

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

**CIRROSE EXPERIMENTAL INDUZIDA EM RATOS:
AVALIAÇÕES HEPÁTICAS E PULMONARES**

RENATA SALATTI FERRARI

Porto Alegre – RS

2012

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

**CIRROSE EXPERIMENTAL INDUZIDA EM RATOS:
AVALIAÇÕES HEPÁTICAS E PULMONARES**

RENATA SALATTI FERRARI

Orientador(a): Norma Possa Marroni

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre – RS

2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que de alguma forma contribuíram para a realização do mesmo.

Aos meus pais, Graça e Renato, pelo incentivo, apoio, confiança e amor incondicional.

Ao Thyago, pelo companheirismo, compreensão, ajuda e, em especial, por todo amor ao longo deste percurso.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Norma Possa Marroni, pela oportunidade, orientação, incentivo, paciência, correções e desafios.

Ao Prof. Dr. Alexandre Simões Dias, pelo apoio constante tornando-se um guia e incentivador deste trabalho, pelo exemplo e pela amizade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Hepatologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em destaque a Silvia (pela ajuda na formatação e revisão), Mariana, Filipe, Néelson, Mariel, Graziella, Renata, Francielle e todos os outros aqui não citados. Agradeço a qualquer tipo de ajuda e incentivo que tenham sido oferecidos.

Em especial, aos colegas que se tornaram amigos de verdade, Felipe, Luiz e Darlan, obrigada pela amizade e todos os ensinamentos durante estes anos.

A todos os amigos verdadeiros de fora do laboratório que de alguma forma me acalmaram, incentivaram e acreditaram em mim, em especial a Camila Schaan, pela parceria em todos os momentos.

Ao Centro de Pesquisa do HCPA, ao FIPE financiador deste projeto, a toda Unidade de Experimentação Experimental (UEA) pelo suporte que foi essencial para que esta dissertação se concluísse.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

RESUMO

O uso de tetracloreto de carbono (CCl_4) em ratos é um modelo experimental de dano ao tecido hepático, desencadeando fibrose e, a longo prazo, cirrose. A cirrose hepática é uma doença crônica progressiva que representa um estado de disfunção hepática irreversível ou lentamente reversível, caracterizado pela formação de nódulos fibróticos. Este estudo possui como objetivo avaliar as alterações hepáticas e pulmonares causadas pelo modelo de cirrose hepática através da utilização de CCl_4 intraperitoneal. Foram utilizados 18 ratos Wistar machos divididos em 3 grupos: grupo controle (CO) e outros 2 grupos divididos pelo tempo de indução da cirrose por CCl_4 . G1 (11 semanas), G2 (16 semanas). Verificamos a elevação significativa no nível das transaminases hepáticas, na lipoperoxidação do tecido hepático e pulmonar (TBARS) e nas enzimas antioxidantes SOD e CAT, além de um aumento da expressão de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ no pulmão dos animais cirróticos. Observamos alteração nas trocas gasosas de ambos os grupos cirróticos. Podemos concluir que nosso modelo reproduziu a cirrose hepática, além de causar alterações no sistema pulmonar, provocando alteração nas trocas gasosas e alterando o tamanho dos vasos pulmonares.

PALAVRAS-CHAVE: Tetracloreto de Carbono, Cirrose, Modelos Animais

ABSTRACT

The use of carbon tetrachloride (CCl₄) in rats is an experimental model of hepatic tissue damage, which leads to fibrosis, and at the long term, cirrhosis. Cirrhosis is a chronic progressive disease that represents a state of irreversible or slowly reversible hepatic dysfunction, characterized by fibrotic nodules formation. The aim of this study is to evaluate the changes caused by cirrhosis in lung and liver, through the experimental model of intraperitoneal CCl₄ administration. We used 18 male Wistar rats divided into three groups: control (CO) and two groups divided by the time of cirrhosis induction by CCl₄. G1 (11semanas), G2 (16semanas). We found significant increase of transaminase levels and lipid peroxidation (TBARS) in liver and lung tissue. Also, increased antioxidant enzymes SOD and CAT, as well as the expression of TNF- α and IL-1 β in the lung of cirrhotic animals. We observed changes in gas exchange in both cirrhotic groups. We can conclude that our model reproduces the liver cirrhosis, that causes alterations in the pulmonary system that leads to changes in gas exchange and size of pulmonary vessels.

KEYWORDS: Carbon Tetrachloride, Cirrhosis, Animal Models

LISTA DE TABELAS

REVISÃO

Tabela 1 - Importantes radicais livres e espécies reativas no sistema biológico26

ARTIGO

Table 1 - Enzymes Liver Health and Relationships.....49

Table 2 - Values of Arterial Blood Gases Analysis.....53

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO

Figura 1: Célula estrelada, forma quiescente e ativada.....	14
Figura 2: Célula estrelada em um processo de dano hepático.....	15
Figura 3: Ativação das células estreladas no processo de dano hepático.	17
Figura 4: Arquitetura hepática com injúria crônica..	18
Figura 5: Endoteliopatia na circulação vascular intra-hepática.....	19
Figura 6: Locais de aumento da resistência vascular.....	20
Figura 7: Geração de radicais livres e a injúria hepática pela ação do CCl ₄	21
Figura 8: Respiração mitocondrial e a redução do O ₂ em H ₂ O.	25
Figura 9: Sistema de defesa antioxidante no dano oxidativo induzido por RLs.....	28
Figura 10: Interação entre as enzimas antioxidantes sobre os RLs e as EROs.....	30

ARTIGO

Figure 1: Average TBARS values in the livers of different groups.	50
Figure 2: Average TBARS values in the lungs of the different groups.....	50
Figure 3: Average SOD values in the livers of the different groups.	51
Figure 4: Average values of SOD in the lungs of the different groups.....	51
Figure 5: Average CAT enzyme values in the livers of the different groups.	52
Figure 6: Average CAT enzyme values in the lungs of the different groups.	52
Figure 7: Photomicrograph of liver tissue (20x).	54
Figure 8: Photomicrograph of lung tissue (100x).	55
Figure 9: The expression of tumor necrosis factor (TNF- α) in the lungs of the different groups.	56
Figure 10: The expression of Interleukin-1 β in the lungs of the different groups.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
μmol	Micromolar
<	Menor
>	Maior
AOX	Antioxidante
ALT	Alanina-aminotransferase
AST	Aspartato-aminotransferase
CAT	Catalase
CCl_3	Triclorometil
CCl_4	Tetracloroeto de Carbono
CO_2	Dióxido de carbono
CEH	Célula Estrelada Hepática
cGMP	Guanosina Monofosfato Cíclico
e^-	Elétron
EAO	Espécies Ativas de Oxigênio
ET-1	Endotelina 1
EH	Encefalopatia Hepática
EO	Estresse Oxidativo
EUA	Estados Unidos da América
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FA	Fosfatase Alcalina
Fe	Ferro
g	Grama
4-HNE	4-hidroxyononal
H^+	Hidrogênio
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina e Eosina
HPP	Hipertensão Portopulmonar
Kg	Quilograma
L	Litro
LPO	Lipoperoxidação
mg	Miligrama
MEC	Matriz Extracelular

MDA	Malondealdeído
ml	Mililitro
Nash	Esteato-hepatite não alcoólica
NO	Óxido Nítrico
O^{·-}	Oxigênio <i>singlet</i>
O₂	Oxigênio
O²⁻	Ânion superóxido
OH[·]	Radical hidroxila
OOCCI[·]	Triclorometil Peroxil
PaCO₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
PaO₂	Pressão de oxigênio
PDGF	Fator de Crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial de Hidrogênio
QL	Quimiluminescência
ROO[·]	Radical peroxil
SOD	Superóxido dismutase
SHP	Síndrome Hepatopulmonar
TBARS	Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
TGF β	Fator de crescimento tumoral beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
μg	Micrograma
μl	Microlitro

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA	12
1 REFERENCIAL TEÓRICO	13
1.1 FÍGADO.....	13
1.2 CIRROSE HEPÁTICA	15
1.2.1 Etiologia da cirrose hepática.....	15
1.2.2 Fisiopatogenia da cirrose hepática	16
1.3 TETRACLORETO DE CARBONO	20
1.4 ALTERAÇÕES PULMONARES NA CIRROSE HEPÁTICA	22
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES.....	24
1.5.1 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio.....	24
1.5.2 Antioxidantes	28
1.5.2.1 <i>Antioxidantes enzimáticos</i>	29
1.5.2.2 <i>Antioxidantes não enzimáticos</i>	30
2 OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO	33
ARTIGO A SER SUBMETIDO	41
Oxidative stress and pulmonary changes in experimental liver cirrhosis.....	42
CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
PERSPECTIVAS FUTURAS	63
ANEXOS	64
ANEXO A - Produção científica durante a vigência do mestrado.....	65
ANEXO A.1 - Artigo enviado à publicação.....	68
ANEXO B - Certificado de revisão do inglês dos artigos.....	79

INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

A associação entre doença hepática e sintomas pulmonares é comum em pacientes com doença hepática crônica, sendo estes fatores reconhecidos há mais de 100 anos. Entretanto, somente nos últimos quinze anos alterações vasculares pulmonares específicas associadas com a presença de doença hepática e/ou hipertensão portal têm sido submetidas a maiores investigações (1).

A cirrose hepática é uma doença crônica progressiva que representa um estado de disfunção hepática irreversível ou lentamente reversível caracterizado pela formação de nódulos fibróticos. Ocorre como resultado da cicatrização e regeneração hepatocelular, que constitui a principal resposta do tecido hepático para os incontáveis insultos inflamatórios, tóxicos metabólicos e congestivos (2).

Muitas são as razões pelas quais os pacientes com cirrose apresentam queixas respiratórias, sendo muito frequentes as disfunções pulmonares consequentes à doença hepática. Existem duas síndromes pulmonares distintas que ocorrem em pacientes com doença hepática crônica as quais têm sido motivo de muitos estudos, sendo elas a hipertensão portopulmonar (HPP) e a síndrome hepatopulmonar (SHP) (3, 4).

Atualmente, o transplante de fígado continua sendo a única opção de cura. Avanços recentes auxiliam na compreensão da história natural, na fisiopatologia da cirrose e no tratamento de suas complicações, resultando em melhoria da gestão, qualidade de vida e expectativa de vida de pacientes cirróticos (5). Terapias farmacológicas que podem deter a progressão para cirrose descompensada ou até mesmo cirrose reversa estão sendo estudadas.

A indução experimental da doença hepática pode mimetizar com precisão as alterações histológicas, bioquímicas, hemodinâmicas, renais e neuro-humorais observadas na disfunção hepática humana. Através de estudos experimentais, podemos acompanhar o progresso fisiopatológico e as complicações da cirrose hepática.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 FÍGADO

O fígado é caracterizado por ser um dos maiores órgãos do corpo humano. Está situado na cavidade abdominal, abaixo do diafragma, na porção superior direita do abdômen. Suas unidades morfológicas, os lóbulos hepáticos direito e esquerdo são separados por uma prega do peritônio denominada ligamento falciforme (6). É um órgão hematopoiético com capacidade regenerativa e que possui microambientes imunológicos exclusivos (7).

A posição ocupada pelo fígado, na cavidade abdominal, entre o sistema porta e a cava favorece a captura, transformação, acúmulo e neutralização de substâncias (8). O fígado possui diversas funções importantes para o organismo, tais como: síntese de várias substâncias (proteínas, açúcares); secreção de sais e ácidos biliares; armazenamento (lipídios, vitaminas); biotransformação (substâncias tóxicas, drogas, hormônios, medicamentos) e metabolismo (lipídios, proteínas, carboidratos). As funções ainda incluem filtração e armazenamento de sangue, ferro e formação de fatores de coagulação (9).

Nos lóbulos, as células hepáticas ou hepatócitos dispõem-se em placas orientadas radialmente a partir de uma veia central e entrelaçadas de forma ordenada por sinusóides. Os sinusóides são condutos de sangue, que não possuem parede estruturada e são revestidos por dois tipos celulares: células endoteliais típicas dos capilares sanguíneos e os macrófagos que no fígado são denominados como células de Kupffer. Entre os hepatócitos e os sinusóides, encontra-se um espaço estreito, denominado espaço de Disse, onde se localizam as células estreladas hepáticas (CEHs) (10-12).

As CEHs possuem forma estrelada e são constituídas por longas extensões citoplasmáticas, onde podem regular o fluxo sanguíneo e a hipertensão portal. Possuem propriedades contráteis e fibrogênicas, constituindo o principal local de formação de matriz extracelular (MEC) (13, 14). As CEHs constituem uma população

celular heterogênea que difere na capacidade de armazenamento de lipídeos, na expressão e organização de filamentos do citoesqueleto e no potencial para produção de MEC. Este aspecto reflete a capacidade de apresentar dois fenótipos: quiescente e ativado (Figura 1) (11-13).

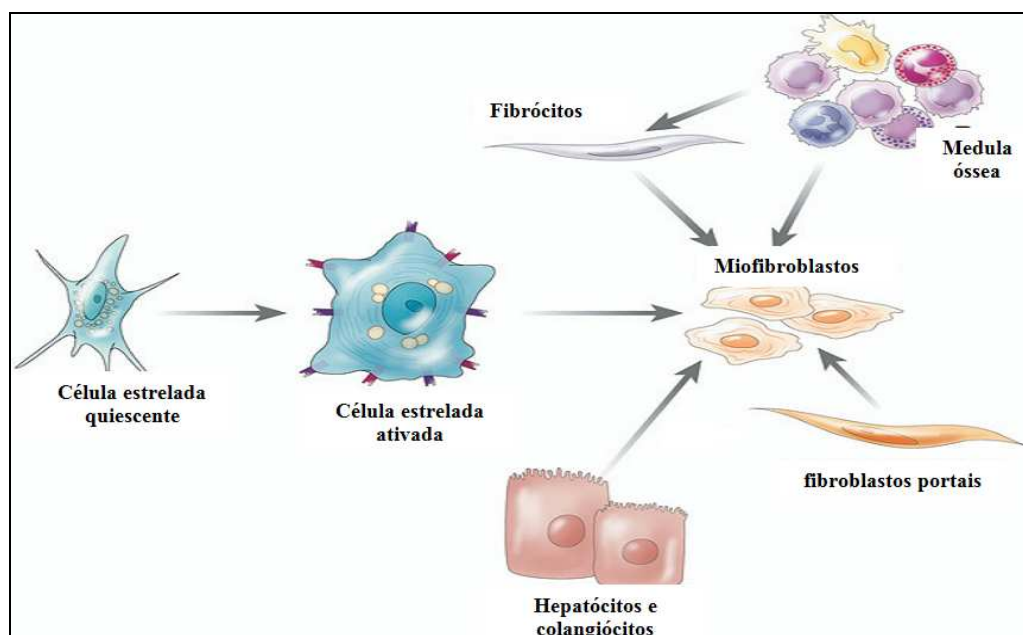


Figura 1: Célula estrelada, forma quiescente e ativada.

Fonte: Adaptada (11).

Sabe-se que a Interleucina-1 (IL-1) pode desempenhar um papel na manutenção das CEHs, que são responsáveis pela fibrogênese hepática. Estudos têm relatado que a atividade das c-Jun quinases N-terminal (JNK) na proliferação, transformação, apoptose, e outros processos biológicos podem ser induzidas por lipopolissacáridos, TNF- α e IL-1 (15).

Vários mediadores têm sido demonstrados como promotores da ativação das CEHs, incluindo endotelina-1 (ET-1), angiotensina II e leptina (16-18). Além disso, várias moléculas, como o fator de necrose tumoral- α (TNF α), fator de crescimento transformador beta (TGF β), inibidor de metaloproteinase-1 TIMP-1, colágeno Tipo I e integrinas, mostraram ser fibrogênicas por inibir a apoptose das CEHs, contribuindo

para o aumento do número destas em locais de dano hepático e, conseqüentemente, aumentando o processo de fibrogênese (Figura 2).

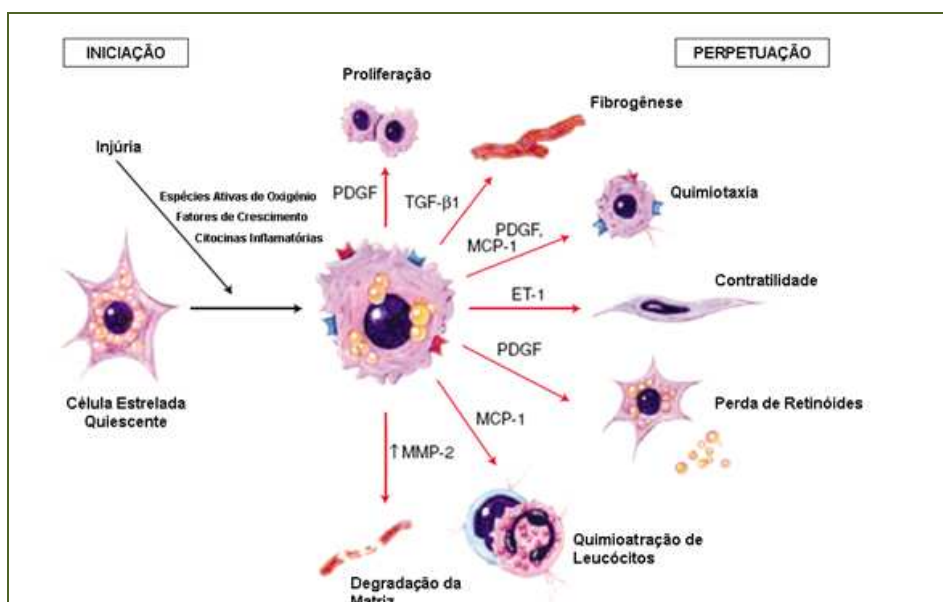


Figura 2: Célula estrelada em um processo de dano hepático.

Fonte: Adaptada (19).

1.2 CIRROSE HEPÁTICA

1.2.1 Etiologia da cirrose hepática

A doença hepática crônica, decorrente da destruição e regeneração das células hepáticas, ocasionando, do ponto de vista histológico, presença de fibrose e formação nodular difusa, com conseqüente desorganização da arquitetura lobular e vascular do órgão. A cirrose representa a via final comum da lesão hepática crônica independentemente do agente etiológico que produza a lesão (10, 20).

A cirrose apresenta distribuição global, independente de raça, idade e gênero. Estima-se prevalência que varia de 4,5% a 9,5% de acordo com estudos de necropsia, o que poderia corresponder a cerca de 100 milhões de pessoas acometidas em todo o mundo (21).

A hepatite viral, especialmente do tipo B, constitui a principal causa de cirrose em países da Ásia, ao passo que, em países desenvolvidos, os principais agentes são o álcool, o vírus C e, mais recentemente, a esteato-hepatite não alcoólica. Em ambulatorios institucionais, o álcool representa, ainda, a principal causa de hepatopatia crônica. Entretanto, em levantamento da Sociedade Brasileira de Hepatologia (SBH), quando são avaliados pacientes da clínica privada, o uso excessivo de etanol é bem menos frequente e a hepatite C representa a principal causa de hepatopatia crônica nessa população (20).

Em decorrências dos avanços sorológicos e imunoistoquímicos, a cirrose tem sido classificada de acordo com a sua etiologia, sendo que os principais agentes etiológicos causadores da cirrose podem ser classificados como: metabólicos, virais, alcoólicos, induzidos por fármacos, autoimunes, biliares, obstrutivos do efluxo venoso hepático e criptogênicos (20).

