption test: intestinal permeability test to assess mucosal barrier function. *Scand J Gastroenterol suppl* 1997. 223: 70-78.

Van Elburg RM, Uil JJ, Van Aalderen WMC, Mulder CJJ, Heymans HAS. Intestinal Permeability in Exocrine Pancreatic Insufficiency due to Cystic Fibrosis or Chronic Pancreatitis. *Ped Res* 1996; 39: 985-991.

Vieira SMG, Matte U, Kieling CO, Barth AL, Ferreira CT, Souza AF, Taniguchi A, Silveira TR. Infected and Noninfected Ascites in Pediatric Patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40: 289-294.

Xu W, XJ Wu, Li J. Influence of portal pressure change on intestinal permeability in patients with portal hypertension. *HBPD Int* 2002; 1: 510-514.

Walker, A.W. Development of the intestinal mucosal barrier. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2002; 34: S33-S39.

Wanless IR. Chapter 1. Physioanatomic Considerations. In: Schiff's Diseases of the Liver. Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC. 8th edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999.

Wensing G, Sabra R, Branch RA. Renal and systemic hemodynamics in experimental cirrhosis in rats: relation to hepatic function. *Hepatology* 1990a; 12: 13-19.

Wensing G, Sabra R, Branch RA. The Onset of Sodium Retention in Experimental Cirrhosis in Rats is Related to a Critical Threshold of Liver Function. *Hepatology* 1990b; 11: 779-786.

Werneck-Silva AL, Sipahi AM, Damião AOMC, Buchpiguel CA, Iriya K, Laudanna AA. Intestinal Permeability in Strongyloidiasis. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 353-357.

Zhang S, Wang W, Ren W, Dai Q, He B, Zhou K. Effects of lactulose on intestinal endotoxin and bacterial translocation in cirrhotic rats. *Chin Med J* 2003a;116: 767-71.

Zhang S, Wang W, Ren W, He B, Zhou K, Zhu W. Effect of cisapride on intestinal bacterial and endotoxin translocation in cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2003b; 9: 534-538.

Zim MCA, Silveira TR, Schwartzmann G, Cerski T, Motta A Potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity by pentosan polysulfate in rats. *Braz J Med Biol Res* 2002 35:1339-1346.

Zuckerman MJ, Menzies IS, Path FRC, Ho H, Gregory GG, Casner NA, Crane RS, Hernandez JA. Assessment of Intestinal Permeability and Absorption in Cirrhotic Patients with Ascites using Combined Sugar Probes. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 621-626.

ANEXOS

DADOS BRUTOS

