

Artigo Original

Modelos experimentais para avaliação das alterações pulmonares na síndrome hepatopulmonar*

Experimental models for assessment of pulmonary alterations in hepatopulmonary syndrome

Rafael Vercelino¹, Juliana Tieppo¹, Luiz Albeto Forgiarini Junior², Alexandre Simões Dias³, Claudio Augusto Marroni⁴, Norma Possa Marroni⁵

Resumo

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi avaliar o melhor modelo experimental para observar alterações pulmonares que caracterizam a síndrome hepatopulmonar (SHP). **Métodos:** Ratos machos Wistar, com peso médio de 250 g foram usados em quatro modelos experimentais: tetracloreto de carbono inalatório; tetracloreto de carbono intraperitoneal; ligadura parcial de veia porta; e ligadura de ducto biliar (LDB). Em todos os grupos os animais foram divididos em controle e experimental. Foram avaliadas as seguintes variáveis: transaminases; gasometria; lipoperoxidação por substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e por quimiluminescência; e atividade antioxidante da enzima superóxido dismutase (SOD). Foi feito também o exame anatomopatológico do pulmão. **Resultados:** Observou-se diferenças significativas entre os grupos LDB controle e experimental: aspartato amino transferase ($105,3 \pm 43$ vs. $500,5 \pm 90,3$ UI/L); alanino aminotransferase ($78,75 \pm 37,7$ vs. $162,75 \pm 35,4$ UI/L); fosfatase alcalina ($160 \pm 20,45$ vs. $373,25 \pm 45,44$ UI/L); pressão parcial de oxigênio ($85,25 \pm 8,1$ vs. $49,9 \pm 22,5$ mmHg); e saturação de hemoglobina ($95 \pm 0,7$ vs. $73,3 \pm 12,07\%$). A lipoperoxidação e a atividade antioxidante também demonstrou diferenças entre os dois grupos LDB (controle vs. experimental): TBARS ($0,87 \pm 0,3$ vs. $2,01 \pm 0,9$ nmol/mg proteína); quimiluminescência ($16008,41 \pm 1171,45$ vs. $20250,36 \pm 827,82$ cps/mg proteína); e SOD ($6,66 \pm 1,34$ vs. $16,06 \pm 2,67$ UI/mg proteína). No exame anatomopatológico observou-se vasodilatação pulmonar no modelo de LDB. **Conclusões:** Os dados sugerem que o modelo de LDB pode ser usado para outros estudos envolvendo alterações hepáticas e suas relações com o estresse oxidativo e a SHP.

Descritores: Síndrome hepatopulmonar; Pulmão; Estresse oxidativo; Ratos.

Abstract

Objective: The aim of this study was to identify the best experimental model in which to observe the pulmonary alterations characterizing hepatopulmonary syndrome (HPS). **Methods:** Male Wistar rats, with mean weight of 250 g, were used in four experimental models: inhaled carbon tetrachloride; intraperitoneal carbon tetrachloride; partial portal vein ligation; and bile duct ligation (BDL). The animals in all groups were divided into control and experimental subgroups. The following variables were measured: transaminase levels; blood gases; lipoperoxidation, using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and chemiluminescence; and levels of superoxide dismutase (SOD) anti-oxidant activity. Anatomopathological examination of the lung was also performed. **Results:** There were statistically significant differences between the BDL control and BDL experimental groups: aspartate aminotransferase (105.3 ± 43 vs. 500.5 ± 90.3 IU/L); alanine aminotransferase (78.75 ± 37.7 vs. 162.75 ± 35.4 IU/L); alkaline phosphatase (160 ± 20.45 vs. 373.25 ± 45.44 IU/L); arterial oxygen tension (85.25 ± 8.1 vs. 49.9 ± 22.5 mmHg); and oxygen saturation (95 ± 0.7 vs. $73.3 \pm 12.07\%$). Lipoperoxidation and antioxidant activity also differed significantly between the two BDL groups (control vs. experimental): TBARS (0.87 ± 0.3 vs. 2.01 ± 0.9 nmol/mg protein); chemiluminescence (16008.41 ± 1171.45 vs. 20250.36 ± 827.82 cps/mg protein); and SOD (6.66 ± 1.34 vs. 16.06 ± 2.67 IU/mg protein). The anatomopathological examination confirmed pulmonary vasodilatation in the BDL model. In the other models, there were no alterations that were characteristic of HPS. **Conclusions:** The data obtained suggest that the BDL model can be used in future studies involving hepatic alterations related to oxidative stress and HPS.