1.2.2 Fisiopatogenia da cirrose hepática

Mesmo considerando que a fisiopatologia e a histopatologia da cirrose variam de acordo com o agente etiológico, o padrão histológico final é sempre o mesmo: um processo difuso caracterizado pela presença de fibrose e uma conversão da arquitetura normal do fígado em nódulos estruturais. Suas sequelas ocorrem em múltiplos órgãos e sistemas do organismo, principalmente nos sistemas cardiocirculatório, renal, pulmonar, neurológico e metabólico e suas principais consequências são: cardiomiopatia cirrótica, varizes de esôfago (hipertensão portal), ascite, síndrome hepatorenal, SHP, HPP, encefalopatia hepática, metabolismo de drogas alterado, osteodistrofia hepática e carcinoma hepatocelular (6, 22).

Os achados morfológicos mais importantes da cirrose incluem: fibrose difusa, nódulos regenerativos, arquitetura lobular alterada e *shunts* vasculares intra-hepáticos. Outras características relevantes abrangem: capilarização dos sinusóides e fibrose perissinusoidal, trombose vascular e lesões obliterativas no trato portal e nas veias hepáticas, bem como sinais de hipóxia do parênquima lobular. Juntas, essas alterações são responsáveis pelo desenvolvimento de hipertensão portal e

suas complicações, sendo este o principal mecanismo relacionado com a morte na cirrose hepática (23).

As doenças hepáticas crônicas são caracterizadas pela destruição progressiva do parênquima, acúmulo de MEC (incluindo colágeno I, III e IV) devido à síntese aumentada e à incapacidade para quebrar estas proteínas, levando à distorção da arquitetura hepática (13, 24).

As CEHs, quando ativadas, seja por qual for a etiologia, apresentam maior capacidade de proliferação, motilidade, contratilidade, síntese de colágeno e componentes da MEC. Possuem processos citoplasmáticos aderidos aos sinusóides e podem afetar o fluxo sanguíneo sinusoidal (Figura 3) (22, 25).

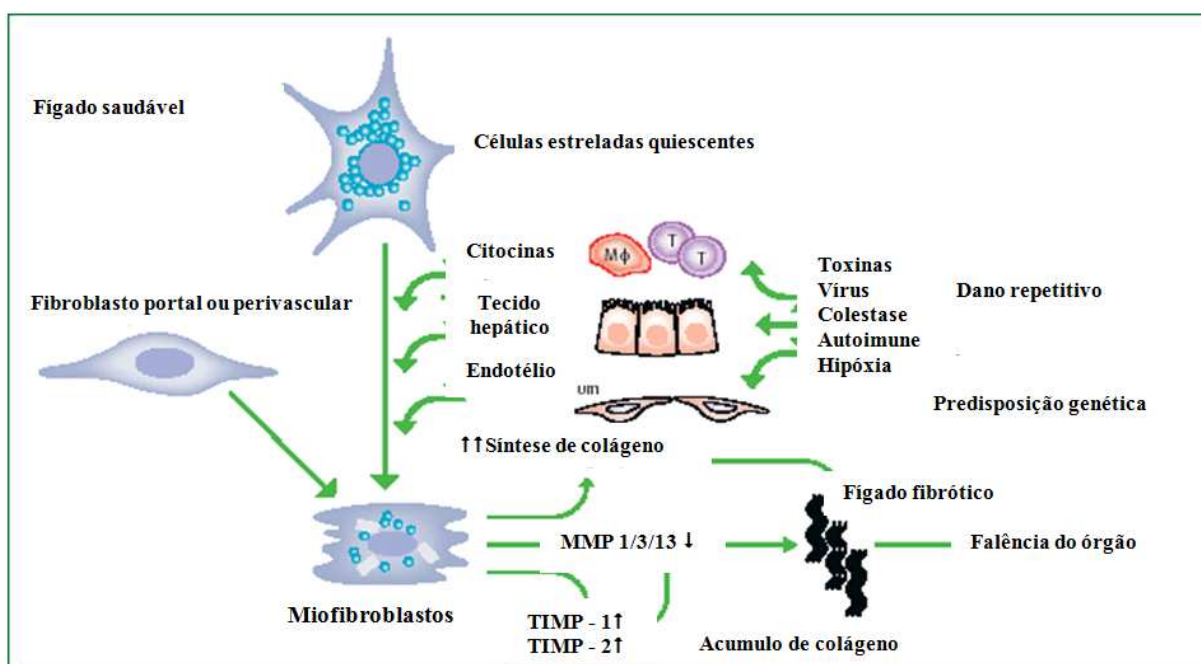


Figura 3: Ativação das células esteladas no processo de dano hepático.

Fonte: Adaptada (22).

Na lesão hepática crônica, uma matriz fibrilar, produzida pela ativação das células esteladas, acumula-se no espaço subendotelial. Isso resulta em perda das microvilosidades dos hepatócitos, reduz o tamanho e o número das fenestrações. A colagenização do espaço de Disse resulta em menor acesso de substâncias ligadas

às proteínas aos hepatócitos. Estas alterações podem ser acompanhadas pela ativação das células de Kupffer dentro dos sinusóides (Figura 4) (11-13).

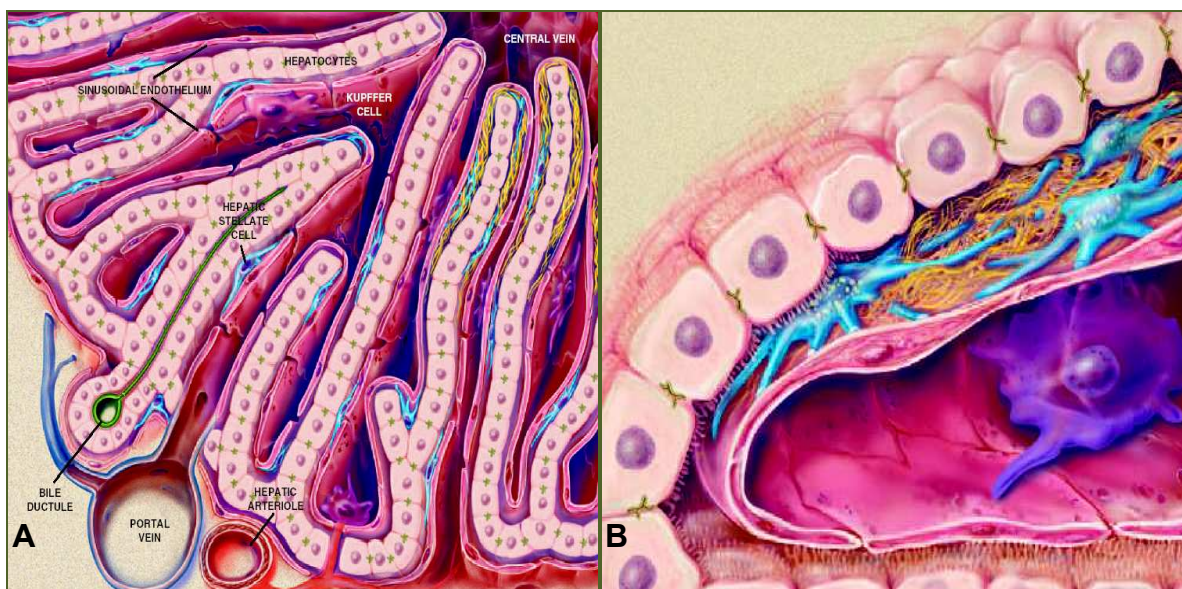


Figura 4: Arquitetura hepática com injúria crônica. Em (A) mostra o sinusóide hepático e a presença de cordões de hepatócitos e o acúmulo de MEC, em (B) desenho de alta resolução do espaço subendotelial com a ativação das CEHs e células de Kupffer e perda das fenestrações.

Fonte: (12).

No fígado normal ocorre o equilíbrio entre as substâncias vasoconstritoras (ex: ET-1) e as substâncias vasodilatadoras (ex: óxido nítrico - NO). No entanto, no fígado injuriado, ocorre desequilíbrio dessas substâncias, com aumento da síntese de ET-1 e diminuição da produção de NO, levando o fígado à endoteliopatia (Figura 5). Nesse contexto, ocorre contratilidade aumentada das células esteladas, constrição sinusoidal, com aumento da resistência intra-hepática ao fluxo sanguíneo.

Após a ativação das células esteladas, a expressão das proteínas do músculo liso é aumentada e as vias sinalizadoras são potencializadas. Além dos mediadores citados, existem outros, como a angiotensina II, prostanoídes e monóxido de carbono que podem também desempenhar um papel na endoteliopatia encontrada na cirrose. Finalmente, a disfunção endotelial pode estar presente nos compartimentos vasculares intra-hepáticos não sinusoidais (26).

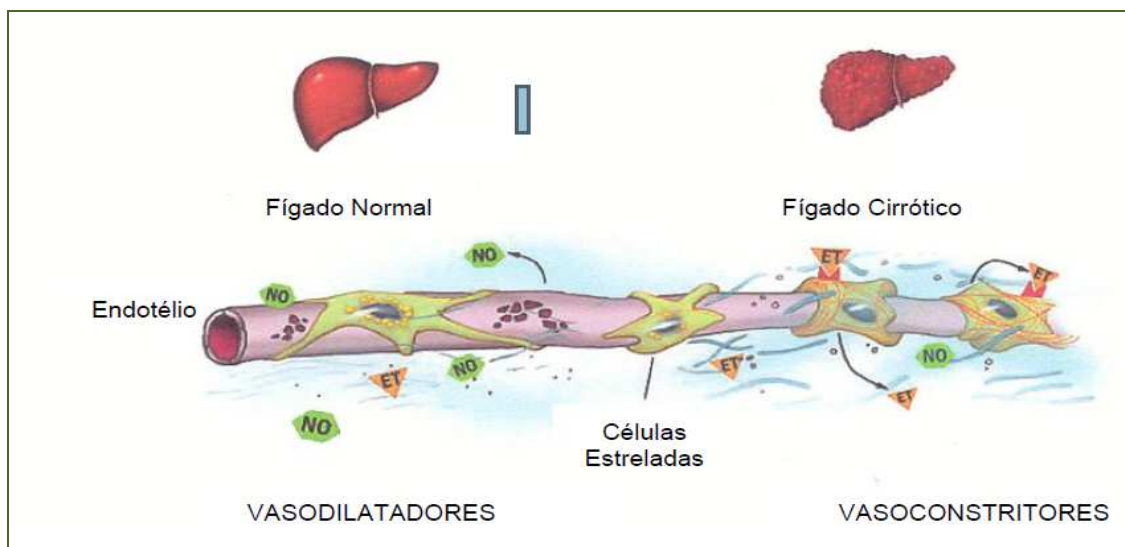


Figura 5: Endoteliopatia na circulação vascular intra-hepática
Fonte: Adaptada (26).

A cirrose provoca dificuldade do sangue em transitar pelo fígado devido à resistência aumentada ao fluxo portal e à compressão das veias hepáticas terminais pela fibrose perivascular e nódulos parenquimatosos expansivos (27).

A hipertensão portal quase sempre resulta da obstrução no sistema porta. Anatomicamente o local da obstrução pode ser pré-hepático, intra-hepático ou pós-hepático (Figura 6) (28).

Na cirrose, é bem estabelecido que o fator primário, que leva à hipertensão portal, é o aumento da resistência vascular ao fluxo portal e que o aumento do fluxo torna-se especialmente importante em fases mais avançadas da doença. Reconhece-se o importante papel da alteração estrutural da microcirculação hepática (fibrose, capilarização dos sinusóides e nódulos de regeneração) como o mecanismo mais importante para o aumento da resistência vascular na cirrose, processo esse que, na maioria das vezes, é considerado irreversível (29).

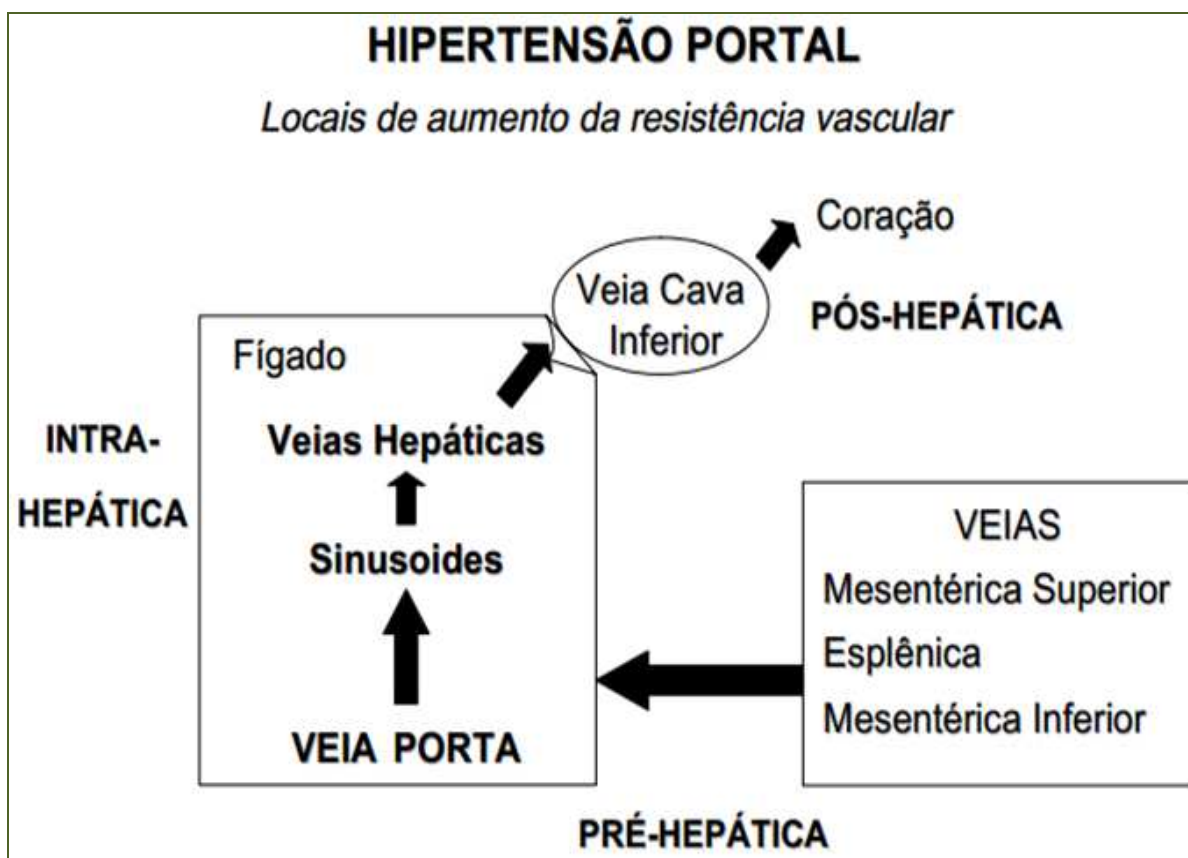


Figura 6: Locais de aumento da resistência vascular.
Fonte: Adaptada (29).

Para o estudo da cirrose e de todos os seus mecanismos envolvidos, existem várias drogas capazes de ocasionar experimentalmente a lesão hepática, entre elas o tetracloreto de carbono (CCl_4) (30-33).

1.3 TETRACLORETO DE CARBONO

A administração de CCl_4 é um modelo bem conhecido para a reprodução da lesão hepática química (34). O CCl_4 é uma hepatotóxica que causa lesão ao fígado, mediada pelo aumento de radicais livres. E, quando administrado em doses baixas, induz fibrose e posteriormente cirrose hepática (35, 36).

Diversos estudos utilizaram o CCl_4 com o objetivo de estabelecer a cirrose, sendo administrado experimentalmente por diversas vias como via inalatória (37-41), intraperitoneal (31, 42, 43), intragástrica (44) e *in vitro* (45).

A hepatotoxicidade do CCl_4 envolve sua metabolização pelo citocromo P450 nos hepatócitos dando origem ao radical triclorometil ($\bullet\text{CCl}_3$) e triclorometil peroxil ($\text{OOC}\bullet\text{Cl}_3$). Estes radicais livres são instáveis e imediatamente reagem com os componentes da membrana iniciando uma reação em cadeia que leva à lipoperoxidação (LPO).

A formação destes radicais relaciona-se com a hepatotoxicidade envolvida na resposta inflamatória. Algumas células hepáticas, incluindo células de Kupffer, CEHs e sinusoidais, são as ativadas para secretar citocinas que irão mediar a fibrogênese, desempenhando um papel importante na patofisiologia da cirrose hepática (Figura 7) (46).

Os metabólitos tóxicos do CCl_4 atingem várias proteínas, incluindo as presentes no retículo endoplasmático rugoso e nas mitocôndrias. Além disso, gera radicais livres e espécies reativas de oxigênio causando a oxidação de proteínas celulares e dano extenso ao DNA mitocondrial prejudicando a síntese mitocondrial pelo fígado.

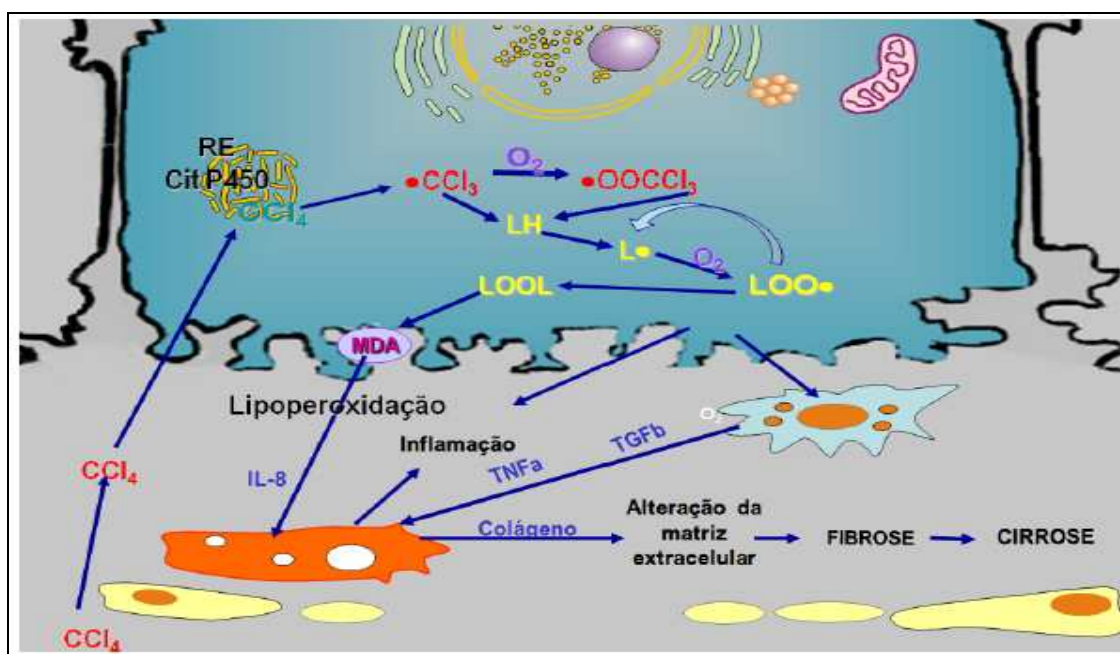


Figura 7: Geração de radicais livres e a injúria hepática pela ação do CCl_4 .
Fonte: Adaptada (47).

Este modelo experimental é eficaz no desencadeamento da fibrose e, a longo prazo, cirrose (40, 48, 49).

1.4 ALTERAÇÕES PULMONARES NA CIRROSE HEPÁTICA

A hipertensão portal, juntamente com a cirrose, pode causar complexas alterações do leito vascular pulmonar, dentre elas a SHP e a HPP.