Keywords: Hepatopulmonary syndrome; Lung; Oxidative stress; Rats.

* Trabalho realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

1. Estudante de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre (RS) Brasil.
2. Estudante de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre (RS) Brasil.
3. Coordenador do Mestrado Profissional em Reabilitação e Inclusão do Centro Universitário Metodista – IPA – Porto Alegre (RS) Brasil.
4. Professor Associado de Gastroenterologia. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre (RS) Brasil.
5. Coordenadora do Laboratório de Hepatologia e Fisiologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre-Universidade Luterana do Brasil – HCPA-ULBRA – Porto Alegre (RS) Brasil.

Endereço para correspondência: Norma Possa Marroni. Rua José Kanan Aranha, 102, Jardim Isabel, CEP 91760-470, Porto Alegre (RS) Brasil.

Tel 55 51 32483202. Fax 55 51 32483202. E-mail: nmarroni@terra.com.br

Apoio Financeiro: Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

Recebido para publicação em 20/6/2007. Aprovado, após revisão, em 3/10/2007.

Introdução

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 resulta da cicatrização e regeneração hepatocelular, que constitui a principal resposta do tecido hepático para os incontáveis insultos inflamatórios, tóxicos metabólicos e congestivos.⁽¹⁾

Anormalidades da oxigenação arterial são comuns em pacientes com cirrose, observando-se uma grande diferença no gradiente alvéolo-arterial de oxigênio e hipoxemia aguda em 3-7% dos casos (pressão parcial arterial de oxigênio— PaO_2 —abaixo de 60 mmHg).⁽²⁾ A fisiopatologia da disfunção pulmonar na presença de doenças hepáticas pode envolver uma diminuição na atenuação da vasoconstrição hipóxica, baixa resistências vascular, desequilíbrio da ventilação e perfusão, *shunt* intrapulmonar e alteração na difusão gasosa. Estes achados clínicos e laboratoriais caracterizam a síndrome hepatopulmonar (SHP), que é observada em pacientes com cirrose ou hipertensão portal e consiste de cirrose acompanhada de hipoxemia e vasodilatação intrapulmonar, mesmo sem doença cardiopulmonar.⁽³⁾

A indução experimental da doença hepática pode replicar com precisão as alterações histológicas, bioquímicas, hemodinâmicas, renais e neurohumorais observadas na disfunção hepática humana. Os riscos do manuseio para o pesquisador são eliminados, e o uso de tais modelos melhora nosso entendimento da fisiopatologia da doença hepática e de outras síndromes envolvidas. Podemos acompanhar o progresso fisiopatológico da cirrose e suas complicações através de estudos experimentais em modelos de cirrose hepática, cirrose biliar secundária e hipertensão portal. Em tais modelos, a cirrose hepática é induzida através da administração de agentes carcinogênicos como o tetracloreto de carbono (CCl_4), e a cirrose biliar é induzida através da ligadura de ducto biliar (LDB), e a hipertensão portal é induzida pela ligadura parcial da veia porta (LPVP).⁽⁴⁾ Entre as inúmeras complicações da SHP, algumas das mais sérias são as alterações pulmonares, que são primariamente caracterizadas por baixas concentrações de oxigênio e vasodilatação intrapulmonar. Até o momento, não existe um modelo específico para o estudo destas alterações relacionadas à SHP. Portanto, o objetivo deste

estudo é comparar quatro modelos experimentais em termos de habilidade para demonstrar as complicações pulmonares que ocorrem na SHP. Para tanto, analisamos a função hepática, gasometria, aspectos anatomopatológicos e estresse oxidativo (para quantificar dano tecidual).