As alterações vasculares pulmonares relacionadas com as doenças hepáticas crônicas, o amplo espectro de desestruturação da vasculatura pulmonar e a hipertensão portal apresentam extensa variação: desde a SHP, caracterizada por dilatações vasculares intrapulmonares, até a HPP, na qual a resistência vascular pulmonar está elevada.

Suas apresentações clínicas são muito diferentes, incluindo alterações nas trocas gasosas, como na SHP, até falência hemodinâmica, como na HPP (1, 50).

Os pacientes com cirrose hepática apresentam queixas respiratórias, possuem fadiga e fraqueza muscular em membros inferiores, podendo também apresentar grande variedade de doenças pulmonares ditas comuns, tais como bronquite crônica, especialmente entre alcoolistas, que frequentemente fumam e apresentam episódios de infecção pulmonar (51).

As doenças crônicas do fígado, especialmente a cirrose, podem estar associadas com hipoxemia arterial, que resulta da combinação de alterações na relação ventilação-perfusão e de *shunts* pela dilatação vascular intrapulmonar (52, 53).

Acredita-se que a dilatação vascular intrapulmonar pode estar relacionada à translocação bacteriana do trato gastrointestinal – fenômeno que expõe o pulmão ao efeito de endotoxinas e citocinas inflamatórias (54, 55).

Esse aumento de endotoxinas na circulação pulmonar promove o acúmulo de macrófagos intravasculares na microcirculação pulmonar e se correlaciona com o aumento da expressão da óxido nítrico induzível (iNOS) (56).

A patogênese do “*shunt*” intrapulmonar na SHP é dominada por doenças do fígado. Um desequilíbrio entre vasoconstritores e vasodilatadores e entre os fatores hepáticos que estimulam o crescimento celular e inibição endotelial evoluem para o

desenvolvimento de dilatação vascular intrapulmonar. Fatores de crescimento originários no fígado, tais como fator de crescimento hepático e fator de crescimento vascular endotelial, estimulam o crescimento de pequenos vasos pulmonares. Conseqüentemente, o “*shunt*” intrapulmonar ocorre através de canais vasculares dilatados, além do que as incompatibilidades de ventilação e perfusão e de restrição de difusão de oxigênio resultam em hipoxemia. Sabe-se que estas dilatações intrapulmonares vasculares da SHP são causadas pela doença hepática (57).

Já a hipertensão pulmonar associada à cirrose e sem doença de base demonstrável (pulmonar ou cardíaca) é chamada de HPP. A patogênese da HPP é um distúrbio raro (58, 59). Dados demonstram que a hipertensão pulmonar primária torna-se 20 vezes mais frequente em pacientes com cirrose do que na população geral. O risco no desenvolvimento de hipertensão pulmonar aumenta com a duração da hipertensão portal, sem qualquer relação clara com o grau de hipertensão portal, insuficiência hepática, ou a quantidade de sangue desviado (59).

Histologicamente, o exame microscópico mostra hiperplasia das arteríolas e artérias pulmonares com espessamento da íntima e estenose do lúmen, além de necrose da parede vascular, dilatação aneurismática, trombose local, recanalização do lúmen vascular e a proliferação celular. Os mecanismos da HPP são desconhecidos (51).

Os investigadores possuem a hipótese de que fatores humorais derivados da circulação esplâncica, que normalmente seriam eliminados pelo metabolismo hepático, atingem a circulação pulmonar por causa dos desvios portossistêmicos e da insuficiência hepática. Estas substâncias modificam a função da célula endotelial, promovendo a vasoconstrição, trombose e atividade mitogênica na circulação pulmonar. A proliferação celular induz a hipertrofia da media, lesões plexogênicas e formação de novos vasos sanguíneos (59, 60).

Pacientes com HPP apresentam sintomas como dispneia, síncope e dores precordiais. O teste de diagnóstico não invasivo mais utilizado é o ecocardiograma transtorácico. A presença de um átrio ou ventrículo direito dilatado, insuficiência valvar pulmonar, ou deslocamento do septo interventricular para o ventrículo esquerdo na ecocardiografia transtorácica, pode levantar a suspeita de hipertensão pulmonar. A combinação de um resultado de gasometria alterado com um

ecocardiograma anormal tem sido um esquema de seleção útil para identificar pacientes com HPP (51).

Além destas distintas complicações da cirrose hepática, estudos experimentais e clínicos que avaliam dano pulmonar relatam apoptose precoce de macrófagos e alterações nos níveis de IL-1, IL-8 e TNF- α , desempenhando um papel importante no desenvolvimento da fibrose pulmonar (61, 62).

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

1.5.1 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio

As propriedades tóxicas do oxigênio permaneceram obscuras até a publicação de Gershman sobre a teoria da toxicidade dos Radicais Livres (RLs) de oxigênio em 1954, afirmando que a toxicidade do oxigênio é parcial devido às formas reduzidas de oxigênio (63). A presença de RLs em sistemas biológicos foi explorada em 1956, por Denham Harman, que propôs o conceito de que os RLs participavam do processo de envelhecimento (64).

A segunda fase de pesquisas sobre os RLs em sistemas biológicos foi explorada em 1969 quando McCord e Fridovich descobriram a enzima superóxido dismutase (SOD), surgindo evidências claras sobre a importância dos radicais livres em sistemas vivos (65). Uma terceira era de estudos sobre radicais livres em sistemas biológicos ocorreu em 1977, quando Mittal e Murad apresentaram provas de que o radical hidroxila (OH•) estimula a ativação da guanilato ciclase e a formação do segundo mensageiro: a guanosina monofosfato cíclico (cGMP) (66).

Desde então, um grande conjunto de evidências acumulou-se de que os sistemas vivos não têm apenas uma adaptada convivência com os RLs, mas têm desenvolvido vários mecanismos para o vantajoso uso dos RLs em várias funções fisiológicas (67).

O oxigênio é um elemento vital; porém, pode se tornar potencialmente nocivo para as células, em certas condições, sendo o responsável por reações químicas extremamente tóxicas (68).

A molécula de oxigênio, em seu estado natural, é um birradical que possui dois elétrons com *spin* de mesmo sentido, o que lhe confere certa estabilidade e o

impede de agir como um RL. No entanto, esta condição lhe confere características de potente oxidante, ou seja, aceitando elétrons de outras moléculas (69, 70).

Intermediários da redução parcial do oxigênio são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio *singlet* (1O_2) e radical hidroxil (OH^{\bullet}). Todos são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) por serem capazes de existir de forma independente (69).

Nas membranas mitocondriais encontram-se as proteínas transportadoras de elétrons, principalmente do complexo citocromo que reduzem uma molécula de oxigênio (O_2) à água (H_2O) durante o processo de respiração (Figura 8). A redução completa de uma molécula de O_2 a H_2O requer quatro elétrons. Sendo assim, 95 a 98% de O_2 recebem quatro elétrons de uma só vez através do sistema complexo citocromo-oxidase, na redução tetraeletrônica. Porém, em cerca de 5% dos casos, a redução é monovalente, ou seja, a molécula de oxigênio recebe apenas um elétron de cada vez (70, 71).

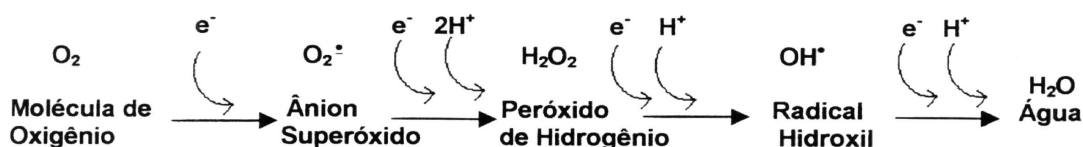


Figura 8: Respiração mitocondrial e a redução do O_2 em H_2O .
Fonte: (72).

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons não pareados em orbitais atômicos ou moleculares (73).

Esse elétron não pareado geralmente ocasiona um considerável grau de reatividade aos radicais livres, tendo o potencial de oxidar moléculas biológicas, incluindo proteínas, lipídios, glicídios e ácidos nucleicos. Quantidades aumentadas de metabólitos oxidados destas moléculas têm sido detectadas em pacientes com uma variedade de doenças (74).

Os RL ou as ERO, bem como espécies reativas de nitrogênio (ERN), são bastante conhecidos por serem produtos do metabolismo celular normal e por

desempenharem um duplo papel, uma vez que podem ser deletérias/nocivas ou benéficas para os sistemas vivos (Tabela 1) (67). Radicais derivados do oxigênio representam a classe mais importante de espécies radicais geradas em sistemas vivos (75).

Tabela 1 - Importantes radicais livres e espécies reativas no sistema biológico

RADICAIS LIVRES	NÃO-RADICAIS
Espécies Reativas de Oxigênio Superóxido, $O_2^{\cdot -}$ Hidroxila, OH^{\cdot} Peroxila, RO_2^{\cdot} Alcoxila, RO^{\cdot} Carbonato, $CO_3^{\cdot -}$	Peróxido de hidrogênio, H_2O_2 Oxigênio singlet, 1O_2 Peróxidos orgânicos, $ROOH$
Espécies Reativas de Cloro Cloro atômico, Cl^{\cdot}	Ácido hipocloroso, $HOCl$ Gás cloro, Cl_2 Nitro-cloro-benzeno, NO_2Cl
Espécies Reativas de Nitrogênio Óxido nítrico, NO Dióxido de nitrogênio, NO_2^{\cdot}	Ácido nitroso, HNO_2 Cátion nitrosila, NO^+ Ânion nitrosila, NO^- Tetra óxido dinitrogênio, N_2O_4 Tri óxido dinitrogênio, N_2O_3 Peroxinitrito, $ONOO^-$ Ácido Peroxinitroso, $ONOOH$ Alquil Peroxinitrito, $ROONO$

Fonte: Adaptado (76).

Os radicais livres e as ERO são consideradas hepatotóxicas em altas concentrações, devido ao seu potencial de reação com a maioria das macromoléculas celulares e enzimas inativas, causando danos ao DNA, modificando proteínas e induzindo reações em cadeia de lipoperoxidação (LPO) (77, 78).

Estas reações em cadeia ocorrem quando um RL reage com um composto não radical, formando outro(s) RL(s). Dessa forma, podem ser produzidos efeitos biológicos distantes do sítio de geração do primeiro RL formado. São efeitos gerais da peroxidação lipídica: diminuição da fluidez da membrana, dano às proteínas de membrana, desarranjos e inativação de receptores, de enzimas, de canais de íons e potenciação da lise celular (76).

Sabe-se que o estresse oxidativo (EO) é uma situação em que existe aumento das EROs em relação aos seus níveis fisiológicos normais (79). Esta situação é definida como um desequilíbrio entre as defesas oxidantes e antioxidantes (AOX) a favor dos oxidantes (80). As consequências geradas decorrentes do EO podem ser classificadas como sutis ou muito agressivas, incluindo dano oxidativo às biomoléculas, interrupção do sinal de transdução, mutação e morte celular e isso depende do balanço entre a geração das espécies reativas formadas e das defesas antioxidantes presentes nas células (81).

O estresse oxidativo através da geração de ERO desempenha um papel importante na produção de danos ao fígado. A perturbação oxidativa de lipídios, proteínas e DNA induz necrose e apoptose dos hepatócitos, amplificando a resposta inflamatória, resultando na iniciação de fibrose. Além disso, EROs estimulam a produção de mediadores profibrogênicos a partir de células de Kupffer e células inflamatórias circulantes (11, 82).

Os hepatócitos, quando lesados, são uma potente fonte de RLs. As células de Kupffer acabam gerando RL em resposta à lesão hepática. Estes RL exercem estimulação parácrina sobre as células estreladas. Além disso, sua atividade é amplificada pelo esgotamento de antioxidantes como normalmente ocorre no fígado doente (12).

O desenvolvimento da cirrose hepática é comumente associada ao estresse oxidativo e à LPO.

O trato respiratório é um alvo importante de danos causados por oxidantes, tanto de origem endógena quanto exógena, pelo fato de estar em contato direto com o meio externo e exposto a elevadas concentrações de oxigênio (83, 84). As espécies reativas produzidas pelos fagócitos são a principal causa de dano tissular associado a doenças pulmonares inflamatórias crônicas.

O estresse oxidativo ocasionado nos pulmões, os marcadores de lesão pulmonar e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , e IL-6) mostram-se aumentados nos estudos de lesão pulmonar, bem como níveis de citocinas pró-inflamatórias significativamente mais elevados e acentuada elevação de MDA (85).

Sob condições patológicas, concentrações anormalmente elevadas de ERO nas células podem levar a mudanças permanentes na transdução da sinalização e na expressão genética, como observado nas doenças inflamatórias crônicas (86).

1.5.2 Antioxidantes

A célula apresenta um sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático que tem como objetivo impedir, varrer ou eliminar estes RLs do meio, impedindo a LPO (Figura 9).

Os antioxidantes podem ser definidos como “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz”. O termo oxidável inclui macromoléculas (tais como, proteínas, lipídios, hidrato de carbono e DNA). A função desses compostos é manter os níveis intracelulares de ERO em baixas concentrações e, para isso, atuam prevenindo a formação dessas espécies ou combatendo-as uma vez que tenham sido formadas (88).

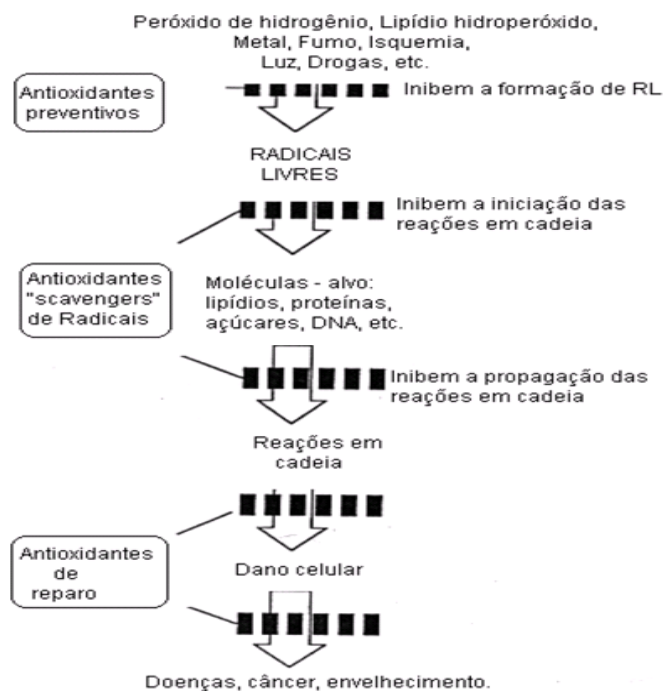


Figura 9: Sistema de defesa antioxidante no dano oxidativo induzido por RLs.
Fonte: (87).

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células (89). Os mecanismos de defesa contra estresse oxidativo induzido por radicais livres envolvem: (i) mecanismos preventivos, (ii) mecanismos de reparo, (iii) defesas físicas, e (iv) as defesas antioxidantes (Figura 9). As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas e não enzimáticas (90).

1.5.2.1 Antioxidantes enzimáticos

O sistema antioxidante enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. Existem também as defesas secundárias que impedem a propagação da LPO e as terciárias, enzimas de reparo de danos já instalados (76).

Quando a substância age neutralizando as ERO na fase de iniciação ou propagação da LPO, levando à formação de um composto menos reativo, é chamada de *scavenger*. Ao passo que, se a substância antioxidante tiver a propriedade de absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os, é denominada de *quencher* (80).

As enzimas antioxidantes que controlam os níveis de ERO são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), sendo que cada uma delas desempenha papel específico no controle do balanço oxidativo, realizando a interceptação e a desativação das ERO impedindo a oxidação posterior de outras moléculas (91).

A SOD tem por principal função atuar na dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em H_2O_2 e O_2 (91). O H_2O_2 , apesar de não ser um radical, facilmente reage, originando o radical hidroxil. A remoção dos peróxidos ocorre por meio das enzimas CAT e da GPx, tendo a CAT mais afinidade ao peróxido de hidrogênio, peróxido de metila e etila, enquanto a GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos (92).

A GPx, que se localiza no citosol e na matriz mitocondrial, atua através da oxidação da glutathiona reduzida (GSH). Para re-estabelecer a glutathiona reduzida à oxidada (GSSG), é necessário que a glutathiona redutase (GR) promova a

regeneração da GSSG, consumindo NADPH. A atuação das enzimas antioxidantes na degradação de RLs e ou EROs está demonstrado na Figura 10 (93).

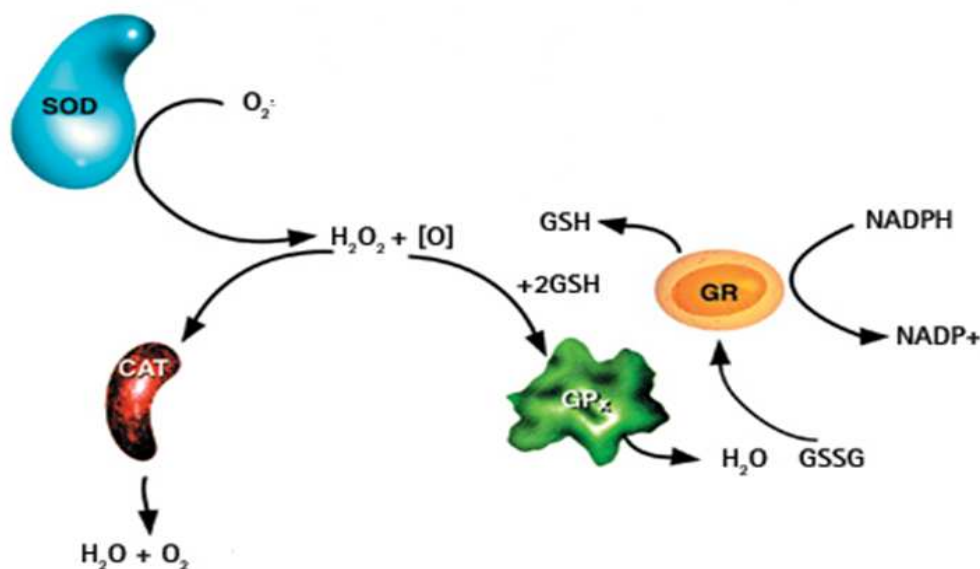


Figura 10: Interação entre as enzimas antioxidantes sobre os RLs e as EROs.

1.5.2.2 Antioxidantes não enzimáticos

Existem substâncias que atuam como antioxidantes, evitando reações em cadeia como a LPO. Elas são conhecidas como defesas antioxidantes não enzimáticas, sendo as mais conhecidas a glutatona, o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), β -carotenos e flavonoides (90, 94, 95).

Entre as principais defesas antioxidantes, a glutatona é considerada o antioxidante não enzimático hidrossolúvel mais importante por participar de inúmeras reações de óxido-redução (96, 97). Um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina) existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular.

Em particular, problemas na síntese e metabolismo da glutatona estão associados a algumas doenças, nas quais os níveis de glutatona e das enzimas que

atuam no seu metabolismo podem ser bastante significativos no diagnóstico de alguns tipos de câncer, bem como em outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo (76).

A vitamina C é um composto hidrossolúvel que atua como cossustrato na biossíntese do colágeno, catecolaminas e carnitina. Atua como *scavenger* de $O_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet} com a formação de um composto intermediário que é reduzido sucessivamente pela GSH (94).

A forma da vitamina E com maior atividade química é o α -tocoferol, um composto lipossolúvel. Sua ação, como antioxidante, está associada à inibição da peroxidação de lipídios (98).