Métodos

Para os propósitos deste estudo 40 ratos Wistar machos (peso corporal médio de 250 g) foram obtidos junto ao Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os ratos foram acondicionados em gaiolas plásticas (47 × 34 × 18 cm) forradas com lascas de madeira e foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12 h em um ambiente com temperatura controlada (20-25 °C) com acesso *ad libitum* à ração e água. Todos os procedimentos estavam de acordo com os parâmetros estabelecidos pelos comitês de ética do Hospital das Clínicas de Porto Alegre: o Comitê de Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais, e o Comitê do Grupo de Pós-Graduação e Pesquisa sobre Pesquisa e Ética em Saúde. Quatro modelos experimentais foram avaliados.

- 1) CCl_4 inalatório (CCl_4 IN) para induzir a cirrose. Os animais foram divididos em dois subgrupos: controle (CCl_4 IN-Co, n = 5), recebendo apenas fenobarbital em água potável, e experimental (CCl_4 IN-Ex, n = 5), recebendo fenobarbital em água potável mais CCl_4 IN. O fenobarbital foi adicionado à água potável a uma concentração de 0,3 g/L com a finalidade de provocar indução enzimática e acelerar o processo cirrótico. O grupo CCl_4 IN-Ex foi exposto ao agente agressivo duas vezes por semana (às segundas e sextas), de acordo com o protocolo desenvolvido por Jiménez et al.,⁽⁴⁾ em uma câmara de inalação (47 × 34 × 18 cm). O CCl_4 foi colocado em um recipiente de vidro (umidificador) acoplado a um compressor de ar e liberado na câmara a um fluxo de 1 L/min. Nas primeiras três sessões, a duração da exposição foi de 30 s e os animais permaneceram dentro da câmara por mais 30 s enquanto o compressor estava desligado (tempo de espera). Na quarta sessão, a duração da exposição foi aumentada para 60 s, seguida de 60 s adicionais em modo de espera. Em seguida, a duração da exposição e

do tempo de espera foram aumentados em 30 s a cada três sessões, chegando a um máximo de 5 min na 16ª semana.^(4,5)

- 2) CCl₄ intraperitoneal (CCl₄ IP) para induzir a cirrose. Os animais foram divididos em dois subgrupos: controle (CCl₄ IP-Co, n = 5), recebendo apenas fenobarbital em água potável, e experimental (CCl₄ IP-Ex, n = 5), recebendo fenobarbital em água potável mais CCl₄ IP. O fenobarbital foi aplicado como descrito acima. A cirrose foi induzida através de injeção IP de CCl₄ (0.5 mL, diluídos 1:6 em óleo vegetal, às 22:00 a cada 4 dias por 14 semanas).⁽⁶⁾
- 3) LPVP para induzir hipertensão portal: Usamos o modelo de LPVP descrito em um estudo publicado em 1983.⁽⁷⁾ Os animais foram divididos em dois subgrupos: controle (LPVP-Co, n = 5), submetidos a uma ligadura parcial fictícia da veia porta; e experimental LPVP-Ex, n = 5), submetidos à ligação. Resumidamente, os animais foram anestesiados e submetidos à laparotomia na linha mediana ventral e a veia porta foi isolada usando-se uma agulha de calibre 20, retirando-se delicadamente a agulha depois da ligadura. Ao se completar o

procedimento, o peritônio e a parede abdominal estavam suturados.

- 4) LDB para induzir a cirrose biliar: Seguimos o modelo de cirrose biliar secundária à LDB descrito em um estudo publicado em 1985.⁽⁸⁾ Os animais foram divididos em dois grupos: controle (LDB-Co, n = 5), submetido à LDB comum fictícia; e experimental (LDB-Ex, n = 5), submetido à LDB.

Os exames laboratoriais foram realizados no Laboratório Central do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, e todos os outros procedimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia, Hepatologia e Estresse Oxidativos do Hospital das Clínicas da UFRGS em Porto Alegre.