β -carotenos têm sido considerados porque apresentam a capacidade de neutralizar radicais, agindo principalmente com o oxigênio *singlet* (99).

Um grupo de antioxidantes que muitas vezes é sugerido em terapias devido ao seu potencial papel no apoio à saúde são os flavonoides. Estes são metabólitos secundários sintetizados pelas plantas e pertencem ao grupo dos compostos fenólicos (100, 101). Muitos trabalhos têm mostrado a redução da fibrose em diferentes modelos experimentais de cirrose após tratamento com flavonoides (31, 38, 39, 41, 102), assim como da redução da hipertensão portal, uma das complicações da cirrose (103).

Tendo em vista essas considerações, pretendemos avaliar o fígado e o pulmão de ratos cirróticos induzidos por CCl_4 e analisar as alterações pulmonares decorrentes da cirrose experimental.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar as alterações hepáticas e pulmonares na cirrose hepática experimental induzida em ratos pela administração de CCl₄ i.p.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar as enzimas séricas de integridade hepática, aminotransferases Aspartato (AST) e Alanina (ALT) e fosfatase alcalina (FA);
- Avaliar os níveis de lipoperoxidação no tecido hepático e pulmonar através das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Avaliar no tecido hepático e pulmonar, a atividade antioxidante, das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT);
- Verificar as alterações na difusão de gases através da gasometria arterial nos diferentes grupos experimentais;
- Analisar a histologia do tecido hepático e do tecido pulmonar, através da coloração hematoxilina e eosina (HE);
- Quantificar os níveis pulmonares de TNF α e IL-1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

1. Fallon MB. Mechanisms of pulmonary vascular complications of liver disease: hepatopulmonary syndrome. *J Clin Gastroenterol*. 2005 Apr;39(4 Suppl 2):S138-42. PubMed PMID: 15758649. eng.
2. Vercelino R, Tieppo J, Forgiarini Junior LA, Dias AS, Marroni CA, Marroni NP. [Experimental models for assessment of pulmonary alterations in hepatopulmonary syndrome]. *J Bras Pneumol*. 2008 Jul;34(7):453-60. PubMed PMID: 18695789. por.
3. Hoepfer MM, Krowka MJ, Strassburg CP. Portopulmonary hypertension and hepatopulmonary syndrome. *Lancet*. 2004 May;363(9419):1461-8. PubMed PMID: 15121411. eng.
4. Huffmyer JL, Nemergut EC. Respiratory dysfunction and pulmonary disease in cirrhosis and other hepatic disorders. *Respir Care*. 2007 Aug;52(8):1030-6. PubMed PMID: 17650360. eng.
5. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008 Mar;371(9615):838-51. PubMed PMID: 18328931. Pubmed Central PMCID: PMC2271178. eng.
6. Sherlock S, Dooley J. Doenças do fígado e do sistema biliar. Rio de Janeiro 2004.
7. Watanabe T, Kudo M, Chiba T, Wakatsuki Y. Molecular mechanisms of portal vein tolerance. *Hepato Res*. 2008 Apr 22;38(5):441-9. PubMed PMID: 18070053. Epub 2007/12/12. Eng.
8. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. Guanabara Koogan ed 2004.
9. Guyton AC. *Tratado de Fisiologia Médica*. Guanabara Koogan ed 2002.
10. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol*. 2003;38 Suppl 1:S38-53. PubMed PMID: 12591185. eng.
11. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008 May;134(6):1655-69. PubMed PMID: 18471545. eng.
12. Friedman SL, Arthur MJP. Reversing Hepatic Fibrosis. *Sci Med*(4):194–205 2002.
13. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 2008 Jan;88(1):125-72. PubMed PMID: 18195085. Pubmed Central PMCID: PMC2888531. eng.
14. Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbic MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, et al. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate

- cells. *Gastroenterology*. 2000 Jun;118(6):1149-56. PubMed PMID: 10833490. Epub 2000/06/02. eng.
15. Zhang Y, Yao X. Role of c-Jun N-terminal kinase and p38/activation protein-1 in interleukin-1 β -mediated type I collagen synthesis in rat hepatic stellate cells. *APMIS*. 2012 Feb;120(2):101-7. PubMed PMID: 22229265. eng.
 16. Cho JJ, Hocher B, Herbst H, Jia JD, Ruehl M, Hahn EG, et al. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2000 Jun;118(6):1169-78. PubMed PMID: 10833492.
 17. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005 Feb;115(2):209-18. PubMed PMID: 15690074.
 18. Saxena NK, Titus MA, Ding X, Floyd J, Srinivasan S, Sitaraman SV, et al. Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *Faseb J*. 2004 Oct;18(13):1612-4. PubMed PMID: 15319373.
 19. Hui A, Friedman S. Molecular basis of hepatic fibrosis. *Expert Rev Mol Med*. 2003 Feb;5(5):1-23. PubMed PMID: 14987408. eng.
 20. Mattos de AA, Dantas-Corrêa EB. *Tratado de Hepatologia*. Rubio ed 2010.
 21. Melato M, Sasso F, Zanconati F. Liver cirrhosis and liver cancer. A study of their relationship in 2563 autopsies. *Zentralbl Pathol*. 1993 Mar;139(1):25-30. PubMed PMID: 8388716. eng.
 22. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008 Mar 8;371(9615):838-51. PubMed PMID: 18328931. eng.
 23. Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *J Clin Pathol*. 1978 May;31(5):395-414. PubMed PMID: 649765. Pubmed Central PMCID: PMC1145292. eng.
 24. Chávez E, Segovia J, Shibayama M, Tsutsumi V, Vergara P, Castro-Sánchez L, et al. Antifibrotic and fibrolytic properties of celecoxib in liver damage induced by carbon tetrachloride in the rat. *Liver Int*. 2010 Aug;30(7):969-78. PubMed PMID: 20524983. eng.
 25. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol*. 2003;38 Suppl 1:S38-53. PubMed PMID: 12591185. eng.
 26. Rockey DC, Friedman SL. Chapter 6 - Hepatic Fibrosis and Cirrhosis. In: Thomas DB, Md, Teresa LW, Michael P. Manns MD, editors. *Zakim and Boyer's Hepatology (Fifth Edition)*. Edinburgh: W.B. Saunders; 2006. p. 87-109.
 27. Sherlock S, Dooley J. *Doenças do fígado e do sistema biliar*. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
 28. Nogueira Jr. *Doenças do aparelho digestivo*. Byk-Prociencx ed 1981.

29. Gupta TK, Chen L, Groszmann RJ. Pathophysiology of portal hypertension. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1997 Jun;11(2):203-19. PubMed PMID: 9395744. eng.
30. Kong X, Horiguchi N, Mori M, Gao B. Cytokines and STATs in Liver Fibrosis. *Front Physiol.* 2012;3:69. PubMed PMID: 22493582. Pubmed Central PMCID: PMC3318231. eng.
31. Pavanato A, Tunon MJ, Sanchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, Gonzalez-Gallego J, et al. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 2003 Apr;48(4):824-9. PubMed PMID: 12741479.
32. Cameron J, Karunarete W. Tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration *J Pathol Bacteriol* [Internet]. 1936; 42:[1-21 pp.].
33. Pereira-Filho G, Ferreira C, Schwengber A, Marroni C, Zettler C, Marroni N. Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats. *Arq Gastroenterol.* 2008 Apr-Jun;45(2):156-62. PubMed PMID: 18622472. eng.
34. Amália PM, Possa MN, Augusto MC, Francisca LS. Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. *Dig Dis Sci.* 2007 Oct;52(10):2616-21. PubMed PMID: 17431769. eng.
35. Muriel P, Escobar Y. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *J Appl Toxicol.* 2003 Mar-Apr;23(2):103-8. PubMed PMID: 12666154. Epub 2003/04/01. eng.
36. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol.* 2003;33(2):105-36. PubMed PMID: 12708612. eng.
37. Cremonese RV, Pereira-Filho AA, Magalhaes R, de Mattos AA, Marroni CA, Zettler CG, et al. [Experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride inhalation: adaptation of the technique and evaluation of lipid peroxidation]. *Arq Gastroenterol.* 2001 Jan-Mar;38(1):40-7. PubMed PMID: 11586997. Cirrose experimental induzida pela inalacao de tetracloreto de carbono: adaptacao da tecnica e avaliacao da peroxidacao lipidica. por.
38. da Rosa DP, Bona S, Simonetto D, Zettler Z, Marroni CA, Marroni NP. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats *Arquivos de Gastroenterologia.* 2010;47.
39. Pereira-Filho G, Ferreira C, Schwengber A, Marroni C, Zettler C, Marroni N. Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats. *Arq Gastroenterol.* 2008 Apr-Jun;45(2):156-62. PubMed PMID: 18622472. eng.
40. Jimenez W, Claria J, Arroyo V, Rodes J. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 1992 Jan-Feb;7(1):90-7. PubMed PMID: 1543874. eng.

41. Bona S, Filippin LI, Di Naso FC, de David C, Valiatti B, Isoppo Schaun M, et al. Effect of antioxidant treatment on fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *ISRN Gastroenterol.* 2012;2012:762920. PubMed PMID: 22577570. Pubmed Central PMCID: PMC3335177. eng.
42. Amalia PM, Possa MN, Augusto MC, Francisca LS. Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. *Dig Dis Sci.* 2007 Oct;52(10):2616-21. PubMed PMID: 17431769. eng.
43. del Carmen Garciade León M, Montfort I, Tello Montes E, López Vancell R, Olivos García A, González Canto A, et al. Hepatocyte production of modulators of extracellular liver matrix in normal and cirrhotic rat liver. *Experimental and Molecular Pathology.* 2006;80(1):97-108.
44. Goldani HA, Matte US, Ramos AR, Costa TG, Winkelmann LV, Meurer L, et al. The role of food restriction on CCl4-induced cirrhosis model in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2007 Apr;58(5):331-7. PubMed PMID: 17275271. eng.
45. Marumoto Y, Terai S, Urata Y, Matsumoto T, Mizunaga Y, Yamamoto N, et al. Continuous high expression of XBP1 and GRP78 is important for the survival of bone marrow cells in CCl4-treated cirrhotic liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Mar 14;367(3):546-52. PubMed PMID: 18182158. Epub 2008/01/10. eng.
46. Kolberg A, Rosa TG, Puhl MT, Scola G, da Rocha Janner D, Maslinkiewicz A, et al. Low expression of MRP1/GS-X pump ATPase in lymphocytes of Walker 256 tumour-bearing rats is associated with cyclopentenone prostaglandin accumulation and cancer immunodeficiency. *Cell Biochem Funct.* 2006 Jan-Feb;24(1):23-39. PubMed PMID: 16170839. eng.
47. Pavanato A, Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, González-Gallego J, et al. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 2003 Apr;48(4):824-9. PubMed PMID: 12741479. eng.
48. Weiler-Normann C, Herkel J, Lohse AW. Mouse models of liver fibrosis. *Z Gastroenterol.* 2007 Jan;45(1):43-50. PubMed PMID: 17236120. Epub 2007/01/20. eng.
49. Perez Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl4 and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology.* 1983 Jan-Feb;3(1):112-20. PubMed PMID: 6337081. eng.
50. Garcia-Tsao G. Portal hypertension. *Curr Opin Gastroenterol.* 2004 May;20(3):254-63. PubMed PMID: 15703650. eng.
51. Garcia E, AO S. Hipertensão Portopulmonar. *J Bras Pneumol.* 2005 31(2):157-61. PubMed PMID: 18063713. por
52. Andersen BL, Gordon L, Buse MG. Intrapulmonary shunting associated with cirrhosis: incidental diagnosis by perfusion lung scan. *Clin Nucl Med.* 1982 Mar;7(3):108-10. PubMed PMID: 7060305.

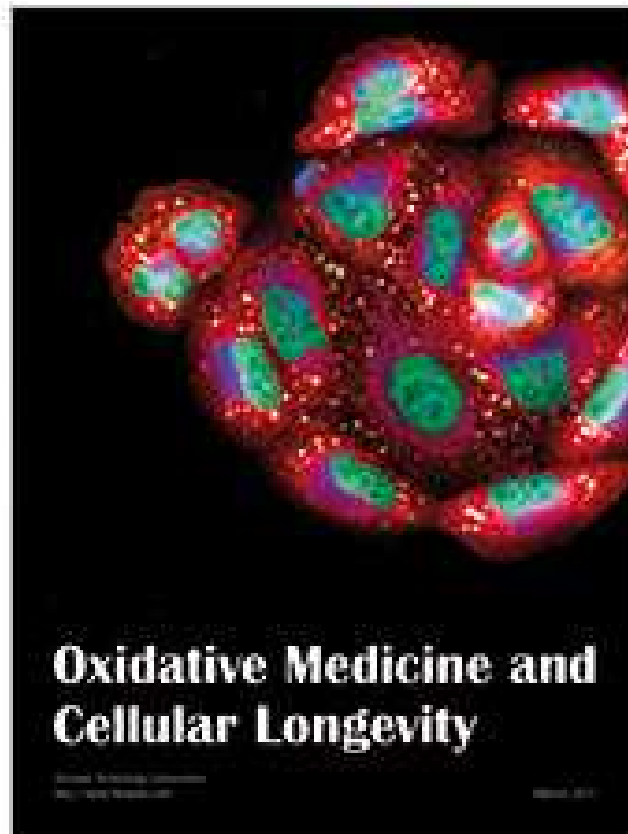
53. Dal palu C, Donaggio G, Dal Zotto I, Pessina AC. Arteriovenous shunts in cirrhotic patients studied with human serum albumin macroaggregates tagged with I-131 (MAA131-I). *Scand J Gastroenterol.* 1968;3(4):425-31. PubMed PMID: 5708114.
54. Falchuk KR, Fiske SC, Haggitt RC, Federman M, Trey C. Pericentral hepatic fibrosis and intracellular hyalin in diabetes mellitus. *Gastroenterology.* 1980 Mar;78(3):535-41. PubMed PMID: 6153166. eng.
55. Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Marroni CA, Marroni N. [Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress]. *Arq Gastroenterol.* 2005 2005 Oct-Dec;42(4):244-8. PubMed PMID: 16444380. por.
56. Nunes H, Lebrec D, Mazmanian M, Capron F, Heller J, Tazi KA, et al. Role of nitric oxide in hepatopulmonary syndrome in cirrhotic rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Sep;164(5):879-85. PubMed PMID: 11549549. eng.
57. Vercelino R, Tieppo J, Dias AS, Marroni CA, Garcia E, Meurer L, et al. N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008 Apr;102(4):370-6. PubMed PMID: 18341514. eng.
58. McDonnell PJ, Toye PA, Hutchins GM. Primary pulmonary hypertension and cirrhosis: are they related? *Am Rev Respir Dis.* 1983 Apr;127(4):437-41. PubMed PMID: 6838050. eng.
59. Lockhart A. Pulmonary arterial hypertension in portal hypertension. *Clin Gastroenterol.* 1985 Jan;14(1):123-38. PubMed PMID: 3987074. eng.
60. Naschitz JE, Slobodin G, Lewis RJ, Zuckerman E, Yeshurun D. Heart diseases affecting the liver and liver diseases affecting the heart. *Am Heart J.* 2000 Jul;140(1):111-20. PubMed PMID: 10874271. eng.
61. Jin YL, Zhang WL, Yao SQ, Fan XY, Xu YJ, Bai YP, et al. [Macrophage apoptosis and the levels of interleukin-1 and interleukin-8 in the rats exposed to silica]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* 2011 Aug;29(8):562-6. PubMed PMID: 22335151. chi.
62. Jiang A, Liu C, Liu F, Song YL, Li QY, Yu L, et al. Liver cold preservation induce lung surfactant changes and acute lung injury in rat liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2012 Jan;18(4):323-30. PubMed PMID: 22294838. Pubmed Central PMCID: PMC3261527. eng.
63. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science.* 1954 May 7;119(3097):623-6. PubMed PMID: 13156638. Epub 1954/05/07. eng.
64. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956 Jul;11(3):298-300. PubMed PMID: 13332224. Epub 1956/07/01. eng.

65. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969 Nov 25;244(22):6049-55. PubMed PMID: 5389100. Epub 1969/11/25. eng.
66. Mittal CK, Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Oct;74(10):4360-4. PubMed PMID: 22077. Pubmed Central PMCID: 431941. Epub 1977/10/01. eng.
67. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84. PubMed PMID: 16978905.
68. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 1973 Jul;134(3):707-16. PubMed PMID: 4749271.
69. Barp J, Araujo AS, Fernandes TR, Rigatto KV, Llesuy S, Bello-Klein A, et al. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Braz J Med Biol Res.* 2002 Sep;35(9):1075-81. PubMed PMID: 12219179.
70. Morgan-Martins MI. A Reposição de Estrogênio Diminui o Dano Oxidativo, Aumenta a Atividade das Enzimas Antioxidantes e melhora a Função Cardíaca em Ratas. Porto Alegre: UFRGS; 2003.
71. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:143-83. PubMed PMID: 17029566. eng.
72. Meneghini, R.A. Toxicidade do Oxigênio, *Ciência Hoje* 1987;(28): 56-62.
73. Halliwell B, Gutteridge J. *Free radicals in biology and medicine.* 3 ed. Oxford; 1999.
74. Maxwell SR. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs.* 1995 Mar;49(3):345-61. PubMed PMID: 7774511. eng.
75. Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med.* 1990;8(1):95-108. PubMed PMID: 2182396. Epub 1990/01/01. eng.
76. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006 Jun;141(2):312-22. PubMed PMID: 16760481.
77. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Aug;1758(8):994-1003. PubMed PMID: 16566894. eng.
78. Urtasun R, Nieto N. [Hepatic stellate cells and oxidative stress]. *Rev Esp Enferm Dig.* 2007 Apr;99(4):223-30. PubMed PMID: 17590105. *Celulas estrelladas hepáticas y estres oxidativo.* spa.

79. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Dec;279(6):L1005-28. PubMed PMID: 11076791. eng.
80. Sies H, Murphy ME. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol B*. 1991 Jan;8(2):211-8. PubMed PMID: 1904922. eng.
81. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004 May;142(2):231-55. PubMed PMID: 15155533. Pubmed Central PMCID: PMC1574951. eng.
82. Hamdy N, El-Demerdash E. New therapeutic aspect for carvedilol: antifibrotic effects of carvedilol in chronic carbon tetrachloride-induced liver damage. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012 Jun;261(3):292-9. PubMed PMID: 22543095. eng.
83. Rajendrasozhan S, Yang SR, Edirisinghe I, Yao H, Adenuga D, Rahman I. Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Apr;10(4):799-811. PubMed PMID: 18220485. Pubmed Central PMCID: PMC2758554. eng.
84. Park HS, Kim SR, Lee YC. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology*. 2009 Jan;14(1):27-38. PubMed PMID: 19144046. eng.
85. Srinivas A, Jaganmohan Rao P, Selvam G, Goparaju A, Balakrishna Murthy P, Neelakanta Reddy P. Oxidative stress and inflammatory responses of rat following acute inhalation exposure to iron oxide nanoparticles. *Hum Exp Toxicol*. 2012 Jun. PubMed PMID: 22699116. ENG.
86. Cavalcante AG, de Bruin PF. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. *J Bras Pneumol*. 2009 Dec;35(12):1227-37. PubMed PMID: 20126926. eng|por.
87. Niki E. Antioxidant defenses in eukariotic cells: an Overview. In: Pole G, Albano E, Dianzani MU, editors. *Free radicals: From science to medicine*1993.
88. Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med*. 1989 Dec;82(12):747-52. PubMed PMID: 2693713. Pubmed Central PMCID: PMC1292422. eng.
89. Sahnoun Z, Jamoussi K, Zeghal KM. [Free radicals and antioxidants: human physiology, pathology and therapeutic aspects]. *Therapie*. 1997 Jul-Aug;52(4):251-70. PubMed PMID: 9437876. fre.
90. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*. 2005 Oct;16(10):577-86. PubMed PMID: 16111877. Epub 2005/08/23. eng.
91. Chance B, Schoener B, Oshino R, Itshak F, Nakase Y. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein

- fluorescence signals. *J Biol Chem.* 1979 Jun;254(11):4764-71. PubMed PMID: 220260. eng.
92. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *Faseb J.* 1992 Jun;6(9):2675-83. PubMed PMID: 1612291.
93. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 1999 Oct;31(4):261-72. PubMed PMID: 10517532. eng.
94. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* 1994 Sep 10;344(8924):721-4. PubMed PMID: 7915779. Epub 1994/09/10. eng.
95. Halliwell B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovasc Res.* 2000 Aug 18;47(3):410-8. PubMed PMID: 10963714. Epub 2000/08/30. eng.
96. Blair IA. Endogenous glutathione adducts. *Curr Drug Metab.* 2006 Dec;7(8):853-72. PubMed PMID: 17168687. eng.
97. Oktyabrsky ON, Smirnova GV. Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry (Mosc).* 2007 Feb;72(2):132-45. PubMed PMID: 17367290. eng.
98. Landvik S. Vitamin E from supplements has good bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004 Sep;80(3):784-5; author reply 5-6. PubMed PMID: 15321826.
99. Krinsky NI. Carotenoids as chemopreventive agents. *Prev Med.* 1989 Sep;18(5):592-602. PubMed PMID: 2694157.
100. Rice-Evans CA, Miller NJ. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans.* 1996 Aug;24(3):790-5. PubMed PMID: 8878849.
101. Huber LS, Rodriguez-Amaya DB. Flavonóis e flavonas: Fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. 2008.
102. Peres W, Tunon MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, Gonzalez-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol.* 2000 Nov;33(5):742-50. PubMed PMID: 11097482.
103. Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zettler C, Marroni C, et al. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol.* 2004 Nov 15;68(10):1939-46. PubMed PMID: 15476665.

ARTIGO PUBLICADO



OXIDATIVE STRESS AND PULMONARY CHANGES IN EXPERIMENTAL LIVER CIRRHOSIS

Renata Salatti Ferrari¹, Darlan Pase da Rosa², Luiz Felipe Forgiarini Junior³,
Norma Possa Marroni⁴

¹Physical Therapist, Master in Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS. Researcher at the Laboratory of Hepatology and Gastroenterology hospital clinics of Porto Alegre - HCPA. Brazil

²Biomedical, Masters and Doctorate in Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS. Researcher at the Laboratory of Hepatology and Gastroenterology hospital clinics of Porto Alegre - HCPA. Brazil

³Biologist, Master in Respiratory Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS. Researcher at the Laboratory of Airway and Lung hospital clinics of Porto Alegre - HCPA. Brazil

⁴Ph.D. in Physiology from the Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Teacher of the Graduate Program (Medical Sciences) and (Physiology) from UFRGS, teacher of PPG- biohealth Lutheran University of Brazil - ULBRA and Laboratory Hepatology and Experimental Gastroenterology hospital clinics of Porto Alegre - HCPA. Brazil

Abstract

The use of carbon tetrachloride (CCl₄) in rats is an experimental model of hepatic tissue damage, which leads to fibrosis, and at the long term, cirrhosis. Cirrhosis is a chronic progressive disease that represents a state of irreversible or slowly reversible hepatic dysfunction, characterized by fibrotic nodules formation. The aim of this study is to evaluate the changes caused by cirrhosis in lung and liver, through the experimental model of intraperitoneal CCl₄ administration. We used 18 male Wistar rats divided into three groups: control (CO) and two groups divided by the time of cirrhosis induction by CCl₄. G1 (11semanas), G2 (16semanas). We found significant increase of transaminase levels and lipid peroxidation (TBARS) in liver and lung tissue. Also, increased antioxidant enzymes SOD and CAT, as well as the expression of TNF- α and IL-1 β in the lung of cirrhotic animals. We observed changes in gas exchange in both cirrhotic groups. We can conclude that our model reproduces a model of liver cirrhosis, that causes alterations in the pulmonary system that leads to changes in gas exchange and size of pulmonary vessels.

Introduction

Cirrhosis is considered to be the most advanced stage of fibrosis and is associated with the appearance of the septa and fibrotic nodules, changes in hepatic blood flow and a risk of liver failure ⁽¹⁾. Cirrhosis occurs as result of the response to liver injury following multiple inflammatory, toxic, metabolic or congestive damages. Although the pathophysiology and histopathology of cirrhosis vary independently on the etiologic agent, the final histological pattern is similar and is characterized by diffuse fibrosis and a distortion of the normal architecture in structural liver nodules. Cirrhosis as a consequence of structural distortion may trigger changes in the function of hepatocytes and portal hypertension. These two changes produce in its evolution, all of the clinical manifestations of cirrhosis, which is expressed not only in the liver but in the whole organism ^(2, 3). Portal hypertension, through hemodynamic alterations, changes in blood volume distribution and the release of vasoactive substances, may cause cardiopulmonary manifestations known as hepatopulmonary syndrome (HPS), portopulmonary hypertension (PPH) and cirrhotic cardiomyopathy.

An association between liver disease and pulmonary disorders is common in patients with chronic liver disease. In the last 15 years, specific pulmonary vascular changes associated with liver disease and / or portal hypertension have been subjected to further investigation ⁽¹⁾.

The respiratory tract is a major target of oxidative damage caused by both endogenous and exogenous processes ^(4, 5). The reactive species produced by phagocytes are the major cause of tissue damage associated with chronic inflammatory lung disease. The involvement of oxidative stress in lung injury leads to increased levels of markers of lung injury and proinflammatory cytokines (i.e., IL-1 β , IL-6 and TNF- α) ⁽⁶⁾. The development of cirrhosis is often associated with oxidative stress ⁽⁷⁾.

Carbon tetrachloride (CCl₄), a potent hepatotoxin, is capable of reproducing hepatic cirrhosis via the generation of free radicals and reactive species from the resulting metabolic changes via the enzymatic complex cytochrome P-450 ⁽⁸⁾. For many years, it has been accepted that free radicals generated from CCl₄, as trichloromethyl (CCl₃) and trichloromethyl peroxy (\bullet OOCCl₃), affect the hepatocyte, causing morphological changes involving the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, plasma membrane and mitochondria of the affected cells ⁽⁸⁾. The objective of this study was to investigate the liver and lung in an experimental model of liver cirrhosis caused by carbon tetrachloride with two different durations of administration.

Materials and Methods

Animal Model

We used 18 male Wistar rats weighing between 200 and 250 grams obtained from FEPPS (State Foundation for Health Research and Production). The animals were randomly divided into three groups: a control (CO) and two experimental groups. The experimental groups were divided according to the time of the administration of CCl₄; in group 1 (G1) the administration of CCl₄ lasted for 11 weeks, whereas in group 2 (G2), the duration was 16 weeks. During the experiment, the animals were kept housed in the Unit of Experimental Animal Research Center of

the Hospital de Clinicas de Porto Alegre using a twelve-hour light / dark cycle (light from 7 to 19 hours) and $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. The access to feed was controlled, and phenobarbital was added to the drinking water of the animals (0.3 g/l) to serve as an enzyme inducer to potentiate the effect of CCl_4 ⁽⁹⁾. The control group (CO) received a 0.5 ml intraperitoneal (ip) injection of mineral oil, whereas the experimental group received (0.5 ml / kg ip) CCl_4 diluted in mineral oil at a ratio of 1:6 ⁽¹⁰⁾.

All procedures of the study were performed according to the parameters established by the Ethics and Research of Hospital de Clinicas de Porto Alegre and the animal care followed the recommendations by of the "Principles of Laboratory Animal Care" guidelines of the National Society for Medical Research as well as the "Guide for the Care and Use of Laboratory animals" published by the National Institutes of Health ⁽¹¹⁾. To induce death, the animals were anesthetized with xylazine (50 mg/kg body weight) and ketamine (100 mg/kg body weight body), both of which were intraperitoneally administered. On the day of death, blood samples for the liver function tests were collected via the retro-orbital plexus ⁽¹²⁾.

After, the abdominal region was shaved, a midline laparotomy was performed to collect blood from the abdominal aorta for arterial blood gas analysis.

Serum biochemical analysis

Blood samples taken from the retro orbital plexus were used to assess the levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (AP) expressed in IU/L. These levels were measured according to routine laboratory techniques used at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA).

Organ weight ratios (organ weight / body weight x 100)

The organs were weighed, and the weight of the liver was used to determine the hepatosomatic ratio. The lung weight was used to determine the pneumosomatic ratio.

Histological analysis

For histological examination, a piece of the liver and lung from all animals were trimmed and fixed by immersion in 10% buffered formalin for 24 hours. The blocks were dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in paraffin wax. Serial 3-mm sections were stained with hematoxylin and eosin. Five sections from each sample were analyzed by two independent pathologists who had no prior knowledge of the animal groups.

Sample preparation and the analysis of oxidative stress

Lung and liver homogenates were prepared by adding 9 ml of phosphate buffer (140 mM KCL, 20 mM phosphate, pH 7.4) per gram of tissue. The tissue homogenate was centrifuged in a refrigerated centrifuge (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) for 10 min at 3000 rpm (1110 xg). The precipitate was discarded, and the supernatant was stored at -80°C for subsequent tests.

Lipoperoxidation

Oxidative stress was determined by measuring the concentration of aldehydic products using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The spectrophotometric absorbance of the supernatant at 535 nm was determined,⁽¹³⁾ and the values were expressed in nmol / mg protein.

Superoxide Dismutase

Cytosolic superoxide dismutase (SOD) (EC 1.5.1.1) was assayed at 30°C according to the method of Misra and Fridovich⁽¹⁴⁾. The auto-oxidation rate of epinephrine, which is progressively inhibited by increasing amounts of SOD in the homogenate, was spectrophotometrically monitored at 560 nm and expressed as U / mg / protein. The amount of enzyme that inhibited 50% of epinephrine auto-oxidation was defined as 1 U of SOD activity.

Catalase

Catalase activity was determined by measuring the decrease in absorption at 240 nm in a reaction medium containing 50 mM phosphate buffer saline (pH 7.2) and 0.3 M hydrogen peroxide ⁽¹⁵⁾. The enzyme activity was spectrophotometrically assayed at 240 nm, and the values were expressed in pmol / mg protein.

Arterial blood gas analysis

We collected blood from the abdominal aorta to measure the gas exchange of the arterial blood (PaO₂ - partial pressure of arterial oxygen, PaCO₂ - partial pressure of arterial carbon dioxide pressure and SaO₂/Hb - oxygen saturation of hemoglobin) , Laboratory tests were performed at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA).

Tumor necrosis factor alpha

The concentration of TNF- α (tumor necrosis factor alpha) in the lung tissue was determined by Western blotting. The electrophoresis protocol was performed according to Laemmli *et al.*, (1970) ⁽¹⁶⁾, and the blotting technique was performed as described by Towbin *et al.*, (1979) ⁽¹⁷⁾. The results were monitored using a constituent protein marker (beta actin - Sigma ®). The results were quantified using the program 1D LabImage (Loccus Biotechnology) and were expressed in arbitrary units.

Interleukin 1 beta

The concentration of IL-1 β (interleukin 1 beta) in the lung tissue was determined by immunohistochemical analysis. The recovery of antigen was performed using citrate buffer at 100 ° C, and endogenous peroxidase activity was blocked by incubation with absolute methanol containing 3% hydrogen peroxide at room temperature. The slices were sequentially pre-incubated with 10% rabbit serum at room temperature to block possible undesired reactions of the secondary antibody. The slides were incubated with polyclonal rabbit IL-1 β (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) overnight at 4 °C followed by incubation with the secondary antibody (biotinylated anti-rabbit IgG, Vector Laboratories, Burlingame, CA) for one hr at room temperature. After sixty minutes at room temperature, the slides were treated

with the reagent EnVision and then washed three times with hydrogen peroxide (PBS). Nuclei were counter stained with hematoxylin. The primary antibody was diluted in PBS containing bovine serum albumin as a negative control. The results were evaluated without prior knowledge of the groups using a microscope equipped with a digital camera to capture images using the Image-Plus software (Media Cybernetics, Bethesda, USA).

Statistical Analysis

The collected data were stored in Excel, and the statistical analyses were performed using the GraphPad InStat program. The results are expressed as the mean \pm SD. Data were compared using an analysis of variance (ANOVA), and when the analysis indicated the presence of a significant difference, the means were compared using the Student Newman Keuls test. A significance level of $p < 0.05$ was used.

Results and Discussion

In our study, we used two different durations of CCl_4 induction. As in other studies by our group, we observed that the CCl_4 -induced animals were cirrhotic from the 10th week of the treatment. Induction with CCl_4 has been used as a model for mimicking liver cirrhosis due to its potent hepatotoxic effect, which causes necrosis and steatosis. Prolonged administration leads to liver fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The CCl_4 acts directly on hepatocytes by means of changes in mitochondrial membrane permeability. This model has been widely used to elucidate the pathogenesis of cirrhosis^(18, 19).

In this study, AST, ALT and ALP were significantly increased in the cirrhotic groups relative to the CO group (Table 1). CCl_4 causes liver damage and increases the serum levels of liver transaminases, which are well-known markers of liver injury. The release of large amounts of liver enzymes in the bloodstream is associated with a loss of integrity with consequent tissue apoptosis and the necrosis of hepatocytes. Thus, enzymes are eventually released into the circulation following cellular damage, therefore resulting in higher enzyme levels⁽¹⁹⁾.

High hepatosomatic and pneumosomatic ratios were observed, and although these changes were not significant, several studies have reported an increase in cirrhotic animals, (Table 1) ⁽²⁰⁻²²⁾.

Table 1 - Enzymes Liver Health and Relationships

	CO	G1	G2
AST (U/L)	102.40±15.04	605.66±220.93*	308.78±65.11*
ALT (U/L)	40.2± 7.98	772.5±271.20*	252.66±35.43*
FA (U/L)	96.4±29.6	124.86±16.87	206.50±44.48*
Rel. Hepatosomatic (%)	3,288±0,490	3,41±0,50	4,81±0,37
Rel. Pneumosomatic (%)	0,354±0,04	0,4±0,03	0,62±0,04

CO: control; G1: 11 weeks group; G2: 16 weeks group. AST: Aspartate aminotransferase, ALT: Alanine aminotransferase; FA: Alkaline Phosphatase; Rel: hepatosomatic ratio (organ weight / body weight x 100) pneumosomatic ratio (organ weight / body weight x 100); The results represent the mean ± SD. * Significant difference between groups CCl₄ and group CO. * p <0,05.

According to assessment of hepatic lipid peroxidation by TBARS, G1 and G2 showed increases of 238% and 262%, respectively, relative to the CO group. In the evaluation (TBARS) of the lung, the G1 group showed an increase of 1423%, and group 2 showed an increase of 6452% with respect to the CO group (Figures 1 and 2).

The increase in lipid peroxidation products evaluated by TBARS, including MDA and other aldehydes, demonstrates a loss of structure and cell membrane integrity. An increase in TBARS contributes to the deterioration of the liver tissue, as shown in other experimental models of liver injury induced by xenobiotics ^(10, 23-25).

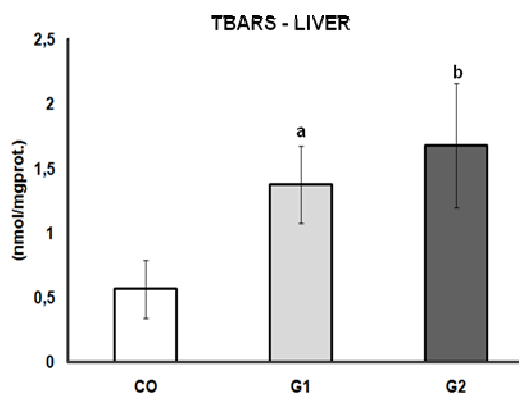


Figure 1: Average TBARS values in the livers of different groups. CO: control; G1: 11 weeks group; G2: 16 weeks group. The results represent the mean \pm SD. a) Significant difference between groups G1 and group CO ($p < 0.01$). b) Significant difference between groups G2 and CO ($p < 0.001$).

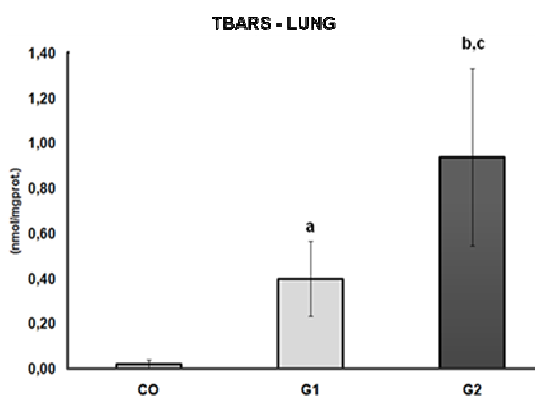


Figure 2: Average TBARS values in the lungs of the different groups. CO: control; G1: 11 weeks group; G2: 16 weeks group. The results represent the mean \pm SD. a) Significant difference between groups G1 and CO ($p < 0.01$). b) Significant difference between groups G2 and G1 ($p < 0.001$). c) Significant difference between groups G2 and CO ($p < 0.001$).

The liver SOD examination showed a significant increase in group G2 of 203% relative to the CO group. A 141% higher SOD level was observed in G2 relative to G1. The evaluation of SOD in the lung showed significant differences, with 138% and 144% higher values in G2 relative to CO and G1, respectively (Figures 3 and 4).

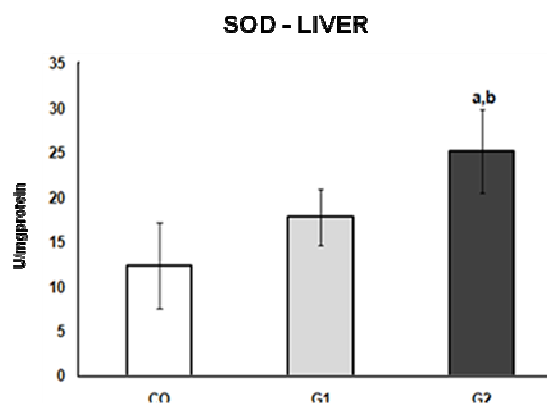


Figure 3: Average SOD values in the livers of the different groups. CO: control; G1: 11 weeks group; G2: 16 weeks group. The results represent the mean \pm SD. a) Significant difference between the CO and G2 groups ($p < 0.001$). b) Significant difference between the G1 and G2 groups ($p < 0.01$).