Antes de todos os procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com 2% de cloridrato de xilazina (50 mg/kg de peso corporal) e cloridrato de quetamina (100 mg/kg de peso corporal), ambos administrados intraperitonealmente. Após os procedimentos experimentais, os animais foram abrigados em gaiolas individuais por um período de duas semanas, quando foram sacrificados com uma overdose dos mesmos agentes anestésicos.

Tabela 1 – Níveis séricos das enzimas, gases sanguíneos e gradiente alvéolo-arterial de oxigênio nos grupos controles e experimentais dos quatro modelos experimentais.^a

Variável	CCl ₄ IN		CCl ₄ IP		LPVP		LDB	
	Co	Ex	Co	Ex	Co	Ex	Co	Ex
AST (IU/L)	191,3 ± 45,6	717,0 ± 207,6	132,5 ± 19,6	1715,0 ± 689,2*	133,7 ± 22,3	108,5 ± 19,4	105,2 ± 21,5	500,5 ± 45,1**
ALT (IU/L)	124,8 ± 46,4	759,6 ± 232,2*	86,7 ± 7,3	1399,5 ± 459,5*	79,7 ± 9,1	84,5 ± 16,9	78,7 ± 18,8	162,7 ± 17,7*
ALP (IU/L)	86,8 ± 8,7	196,4 ± 25,2**	88,2 ± 11,7	220,7 ± 60,9	116,0 ± 20,5	127,8 ± 29,7	160,0 ± 20,4	373,2 ± 45,4**
PaO ₂ (mmHg)	85,3 ± 0,8	63,8 ± 3,8**	107,0 ± 4,0	97,8 ± 7,4	69,7 ± 0,9	64,3 ± 5,2	85,2 ± 4,0	49,9 ± 11,3*
PaCO ₂ (mmHg)	48,7 ± 2,9	54,7 ± 2,9	49,0 ± 5,0	46,5 ± 4,0	54,3 ± 1,7	56,3 ± 5,0	9,8 ± 3,3	64,0 ± 5,1*
SaO ₂ (%)	95,3 ± 0,3	78,8 ± 9,3*	96,0 ± 1,3	96,2 ± 0,7	92,0 ± 0,0	86,0 ± 2,9	95,0 ± 0,7	73,3 ± 12,1*
AaDO ₂ (mmHg)	23,1 ± 12,8	56,3 ± 2,8	12,9 ± 4,3	22,7 ± 5,8	12,1 ± 2,9	15,0 ± 3,9	30,4 ± 3,5	62,6 ± 10,5**

CCl₄ IN: tetracloreto de carbono inalatório; CCl₄ IP: tetracloreto de carbono intraperitoneal; LPVP: ligadura parcial da veia porta; LDB: ligadura de ducto biliar; Co: controle; Ex: experimental; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; ALP: fosfatase alcalina; PaO₂: pressão parcial arterial de oxigênio; PaCO₂: pressão parcial arterial de gás carbônico; SaO₂: saturação arterial de oxigênio; e AaDO₂: gradiente alvéolo-arterial de oxigênio. ^aResultados expressos como média ± erro padrão da média. *p < 0,05 vs. grupo controle correspondente. **p < 0,001 vs. grupo controle correspondente.

No dia do sacrifício, os animais foram anestesiados e amostras de sangue foram coletadas através do plexo retro-ocular.⁽⁹⁾ Estas amostras de sangue foram usadas para a avaliação dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP), que são expressos em IU/L. Em seguida, a região abdominal foi depilada, uma laparotomia na linha mediana do ventral foi realizada, e coletou-se sangue da artéria aorta abdominal com o intuito de medir a troca gasosa do sangue arterial com um analisador ABL 700 (Radiometer, Copenhagen, Dinamarca), utilizando-se o método da iontoforese para se determinar o PaO₂, a pressão parcial arterial de gás carbônico (PaCO₂) e a saturação arterial de oxigênio (SaO₂).