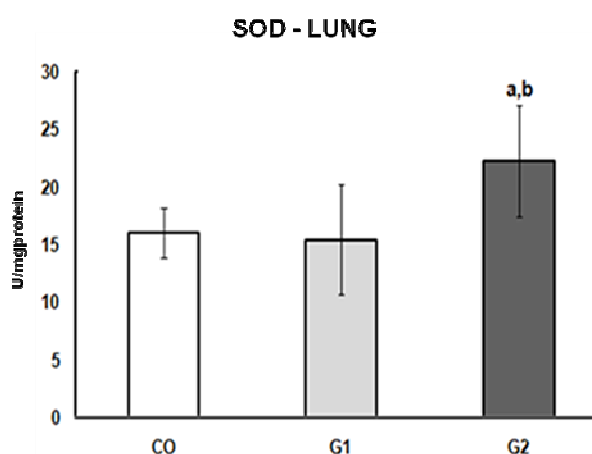


Figure 4: Average values of SOD in the lungs of the different groups. CO: control; G1: 11 weeks group; G2: 16 weeks group. The results represent the mean \pm SD. a) Significant difference between the CO and G2 groups ($p < 0.05$). b) Significant difference between the G1 and G2 groups ($p < 0.05$).

In the evaluation of the CAT enzyme in the liver, we observed 381% and 328% higher values in G2 compared to the CO and G1 groups, respectively. In the lung tissue, the same trend was observed, where G2 were 298% and 386% higher, respectively, compared to CO and G1 groups (Figures 5 and 6).

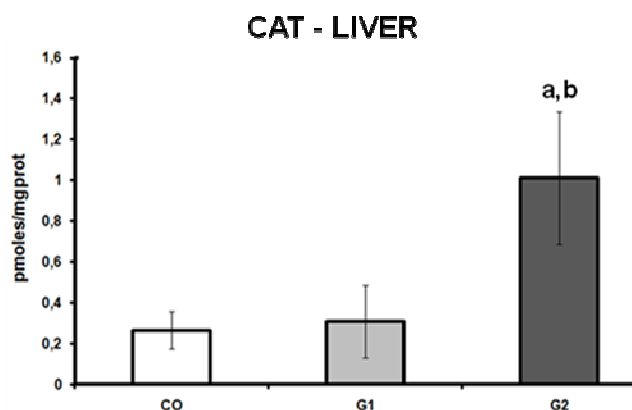


Figure 5: Average CAT enzyme values in the livers of the different groups. CO: control; G1: 11 weeks group; G2: 16 weeks group. The results represent the mean \pm SD. a) significant difference between the G2 and CO groups ($p < 0.001$). b) Significant difference between the G1 and G2 groups ($p < 0.001$).

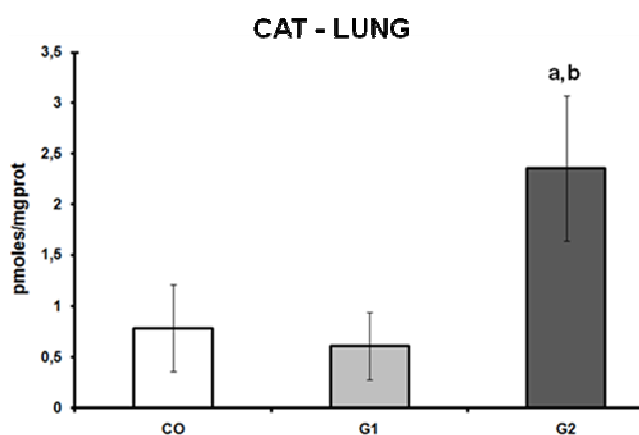


Figure 6: Average CAT enzyme values in the lungs of the different groups. CO: control; G1: 11 weeks group; G2: 16 weeks group. The results represent the mean \pm SD. a) Significant difference between the G2 and CO groups ($p < 0.001$). b) Significant difference between the G1 and G2 groups ($p < 0.001$).

One of the final products of lipid peroxidation is malondialdehyde (MDA), which activates the production of collagen, leading to subsequent fibrosis. In our study, we found an increase in TBARS concomitant with an elevation in free radical scavenger enzymes such as SOD and CAT. This result fact characterizes the

protective role of these enzymes in biological systems for minimizing oxidative stress (10).

As shown in Table 2, the PaO₂ values were significantly reduced in G2 when compared G1 and CO (p <0.05), although the changes in the SpO₂ and PCO₂ values were not significant.

These changes in the arterial blood gas composition suggest that this model alters gas exchange. Previous studies have reported that chronic liver diseases, especially cirrhosis, may be associated with arterial hypoxemia, which includes a combination of changes in the ventilation-perfusion mismatch and intrapulmonary shunts by vascular dilation (25).

It is also known that liver cirrhosis impairs gas exchange and allows the emergence of intrapulmonary shunting, resulting in hypoxemia and the appearance of symptoms such as fatigue and dyspnea (26). In addition, patients who have lower PaO₂ levels have oxidative stress levels, which can be observed in our study.

Table 2 - Values of Arterial Blood Gases Analysis

	CO	G1	G2
PaO₂ (mmHg)	102.42±18.69	103.20±7.38	81.4±8.82*
PCO₂ (mmHg)	48.12±5.66	49.3±10.07	56.8±13.76
SatO₂ (%)	96.68±2.01	95.9±0.03	90.2±13.40

CO: control; G1: 11 weeks group; G2: 16 weeks group. Arterial oxygen pressure (PaO₂) Partial Pressure of Carbon Dioxide (PCO₂), oxygen saturation (SpO₂). The results represent the mean ± SD. * Significant difference between groups CCl₄ and CO. * p <0,05

Some of the pathophysiological mechanisms that may explain the observed inefficient pulmonary gas exchange in patients with cirrhosis may occur because patients with cirrhosis have low pulmonary vascular tone characterized by a poor or absent hypoxic response, which results in a marked dilation of the pulmonary vasculature. Thus, this abnormal pulmonary vascular tone independent of airway

disease causes changes in the ventilation / perfusion (V / Q), leading to mild to moderate hypoxemia ⁽²⁷⁾.

The histology of the liver cirrhotic animals showed steatosis, ballooning degeneration, fibrosis and necrosis; similar characteristics were not observed in animals of group CO (Figure 7), thereby confirming the liver transaminases results, which were found to be elevated in our model.

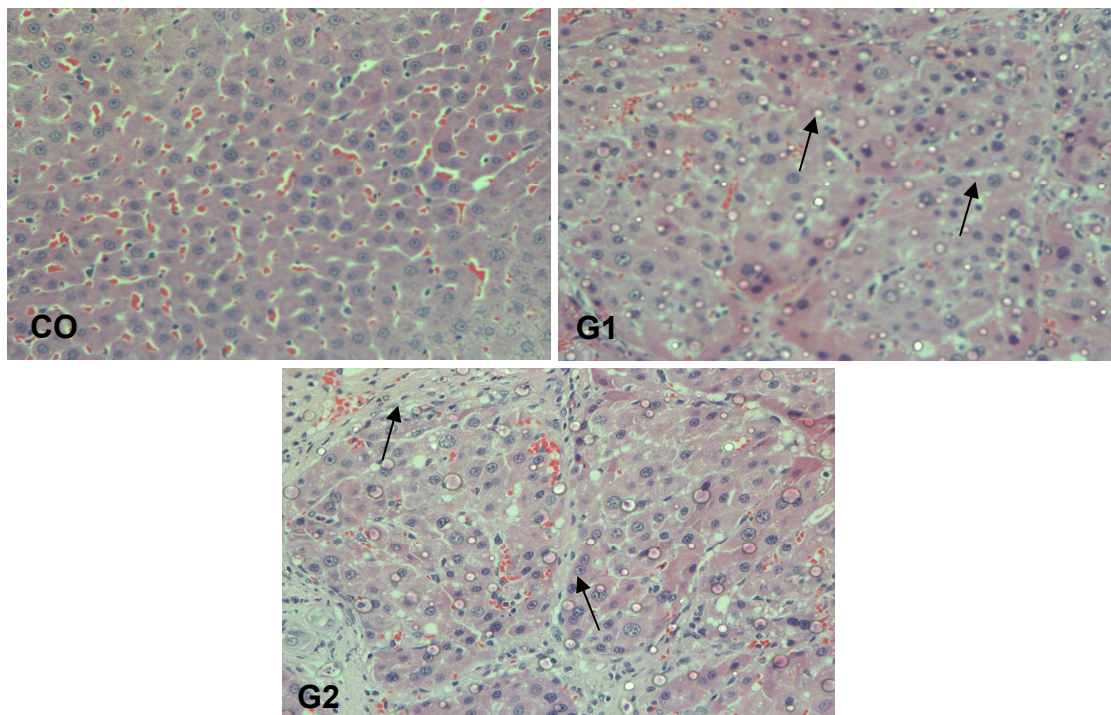


Figure 7: Photomicrograph of liver tissue (20x). CO: control; G1: 11 weeks group; G2: 16 weeks group. Hematoxylin and eosin (HE).

The histological examination of the lung tissue (Figure 8) showed a decrease in the lumen of the pulmonary vessels, which suggests that the thickness of the vessel wall became thicker by increasing the intrapulmonary pressure in the vessels.

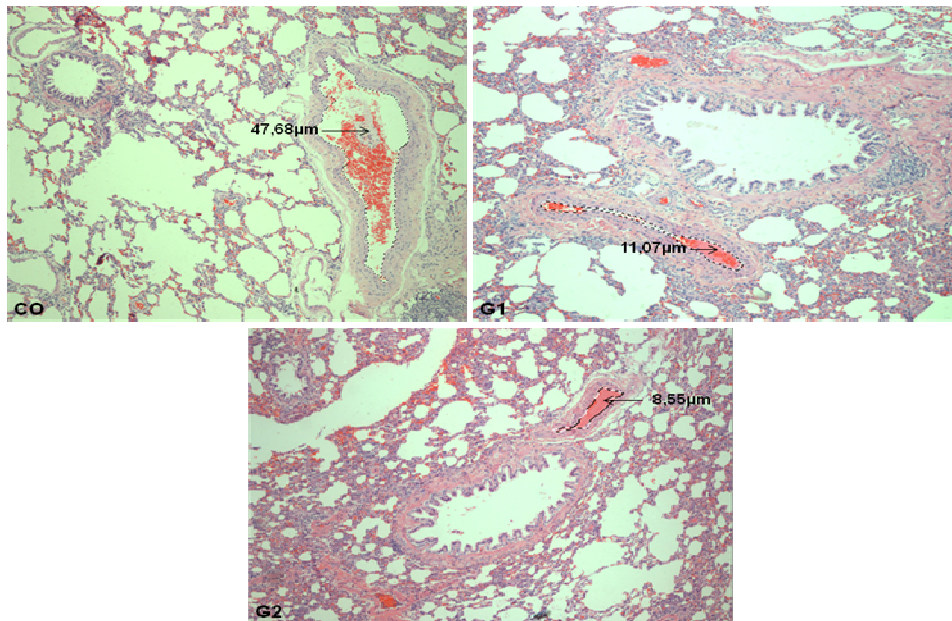


Figure 8: Photomicrograph of lung tissue (100x). CO: control; G1: 11 weeks group; G2: 16 weeks group. μm : microns. Hematoxylin and eosin (HE).

Previous studies have presented the hypothesis that humoral factors derived from the splanchnic circulation, which would normally be metabolized in the liver, reaches the pulmonary circulation due to portosystemic shunts and liver failure. These substances modify the endothelial cell function and promote vasoconstriction, thrombosis, and mitogenic activity in the pulmonary circulation ^(28, 29).

The inflammatory process can also be triggered by MDAs that active cytokines such as TNF- α , interleukin-8, and interleukin-6 ⁽³⁰⁾. The analysis of TNF- α in the lung tissue showed an increased expression in G2 compared to CO, as shown in Figure 9.

Several authors have shown that stellate cells are related to hepatic fibrosis and act on the fibrogenic cytokine by transforming growth factor beta (TGF- β), TNF- α , the platelet-derived growth factor (PDGF) and other factors. These cells differentiate into myofibroblasts and fibroblasts, activating the synthesis of the elements of the matrix (e.g., collagen, elastin, proteoglycans and proteins of incorporation) ⁽³¹⁾. TNF- α is a proinflammatory cytokine that participates in the immune response and mechanisms of tumors. TNF- α is involved in all stages of liver damage and also directly induces the apoptosis of hepatocytes and participates in

the activation of stellate cells, contributing to the development of hepatic fibrosis (32, 33).

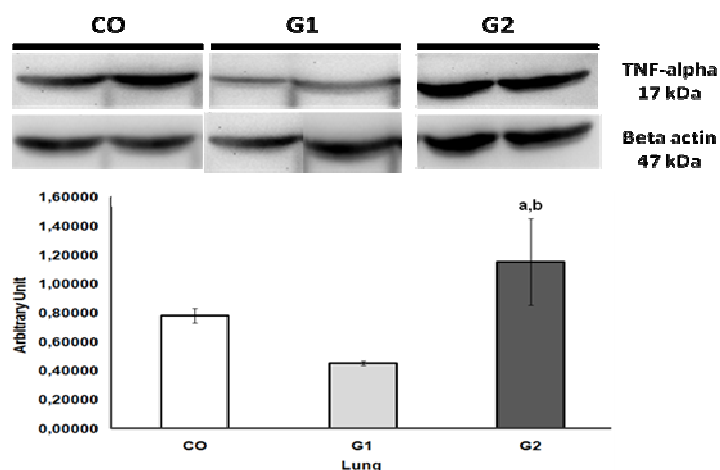


Figure 9: The expression of tumor necrosis factor (TNF- α) in the lungs of the different groups. CO: control; G1: 11 weeks group; G2: 16 weeks group. The results represent the mean \pm SD. a) A significant difference between groups G2 and CO ($p < 0.001$). b) Significant difference between groups G1 and G2 ($p < 0.001$).

In addition to the contribution of TNF- α in liver fibrosis, experimental and clinical studies have reported that changes in IL-1, IL-8 and TNF- α levels due to lung injury and apoptosis by macrophages play an important role in the development of lung fibrosis (34, 35). We also found increased expression of IL-1 β in our cirrhotic groups, as shown in Figure 10.

It is known that IL-1 β plays a role in pulmonary fibrosis. The mechanism of IL-1 β binding to fibrosis in certain diseases is uncertain but involves TGF- β /smad3-dependent stimulation. In our study group, G2 differed from the other group, suggesting that one of the factors responsible for fibrosis was presented in this group (36).

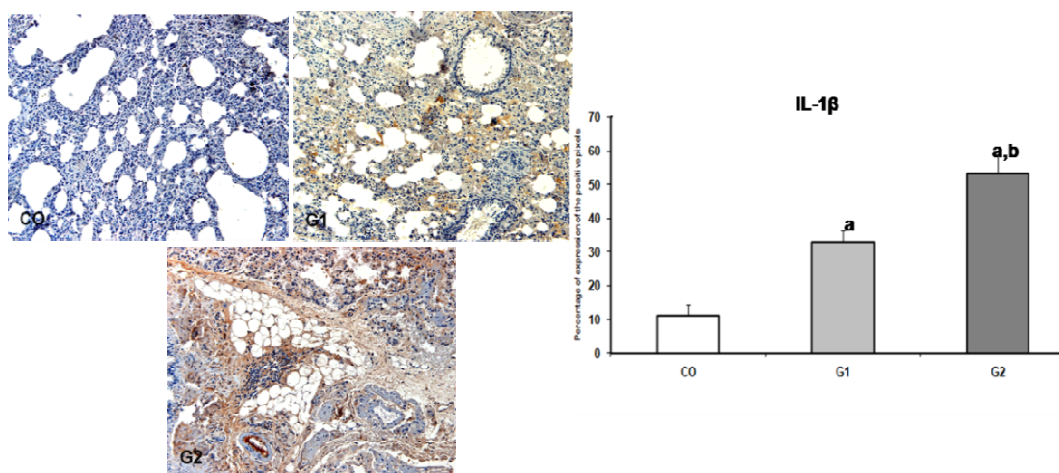


Figure 10: The expression of Interleukin-1 β in the lungs of the different groups. CO: control; G1: 11 weeks group; G2: 16 weeks group. The results represent the mean \pm SD. a) Significant difference between G2 and CO ($p < 0.001$). b) Significant difference between groups G1 and G2 ($p < 0.001$).

The involvement of free radicals and the action of inflammatory cytokines was involved in the response of the etiologic factor that triggered the changes produced in the model of cirrhosis.

Conclusions

Our two times of CCl₄ administration in our study (G1 and G2) reproduced the liver cirrhosis, although G2 showed the greatest changes in both the liver and lung, i.e., alterations in gas exchange, a further reduction in the lumen of the pulmonary vessels, and higher levels of cytokine expression. Future studies should attempt to elucidate the mechanisms involved in the CCl₄ model to study the pulmonary complications resulting from liver cirrhosis, including portopulmonary hypertension.

References

1. Fallon MB. Mechanisms of pulmonary vascular complications of liver disease: hepatopulmonary syndrome. *J Clin Gastroenterol.* 2005 Apr;39(4 Suppl 2):S138-42. PubMed PMID: 15758649. eng.
2. Sherlock S, Dooley J. Doenças do fígado e do sistema biliar. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
3. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet.* 2008 Mar;371(9615):838-51. PubMed PMID: 18328931. Pubmed Central PMCID: PMC2271178. eng.

4. Rajendrasozhan S, Yang SR, Edirisinghe I, Yao H, Adenuga D, Rahman I. Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Apr;10(4):799-811. PubMed PMID: 18220485. Pubmed Central PMCID: PMC2758554. eng.
5. Park TJ, Kim JY, Oh SP, Kang SY, Kim BW, Wang HJ, et al. TIS21 negatively regulates hepatocarcinogenesis by disruption of cyclin B1-Forkhead box M1 regulation loop. *Hepatology*. 2008 May;47(5):1533-43. PubMed PMID: 18393292. eng.
6. Srinivas A, Jaganmohan Rao P, Selvam G, Goparaju A, Balakrishna Murthy P, Neelakanta Reddy P. Oxidative stress and inflammatory responses of rat following acute inhalation exposure to iron oxide nanoparticles. *Hum Exp Toxicol*. 2012 Jun. PubMed PMID: 22699116. ENG.
7. Fang HL, Lin WC. Lipid peroxidation products do not activate hepatic stellate cells. *Toxicology*. 2008 Nov;253(1-3):36-45. PubMed PMID: 18789371. eng.
8. Boveris A, Koch OR, Stoppani AO. [Decrease in mitochondrial hydrogen peroxide production in the liver of rats chronically treated with alcohol]. *Medicina (B Aires)*. 1978 Nov-Dec;38(6 Pt 1):647-51. PubMed PMID: 750856. spa.
9. Bona S, Filippin LI, Di Naso FC, de David C, Valiatti B, Isoppo Schaun M, et al. Effect of antioxidant treatment on fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *ISRN Gastroenterol*. 2012;2012:762920. PubMed PMID: 22577570. Pubmed Central PMCID: PMC3335177. eng.
10. Pavanato A, Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, González-Gallego J, et al. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci*. 2003 Apr;48(4):824-9. PubMed PMID: 12741479. eng.
11. Rozmiarek H. Current and future policies regarding laboratory animal welfare. *Invest Radiol*. 1987 Feb;22(2):175-9. PubMed PMID: 3557891. eng.
12. Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med*. 1991;10(2):93-100. PubMed PMID: 1849867. eng.
13. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-10. PubMed PMID: 672633. eng.
14. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972 May 25;247(10):3170-5. PubMed PMID: 4623845. eng.
15. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 1973 Jul;134(3):707-16. PubMed PMID: 4749271. eng.
16. Laemmli UK, Molbert E, Showe M, Kellenberger E. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Mol Biol*. 1970 Apr 14;49(1):99-113. PubMed PMID: 5450520.
17. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep;76(9):4350-4. PubMed PMID: 388439.
18. Fujii T, Fuchs BC, Yamada S, Lauwers GY, Kulu Y, Goodwin JM, et al. Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and

expression of CD133 and epidermal growth factor. *BMC Gastroenterol.* 2010;10:79. PubMed PMID: 20618941. Pubmed Central PMCID: PMC2912240. eng.

19. Amália PM, Possa MN, Augusto MC, Francisca LS. Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. *Dig Dis Sci.* 2007 Oct;52(10):2616-21. PubMed PMID: 17431769. eng.

20. Chang SW, Ohara N. Increased pulmonary vascular permeability in rats with biliary cirrhosis: role of thromboxane A2. *Am J Physiol.* 1993 Mar;264(3 Pt 1):L245-52. PubMed PMID: 8460713. eng.

21. Pastor A, Collado PS, Almar M, González-Gallego J. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *J Hepatol.* 1997 Aug;27(2):363-70. PubMed PMID: 9288612. eng.

22. Peres W, Tuñón MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, González-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol.* 2000 Nov;33(5):742-50. PubMed PMID: 11097482. eng.

23. Cremonese RV, Pereira-Filho AA, Magalhães R, de Mattos AA, Marroni CA, Zettler CG, et al. [Experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride inhalation: adaptation of the technique and evaluation of lipid peroxidation]. *Arq Gastroenterol.* 2001 2001 Jan-Mar;38(1):40-7. PubMed PMID: 11586997. por.

24. Pereira-Filho G, Ferreira C, Schwengber A, Marroni C, Zettler C, Marroni N. Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats. *Arq Gastroenterol.* 2008 2008 Apr-Jun;45(2):156-62. PubMed PMID: 18622472. eng.

25. Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Silva Vaz MF, Silveira TR, Marroni CA, et al. Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food Chem Toxicol.* 2007 Jul;45(7):1140-6. PubMed PMID: 17306429. eng.

26. Vercelino R, Tieppo J, Forgiarini Junior LA, Dias AS, Marroni CA, Marroni NP. [Experimental models for assessment of pulmonary alterations in hepatopulmonary syndrome]. *J Bras Pneumol.* 2008 Jul;34(7):453-60. PubMed PMID: 18695789. por.

27. Agusti AG, Roca J, Rodriguez-Roisin R. Mechanisms of gas exchange impairment in patients with liver cirrhosis. *Clin Chest Med.* 1996 Mar;17(1):49-66. PubMed PMID: 8665790. eng.

28. Naschitz JE, Slobodin G, Lewis RJ, Zuckerman E, Yeshurun D. Heart diseases affecting the liver and liver diseases affecting the heart. *Am Heart J.* 2000 Jul;140(1):111-20. PubMed PMID: 10874271. eng.

29. Lockhart A. Pulmonary arterial hypertension in portal hypertension. *Clin Gastroenterol.* 1985 Jan;14(1):123-38. PubMed PMID: 3987074. eng.

30. Lee KS, Buck M, Houglum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest.* 1995 Nov;96(5):2461-8. PubMed PMID: 7593635. Pubmed Central PMCID: PMC185899. eng.

31. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008 May;134(6):1655-69. PubMed PMID: 18471545. eng.

32. Diehl AM, Li ZP, Lin HZ, Yang SQ. Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut.* 2005 Feb;54(2):303-6. PubMed PMID: 15647199. Pubmed Central PMCID: PMC1774847. eng.

33. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology.* 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S99-S112. PubMed PMID: 16447287. eng.

34. Jin YL, Zhang WL, Yao SQ, Fan XY, Xu YJ, Bai YP, et al. [Macrophage apoptosis and the levels of interleukin-1 and interleukin-8 in the rats exposed to silica]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*. 2011 Aug;29(8):562-6. PubMed PMID: 22335151. chi.
35. Jiang A, Liu C, Liu F, Song YL, Li QY, Yu L, et al. Liver cold preservation induce lung surfactant changes and acute lung injury in rat liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2012 Jan;18(4):323-30. PubMed PMID: 22294838. Pubmed Central PMCID: PMC3261527. eng.
36. Lafyatis R, Farina A. New Insights into the Mechanisms of Innate Immune Receptor Signalling in Fibrosis. *Open Rheumatol J*. 2012;6:72-9. PubMed PMID: 22802904. Pubmed Central PMCID: PMC3396286. ENG.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo experimental de cirrose hepática, pela utilização de tetracloreto de carbono intraperitonealmente, é reconhecido como modelo experimental capaz de reproduzir as alterações clínicas observadas na cirrose hepática em humanos. A disponibilidade de um modelo animal para estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da cirrose é de suma importância para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da doença. Além do que, atualmente, não existem terapias eficazes para o tratamento da cirrose hepática, sendo o único tratamento de sucesso o transplante de fígado.

Pelos dados obtidos em nosso estudo, concluiu-se que a administração de CCl_4 intraperitonealmente:

- Aumentou os níveis das enzimas séricas hepáticas (AST, ALT e FA) nos grupos cirróticos, demonstrando dano hepático.
- Aumentou a lipoperoxidação no tecido hepático e pulmonar (TBARS), demonstrando que os animais cirróticos encontram-se em processo de dano oxidativo.
- Aumentou a atividade das enzimas antioxidantes hepáticas e pulmonares (SOD e CAT), o que demonstra uma tentativa do sistema antioxidante de minimizar o dano oxidativo ocasionado pelo modelo.
- Reduziu os valores de PaO_2 e, embora não significativamente, aumentou os valores de PCO_2 e reduziu a SatO_2 , o que demonstra haver alteração nas trocas gasosas nos animais cirróticos.
- A histologia hepática demonstrou a presença de: esteatose, balonização, fibrose e necrose, confirmando os danos sugeridos pelas análises das enzimas séricas hepáticas.
- A histologia do tecido pulmonar demonstrou a presença de: redução no lúmen dos vasos pulmonares nos animais cirróticos, confirmando os danos sugeridos pela gasometria arterial.

- Aumentou a expressão do TNF- α no tecido pulmonar do grupo G2.
- Aumentou a expressão de IL-1 β no tecido pulmonar dos animais cirróticos.

Nossos dois tempos de estudo (G1 e G2) reproduziram a cirrose hepática, porém o grupo G2 foi o que provocou as maiores alterações tanto a nível hepático quanto pulmonar, provocando alteração nas trocas gasosas, maior redução no lúmen dos vasos pulmonares, além de apresentar valores de expressão de citocinas mais elevados, assim as alterações apresentadas pelo modelo merecem maiores investigações, devido ao fato de que estas características podem estar presentes na Hipertensão Portopulmonar.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir das evidências apresentadas, o fato nos estimula a maiores investigações, havendo a necessidade do seguimento de estudos mais avançados sobre as complicações da cirrose hepática experimental (principalmente a hipertensão portopulmonar), tanto a nível pulmonar a fim de aproximar cada vez mais nossos estudos à realidade clínica.

Do mesmo modo, poderíamos investigar também o envolvimento de fatores de transcrição, bem como de outras citocinas envolvidas no processo de desenvolvimento e complicações pulmonares da cirrose.

Objetivamos prosseguir com investigações sobre as complicações da cirrose, focando o sistema pulmonar, além de outros sistemas como o muscular e o cardíaco.

ANEXOS

ANEXO A - Produção científica durante a vigência do mestrado

PARTICIPAÇÃO EM PROJETOS DE PESQUISA:

2011-2012: O efeito da administração de sildenafil em modelo de cirrose induzida por tetracloreto de carbono.

Descrição: Desenvolver um modelo de cirrose hepática induzida por CCl₄ em ratos e analisar o efeito do Sildenafil sobre o sistema hepático e pulmonar dos ratos controles comparados com os tratados com o respectivo fármaco. Situação: Em andamento.

2011-2012: Alterações Respiratórias e Musculares na doença hepática: um estudo experimental.

Descrição: Desenvolver um modelo de cirrose hepática induzida por CCl₄ em ratos e analisar as alterações hepáticas, musculares e pulmonares decorrentes do modelo e verificar o efeito do exercício crônico sobre estes sistemas. Situação: Em andamento.

2009 – 2011: Hipertensão Portopulmonar uma complicação da cirrose: um estudo experimental. Situação: Em andamento.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM CONGRESSOS:

- 1) FERRARI, R. S., da Rosa, D. P., Dias, Alexandre S., MARRONI, N.P. Alterações Hepáticas, Pulmonares e Estresse Oxidativo Decorrentes da Indução da Cirrose em Modelos Experimentais, 2012. Local: Rio de Janeiro; Evento: XVI Simpósio Internacional de Fisioterapia e Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva.
- 2) FERRARI, R. S., da Rosa, D. P., DIAS, A. S., MARRONI, N.P. Avaliação Gasométrica, Ecocardiográfica e Estresse Oxidativo em Modelo Experimental de Cirrose, 2012. Local: Rio de Janeiro; Evento: XVI Simpósio Internacional de Fisioterapia e Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva.
FERRARI, R. S., da Rosa, D. P., Dias, Alexandre S., MARRONI, N.P. Gasometric, Ecocardiographic and lipoperoxidation evaluation in experimental model of cirrhosis in rat, 2012. Local: Porto Alegre; Evento: WORKSHOP CELL STRESS; Inst.promotora/financiadora: Cell Stress Society International.
- 3) Ferrari, RS; da Rosa, DP; Forgiarini, LF; Dias, AS; Marroni, NP. Alterações Características da Hipertensão Portopulmonar (HPP): Avaliação em um modelo experimental. Dados preliminares 2011. Local: HCPA; Cidade: Porto

- Alegre; Evento: 31ª Semana Científica do HCPA; Inst.promotora/financiadora: Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- 4) Ferrari, RS; da Rosa, DP; Dias, AS; Silveira, TR; Marroni, NP. Alterações Características da Hipertensão Portopulmonar (HPP): Avaliação em um modelo experimental. Dados preliminares. 2011. . Local: Pestana Bahia Hotel; Cidade: Salvador /BA; Evento: XXI Congresso Brasileiro de Hepatologia 2011; Inst.promotora/financiadora: SBH Sociedade Brasileira de Hepatologia.
 - 5) Ferrari, RS; da Rosa, DP; Dias, AS; Marroni NP. Alterações Hepáticas e Estresse Oxidativo em Modelo Experimental de Cirrose Hepática induzida por Tetracloreto de Carbono. 2011. Cidade: SANTA MARIA/RS; Evento: VIII Jornada Gaúcha de Fisioterapia Cardiorrespiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva da ASSOBRAFIR.
 - 6) Chaves, RFL; Ferrari, R. S; da Rosa, DP; Marroni, NP; Dias, AS. Alterações ecocardiográficas e gasométricas em um modelo experimental de cirrose hepática através da utilização de tetracloreto de carbono. 2011. Cidade: SANTA MARIA/RS; Evento: VIII Jornada Gaúcha de Fisioterapia Cardiorrespiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva da ASSOBRAFIR.
 - 7) Silvia Bona, Di Naso F. C., FILIPPIN, L., FERRARI, R. S., FILLMANN, H., MARRONI, N.P. A quercetina reduz a fibrose e restabelece o estado redox em fígados de ratos cirróticos, 2010. Cidade: Porto Alegre; Evento: XXI Congresso da Associação Latino Americana para o Estudo do Fígado; Inst.promotora/financiadora: Associação Latino-Americana para o Estudo do Fígado (ALEH).
 - 8) Silva MBE; Ferrari RS; da Rosa, DP; Dias, AS; Alba, RD; Marroni, CA; Marroni, NP. Alterações Características da Hipertensão Portopulmonar (HPP): Avaliação em um modelo experimental. Dados preliminares. 2010. Local: ULBRA- CANOAS; Cidade: CANOAS; Evento: X Fórum de Pesquisa, XVI Salão de Iniciação Científica.
Ferrari RS; da Rosa, DP; Forgiarini, LF; Dias, AS; Marroni, NP. Alterações Características da Hipertensão Portopulmonar (HPP): Avaliação em um modelo experimental. Dados preliminares. 2010. Cidade: PORTO ALEGRE; Evento: I Salão de Pesquisa em Pós Graduação da UFRGS.

PRÊMIOS:

3º Lugar como tema livre na VI Jornada Gaúcha de Fisioterapia Cardiorrespiratória pela ASSOBRAFIR, 2011. (Santa Maria)

2º Lugar como tema livre em Pôster no Congresso Carioca de Fisioterapia. 2010. (Rio de Janeiro)

PARTICIPAÇÃO EM CURSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA:

FERRARI, R. S. Curso de Iniciação Científica (ULBRA). 2011.

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS:

1. XVI Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva. 2012. (Congresso realizado RJ).
2. Curso de Iniciação Científica. 2011.
3. XV Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva. 2010. (Congresso realizado no RS).

ANEXO A.1 - Artigo enviado à publicação



LUNG AND LIVER CHANGES DUE TO THE INDUCTION OF CIRRHOSIS IN TWO EXPERIMENTAL MODELS

R. Salatti Ferrari^I, M. Tieppo^{II}, D. Pase da Rosa^{III}, LA. Forgiarini Junior^{IV}, A. Simões Dias^V, N. Anair Possa Marroni^{VI}

^I Physical Therapist, Master in Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS. Brazil

^{II} Master of Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS. Brazil

^{III} Masters and Doctorate in Medical Sciences from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. Brazil

^{IV} Doctor of Respiratory Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS. Brazil

^V Ph.D. in Physiology from the Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Brazil, Professor of Physiotherapy course at UFRGS and faculty of the Graduate Program in Human Movement Sciences and Respiratory Sciences at UFRGS

^{VI} Ph.D. in Physiology from the Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Professor of Genetic Toxicology and applied the Lutheran University of Brazil - ULBRA. Brazil

¹ Research performed at the Laboratory of Hepatology and Gastroenterology, Hospital de Clinicas de Porto Alegre – HCPA; Lutheran University of Brazil – ULBRA; Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Brazil. Financial Support: FIPE / HCPA

Corresponding author's name: Renata Salatti Ferrari

Adress: Street Evaristo da Veiga, 196/04

City: Porto Alegre, RS, Brasil

Telephone: 55-5196366999

E-mail: renatasalattiferrari@gmail.com

ABSTRACT

Purpose: To evaluate lung and liver changes in two experimental models using intraperitoneal carbon tetrachloride (CCl₄) and bile duct ligation (BDL). **Methods:** Twenty-four male Wistar rats were divided into a control (CO) and an experimental (EX) group. We evaluated liver transaminases (AST, ALT, AP), arterial blood gases (PaO₂, PCO₂ and SpO₂) and lipid peroxidation by TBARS (substances that react to thiobarbituric acid) and chemiluminescence (CL). We also evaluated the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) and histology of lung tissue and liver. **Results:** There were no significant differences in AST, ALT, ALP and PaO₂ between CO and EX groups ($p < 0.05$). The levels of TBARS, QL and activity of SOD were increased to different degrees in the CO CCl₄ groups and in the EX BDL ($p < 0.05$, respectively). On lung histology, an increase in the wall thickness of the pulmonary artery and a diameter reduction in the CCl₄ animal model were observed: comparing CO with EX, we observed a reduction in thickness and an increase in the diameter of the artery wall lung. **Conclusion:** Both experimental models have caused liver damage and alterations in the artery wall that are associated with major changes in pulmonary gas exchange.

Key words: Liver, Rats, Animal Models of Diseases

INTRODUCTION

Fibrosis is an important process that results from hepatic injury and chronic disease process. Both of these causes can have common etiologies that can contribute to the onset of cirrhosis.¹

Cirrhosis is considered to be the most advanced stage of tissue fibrosis and is characterized by the disruption of hepatic parenchyma, the appearance of the septa and fibrotic nodules, changes in hepatic blood flow and a risk of liver failure.²

Cirrhosis can be caused by altered vascular tissue, which causes a shift in the supply of blood and portal blood flow directly to the liver (central vein). The altered vascular tissue compromises the hepatic sinusoids and hepatocytes. Some of the circulatory changes found in cirrhosis are splanchnic vasodilatation, vasoconstriction and renal hypoperfusion, salt and water retention and increased cardiac output, which are all closely linked to vascular disease of the liver that may cause portal hypertension.^{3,4}

Portopulmonary hypertension (PPH) is a relatively rare complication occurring in cirrhosis, and its prevalence is high in patients with refractory ascites. PPH is mostly likely caused by excessive pulmonary vasoconstriction and factors such as transforming growth factor beta1 (TGF- β 1).⁵ However, we do not have a perfect experimental model for the study of PPH, making the discovery of effective substances that can reduce and even prevent the progression of the disease impossible. Developing an experimental model is be very useful, as such a model could lead to substantial cost savings in treatment.

Carbon tetrachloride (CCl₄) can be applied both intraperitoneally and by inhalation. CCl₄ induces fibrosis liver cirrhosis and may be used for the study of PPH. The signals observed in the CCl₄ liver injury model are similar to those found in cirrotic patients.⁶ The CCl₄ trichloromethyl radical is converted to (•CCL₃) and trichloromethyl peroxide (°OOCCl₃). The CCl₄ trichloromethyl radical has been described as causing hepatotoxic effects such as fibrosis, steatosis, necrosis and hepatocellular carcinoma^{7,8}

Bile duct ligation is another experimental model related to secondary biliary cirrhosis because it causes cell proliferation, hepatocellular necrosis, apoptosis, activation of stellate cells, and finally the formation of liver fibrosis and cirrhosis. This model has been described by our group as causing Experimental Hepatopulmonary Syndrome.^{9,10}

Given the complications of cirrhosis, the aim of this study was to evaluate two types of pulmonary and hepatic injury that cause liver cirrhosis, a CCl₄ model and a BDL model, to evaluate which model can best reproduce characteristics found in PPH.

METHODS:

Animals and experimental groups

We used 24 male Wistar rats (average weight 250 g), purchased from the Center for Reproduction and Laboratory Animal Experimentation (CREAL), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). The animals were housed in plastic cages (47×34×18 cm) and maintained in light/dark cycles of 12/12 hs with a controlled temperature (20-25 °C) and *ad libitum* access to food and water. All of the procedures followed the parameters established by the Ethics and Research of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and all of the animals received care according to the "Principles of Laboratory Animal Care" formulated by the National Society for Medical Research and the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" published by the National Institutes of Health (NIH publication 86-23, revised 1985).

The animals were randomly divided into 4 groups, an experimental and a control group (CO), for each of the two models used in the study, intraperitoneal Carbon tetrachloride (CCl₄) and bile duct ligation (BDL):

- CCl₄-CO (animals that received only phenobarbital in drinking water);
- CCl₄-EX (animals that received phenobarbital in drinking water one week before starting the injections of CCl₄ inductions + ip);
- BDL-CO (animals that underwent laparotomy and only manipulation of the duct biliar).
- BDL-EX (animals subjected to BDL).

Experimental Procedures:

To develop the CCl₄ model, we used the standard recommended by Pavanato et al.¹¹ Phenobarbital was added to the drinking water of animals (0.3 ml/dl), serving as an enzyme inducer to potentiate the effect of CCl₄.¹²

To develop the BDL model, we followed the standard described by Kontouras et al.¹³ where, after the experimental procedures, the animals were caged individually for a period of 28 days.

When sacrificing animals from either group, the animals were anesthetized with xylazine (50 mg/kg body weight) and ketamine (100 mg/kg body weight), both administered intraperitoneally. Post mortem, blood samples were collected via retro-orbital plexus for liver function analysis.¹⁴

After the abdominal region was shaved, a laparotomy was performed to collect blood from the abdominal aorta for arterial blood gas analysis. After collection of blood samples, the animals were sacrificed with an "overdose" of anesthetics.

Histology: For histological analysis of the lung, a fragment of the right lower lobe was collected for histological analysis, and a fragment of the liver was removed from the right hepatic lobe. The tissues were cut and fixed by immersion in 10% buffered formalin for 24 hours. The remainders of lung and liver were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 ° C for later analysis.

Integrity Liver Enzymes: Blood samples taken from the retro-orbital plexus were used to assess the levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and alkaline phosphatase (AP) and were expressed in IU/L and measured with routine laboratory methods in the Hospital de Clinicas de Porto Alegre.

Determination of oxidative stress: The liver tissue and lung of each animal were homogenized in phosphate buffer solution (140 mM KCl, 20 mM phosphate, pH 7.4) and centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes. Lipid peroxidation was determined by levels of thiobarbituric acid reactive substances (thiobarbituric acid reactive substances - TBARS) mg/prot. read at 535 nm. For the determination of chemiluminescence (CL), 0.5 ml of homogenate was added to 120 mM KCl, 30 mM phosphate buffer, pH 7.4, and 3 mM tert-butyl hydroperoxide at 30 ° C and analyzed for chemiluminescence in a counter liquid scintillation expressed as cps/mg/prot.^{14,15}

Superoxide Dismutase Enzyme Activity: The activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) was determined by quantifying the oxidation of adrenaline to adrenochrome according to Misra and Fridovich and was expressed in U/mg/prot.¹⁶

Statistical analysis: The results were expressed as mean \pm standard error. Data were compared by analysis of variance (ANOVA), and if the analysis indicated a statistically significant difference, we used a post hoc Student Newman-Keuls test. The statistical significance level was set at $p < 0.05$. The Statistical Package for Social Sciences, version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), was used.

RESULTS

Activity of transaminases. Table 1 indicates a significant difference between the CCl₄ and CCl₄-CO-EX groups and between BDL and BDL-CO-EX in serum AST, ALT and AP, which were higher in the experimental groups compared to the controls ($p < 0.05$). **Arterial blood gas analysis.** To verify changes in gas exchange, we performed arterial blood gas analysis (Table 1) in which the variables PaO₂ (mmHg), PCO₂ (mmHg) and SpO₂ (%) showed changes in both experimental models. We can see that the animals belonging to the experimental groups (CCl₄-EX and BDL-EX)

showed significant differences when compared to their respective controls ($p < 0.05$). Only the variable PCO_2 showed no significant difference between the CO and EX animals in the BDL model.

Table 1 – Activity of transaminases and arterial blood gas analysis

Variable	CCl ₄		BDL	
	CO	EX	CO	EX
AST (IU/L)	119±37	5407±2591	169±107	348±148
ALT (IU/L)	39±7	3306±1308	53±11	213±324
AP (IU/L)	67±20	307±88	116±45	355±45
PaO ₂ (mmHg)	106,91±22,01	68,98±17,46	95,10±17,00	85,97±14,55
PaCO ₂ (mmHg)	49,85±10,30	55,06±6,04	46,07±7,03	41,40±12,58
SaO ₂ (%)	96,56±3,53	86,65±18,71	96,52±1,67	93,17±9,72

CCl₄: Carbon tetrachloride; BDL: bile duct ligation; CO: control; EX: Experimental; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; AP: alkaline phosphatase; PaO₂: Pressure Oxygen; PaCO₂: Carbon dioxide partial pressure; SaO₂: oxygen saturation. Results expressed as mean ± standard deviation. * $p < 0,05$ vs. corresponding control group

Markers of Oxidative Stress and Antioxidant Activity. Analysis of lipid peroxidation in lung tissue (Table 2) it appears that TBARS as well as high QL in two models are used in the study ($p < 0.05$). Regarding the antioxidant enzyme SOD, a significant increase ($p < 0.05$) in both experimental models was observed compared to control animals.

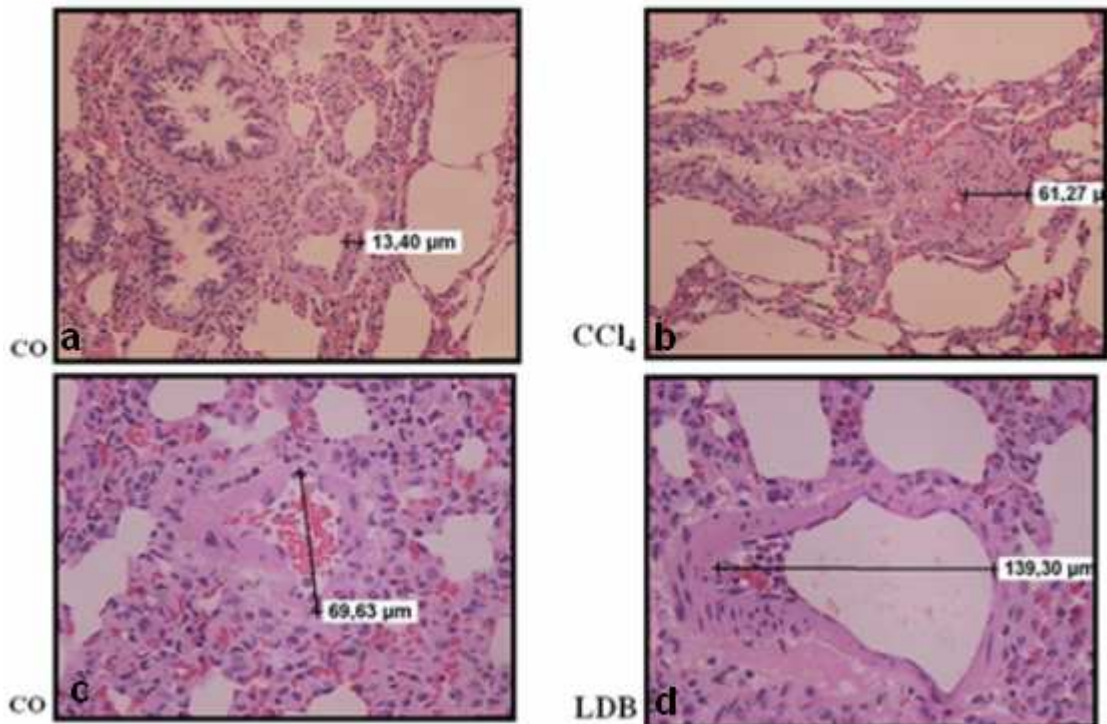
Table 2 – Evaluation of lipid peroxidation in the lung tissue (TBARS e QL) and antioxidant enzyme SOD.

Model	TBARS (nmol/mg/prot)	QL (cps/mg/prot)	SOD (IU/mg/prot)
CCl ₄			
CO	0,56±0,22	16764,20±515,48	11,24±4,99
EX	1,48±0,52*	17797,20±531,65*	27,27±1,23*
BDL			
CO	0,835±0,16	16008,41±1174,45	6,66±1,34
EX	1,91±0,91*	20250,36±827,82*	16,06±2,67*

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; QL: chemiluminescence; SOD: superoxide dismutase; CO: Control; EX: Experimental; Results expressed as mean ± standard deviation. * $p < 0,05$ vs. corresponding control group

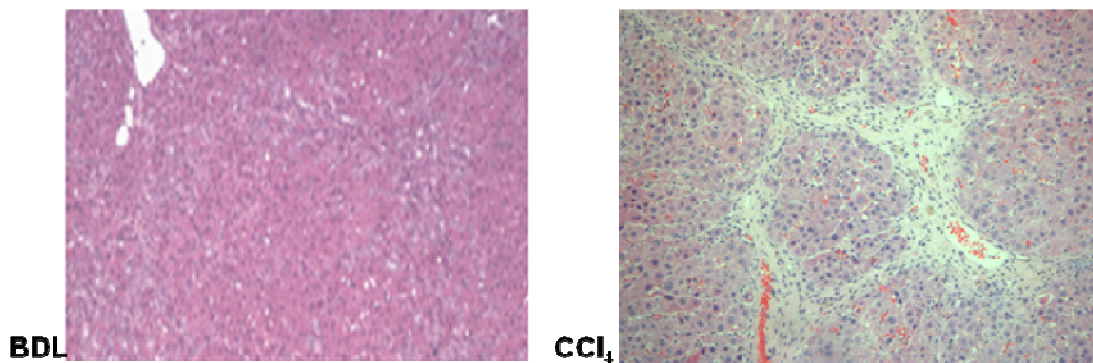
Histology: On the photomicrograph of the lung tissue (Figure 1), we observed an increase of 47.87 mM in wall thickness in the pulmonary artery model CCl₄ as compared to the CO. However, when analyzing the histology of the pulmonary tissue of the animal model BDL, we observed an increase of 69.67 mM in vascular diameter when compared to controls. The photomicrograph of the liver (Figure 2) revealed the presence of necrotic foci, fibrotic nodules, lymphocytic infiltration, steatosis and cellular changes, suggesting that cirrhosis was present in the two models.

Figure 1 - Histology of the Pulmonary Tissue



Photomicrograph of the lung tissue in the models experimentals. a) CCl_4 -CO; b) CCl_4 -EX; c) BDL-CO, d) BDL-EX

Figure 2 – Histology of the Liver Tissue



Photomicrograph of the liver tissue in the models experimentals.
 CCl_4 -EX: BDL-EX

DISCUSSION

In an attempt to develop a specific model for the study of PPH, we used two experimental models developed in our laboratory that cause cirrhosis.

The CCl₄ has been used to reproduce liver cirrhosis due to its potent hepatotoxic effect in which a single dose of CCl₄ is associated with steatosis and necrosis but a prolonged administration leads to liver fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. CCl₄ acts directly on hepatocytes by changing the permeability of the plasma and mitochondrial membranes. This model has been widely used to elucidate the pathogenesis of cirrhosis.¹⁷

Secondary biliary cirrhosis is a chronic and diffuse liver disease that alters intrahepatic or extrahepatic biliary function. The BDL model is used as an animal model for secondary biliary cirrhosis and cirrhosis caused by progressive and fatal damage to the liver. This model simulates the effects of the disease present in humans, causing changes in the inflammatory reaction by leaking bile and the subsequent disorganization of parenchymal inflammation, collagen deposition and formation of fibrosis.^{18,19,20}

Studies by Kontouras et al.⁽¹³⁾ showed that 15 days after bile duct ligation (BDL), the metabolic and biochemical changes were not fully established. Thus, in our experiment, the animals were sacrificed only after 28 days of BDL, when studies confirmed liver cirrhosis.^{21,22}

In this study, both the BDL and the CCl₄ caused liver damage and elevated serum levels of AST, ALT and ALP, which are commonly known to be markers of liver injury. These changes in liver enzyme levels indicate a loss of tissue integrity with consequent apoptosis and necrosis of hepatocytes. These enzymes are eventually released into circulation after cellular damage, and this finding has been reported in several studies using models of BDL and CCl₄.^{23,24,25}

Patients who have secondary biliary cirrhosis exhibit hyperbilirubinemia due to biliary obstruction resulting from liver damage and present results of liver function tests in higher ranges for FA and aminotransferases. High levels of these enzymes are largely caused by the necrosis of tissues that are rich in aminotransferases.^{20,26}

In the presence of liver cirrhosis, there is an increase in lipid peroxidation due to the formation of reactive oxygen species and lipid peroxidation. Some authors report that these phenomena determine the changes in the structures and cell membranes by two mechanisms, covalent binding to macromolecules and cell action on lipids, and that these two mechanisms are the result of the metabolism of CCl₄ by cytochrome P-450, which produces two radicals which are highly toxic and CCl₃ CCl₃O₂••²⁷ Additionally, reactive oxygen species (ROS) are involved in the BDL model.

Cholestasis in the BDL model reduces the excretion of bile salts, causing the retention of hydrophobic bile salts within hepatocytes and apoptosis and necrosis, the destruction of liver parenchyma, which contributes to a redox imbalance, and the formation of ROS. In addition, ROS cause oxidation of cellular proteins and extensive damage to mitochondrial DNA and mitochondrial synthesis by liver damage.^{28, 29,30}

When we evaluated lipid peroxidation in the two models of cirrhosis, animals in the EX group had significantly higher values compared to those in the CO group, and the level of TBARS and QL were elevated in the lung and liver in both groups. This overproduction of ROS might occur in several pathophysiological situations and may explain the finding that in our study, the levels of TBARS and QL were high.^{22,26}

Physiological defense mechanisms are effective in preventing or counteracting the damage caused by free radicals, which can include a set of endogenous

antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx). The two models used in this study showed an increase in lipid peroxidation in lung tissue and are likely to increase in response to an increase of ROS in the SOD, which plays an important role in the balance of the redox cell, as the catalyst free radicals are generated in an attempt to protect the tissue against lesions.^{31,20,26}

Arterial blood gas analysis is an indicator used to facilitate the evaluation of trade gasosas.³² In our study, there was a significant difference between the experimental and control groups with respect to arterial blood gasses. We found that PaO₂ and SpO₂ were significantly lower in the CCl₄ group. In the BDL model, the values of SpO₂ were also reduced, although this did not reach statistical significance.

Approximately 85% of PPH patients show an increase in pulmonary vascular resistance in the course of the disease, of which, 15% experience increases in their pulmonary pressures that are caused by just a state of high flux.³³

The relationship between arterial hypoxemia and PPH has received little attention because PPH is a clinical problem that involves an altered hemodynamic status. PPH patients exhibit arterial hypoxemia and arterial oxygenation that is significantly worse when comparing liver transplantation candidates with normal vascular resistance as determined by echocardiography Doppler.³⁴

In the BDL model, hypoxemia may be associated with bacterial translocation occurring in 45-75% of cirrhotic animals whereby the induced hepatocellular damage prevents adequate blood filtration and promotes the development of portosystemic shunts; this phenomenon dramatically decreases the phagocytic ability of the liver, and it also allows the entry of bacteria and endotoxins into the lung circulation.³⁵

Furthermore, studies have reported arterial hypoxemia in BDL animals, which contributes to a reduction in the values of PaO₂ due to increased volume of lung shunt.³⁶

The differences found in this study between the BDL and CCl₄ gas analyses showed that regardless of etiology, animals with cirrhosis are hypoxemic because the values of PaO₂ and SpO₂ were lower in both experimental models. This hypoxemia might be triggered by the activation of macrophages as well as the presence of cytokines and nitric oxide in the extracellular medium. Nitric oxide is a potent vasodilator that promotes dilation of intrapulmonary vessels, leading to hypoxemia. Nitric oxide may also be involved in the mechanisms that cause an imbalance between the antioxidants and oxidants³⁵

Regarding photomicrographs of the lung tissue, the BDL model caused an increase in diameter of arterioles of the lung tissue. This finding corroborates studies reporting the increase of animals subjected to BDL.²¹ This result may be due to the increased intrapulmonary shunt caused by liver injury leading to an accumulation of blood in the body, which in turn dilates the arterioles of the lung tissue and releases nitric oxide. In the CCl₄ model, the observed reduction of these structures can be explained by the fact that cirrhotic CCl₄ animals had increased levels of ET-1 and collagen deposition, promoting the reduction in thickness of lung tissue.

The histology of liver tissue revealed damage to liver cells and confirmed the changes observed in biochemical analyses. The presence of necrotic foci, fibrotic nodules, the infiltration of lymphocytes, and the fatty changes in liver cells are typical characteristic after the induction of cirrhosis.^{37,38}

The two experimental models used in this study reinforce and confirm the onset of liver damage and cirrhosis of the liver with consequent changes in gas exchange. The BDL model is most often used to evaluate the Hepatopulmonary Syndrome because it shows changes that are typical characteristic of the disease. The CCl₄ model seems to be promising for the study of portopulmonary hypertension (PPH) as well as cirrhosis and changes the thickness and diameter of the pulmonary artery wall. More studies are needed to assess and investigate the specific mechanisms involved in these changes.

CONCLUSION:

The model of hepatic cirrhosis caused by CCl₄ modifies the gas exchange, increases the thickness of the pulmonary artery and reduces its diameter. The CCl₄ model is a promising model for the study of PPH. The BDL model also causes alterations in the lung and liver, reinforcing that is a reliable model of HPS.

REFERÊNCIAS:

1. Ali SI, Said MM, Hassan EK. Prophylactic and curative effects of purslane on bile duct ligation-induced hepatic fibrosis. *Annals of Hepatology*. 2011;10:340-346.
2. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134:1655-69.
3. Dettlef Schuppan and Nezam H. Afdhal. Liver Cirrhosis *Lancet*. 2008;371:838–851.
4. Fallon MB. Mechanisms of pulmonary vascular complications of liver disease: hepatopulmonary syndrome. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39:138-142.
5. Blendis L, Wong F. Portopulmonary hypertension: an increasingly important complication of cirrhosis. *Gastroenterology*. 2003;125:622–4.
6. Miyazaki T, Karube M, Matsuzaki Y, Ikegami T, Doy M, Tanaka N, Bouscarel B. Taurine inhibits oxidative damage and prevents fibrosis in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *J Hepatol*. 2005; 43: 117-125
7. Tamayo RP. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*. 1983;3:112-20.
8. Fang HL, Lin WC. Lipid peroxidation products do not activate hepatic stellate cells. *Toxicology*. 2008;253:36-45.

9. *Silva Jr OC, Mazzetto SA, Souza MEJ, Picinato M, Sankarankutty AK. Obstrução biliar extra hepática. Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia. São Paulo: Robe,1998.*
10. *Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Marroni CA, Marroni N. Ligadura de ducto biliar como modelo de estudo da síndrome hepatopulmonar e estresse oxidativo. Arq. Gastroenterol. 2005;42:244-248.*
11. *Pavanato A, Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, González-Gallego J, et al. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. Dig Dis Sci. 2003;48:824-9.*
12. *Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1978;52:302-10.*
13. *Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhoses in the rat. Br J Exp Pathol. 1984;65:305-11.*
14. *Gonzalez FB, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. Free Radic Biol Med. 1991;10:93-100.*
15. *Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem. 1972;247:3170-5.*
16. *Thakare SP, Jain HN, Patil SD, Upadhyay UM. Hepatoprotective effect of *Cocculus hirsutus* on bile duct ligation-induced liver fibrosis in Albino Wistar rats. Bangladesh J Pharmacol. 2009;4:126-30.*
17. *Tsutomu F, Bryan CF, Suguru Y, Gregory YL, Yakup K, Jonathan MG, Michael L and Kenneth KT. Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor. BMC Gastroenterology. 2010;10:79.*
18. *Gonzalez-Gallego JAE. El hígado. Fisiopatología de las Hepatopatías. Madrid, Spain: McGraw-Hill-Interamericana; (Fundamentos de fisiopatología, edited by E. A. M. Cordero).1998.*
19. *Vieira EK, Bona S, Di Naso FC, Porawski M, Marroni NP. Quercetin Treatment Ameliorates Systemic Oxidative Stress in Cirrhotic Rats. ISRN Gastroenterology. 2011;6.*
20. *Cuevas MJ, Tieppo J, Marroni NP, Tuñón MJ, González-Gallego J. Suppression of amphiregulin/epidermal growth factor receptor signals contributes to the protective effects of quercetin in cirrhotic rats. J Nutr. 2011;141(7):1299-305.*
21. *Vercelino R, Tieppo J, Forgiarini LA, Dias AS, Marroni CA, Marroni NP. Modelos Experimentais para avaliação das alterações pulmonares na síndrome hepatopulmonar. J Bras Pneumol. 2008;34(7):453-460.*
22. *Milstersteiner A, Milsterstainer D, Pereira-Filho N, Frota AR, Ely PB, Zettler CG, Marroni CA, Marroni NP. Uso da quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. Acta Cir Bras. 2003;18:232-7.*
23. *Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Marroni CA, Marroni N. Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress. Arq Gastroenterol. 2005;42:244-48.*