Depois que as amostras de sangue foram coletadas, os animais foram sacrificados como descrito acima. Os pulmões foram então dissecados e pesados para se determinar a relação entre peso do pulmão e peso corporal total (a chamada relação peso pulmonar/peso corporal) A parte anterior do lobo inferior direito foi então separada para a análise histológica, sendo o restante prontamente congelado em nitrogênio líquido e conservado a -80 °C para análise posterior. O tecido congelado foi homogeneizado em tampão fosfato (KCl 140 mM, fosfato 20 mM, pH 7,4) usando-se um homogeneizador Ultra-Turrax (IKA Labortechnik, Staufen, Alemanha). A lipoperoxidação foi determinada através da determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*thiobarbituric acid reactive substances* - TBARS)⁽¹⁰⁾ e quimiluminescência.⁽¹¹⁾ A atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela quantificação da oxidação da adrenalina em adrenocromo.⁽¹²⁾

As amostras para a análise histológica do tecido pulmonar foram coletadas e conservadas por 12 h em solução de formaldeído a 10%, depois transferidas para álcool a 70% e coradas com hematoxilina-eosina. O exame anatomopatológico foi realizado de forma duplo-cega por um patologista no Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas de Porto Alegre.

As médias e os erros padrão das médias foram calculados. Os dados foram analisados usando-se análise de variância. As comparações post hoc foram feitas usando-se o teste de Student Newman-Keuls O nível de significância estatística foi estabelecido

em $p < 0,05$. O software *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) foi utilizado.

Resultados

Como pode ser observado na Tabela 1, existe uma diferença significativa entre os grupos CCl₄ IN-Co e CCl₄ IN-Ex em termos de níveis séricos de ALT e ALP (mais elevado no grupo CCl₄ IN-Ex; $p < 0,05$ para ambos), entre os grupos CCl₄ IP-Co e CCl₄ IP-Ex em termos de níveis séricos de AST e ALT (mais elevado no grupo CCl₄ IP-Ex; $p < 0,05$ para ambos), e entre os grupos LDB-Co e LDB-Ex em termos de níveis séricos de AST e ALT (mais elevado no grupo LDB-Ex; $p < 0,05$ para ambos). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos LPVP-Co e LPVP-Ex em termos de níveis séricos de AST e ALT ou ALP.

Para verificar as alterações nas trocas gasosas, realizamos uma gasometria (Tabela 1), na qual PaO₂, PaCO₂, SaO₂ e o gradiente alvéolo-arterial de oxigênio foram analisados nos diferentes modelos e grupos. Houve uma diferença significativa entre os grupos CCl₄ IN-Co e CCl₄ IN-Ex em termos de PaO₂ ($p < 0,001$). Nos modelos de CCl₄ IP e LPVP não houve diferenças significantes entre os grupos controles e experimentais em termos de qualquer parâmetro gasométrico. Entretanto, houve diferenças significantes entre os grupos LDB-Co e LDB-Ex para PaO₂, PaCO₂ e SaO₂ ($p < 0,05$ para todos), assim como para o gradiente alvéolo-arterial de oxigênio ($p < 0,001$).

Como mostramos na Tabela 2, não houve diferenças significativas entre os grupos controles e experimentais nos modelos CCl₄ IN e LDB quanto à

Tabela 2 - Relação peso pulmonar/peso corporal nos grupos controles e experimentais dos quatro modelos experimentais.^a

Modelo	Relação peso pulmonar/peso corporal (%)	
	Co	Ex
CCl ₄ IN	0,46 ± 0,06	0,59 ± 0,07*
CCl ₄ IP	0,52 ± 0,04	0,47 ± 0,03
LPVP	0,44 ± 0,01	0,40 ± 0,01
LDB	0,38 ± 0,02	0,53 ± 0,01*

CCl₄ IN: tetracloreto de carbono inalatório; CCl₄ IP: tetracloreto de carbono intraperitoneal; LPVP: ligadura parcial da veia porta; LDB: ligadura de ducto biliar; Co: controle; e Ex: experimental. ^aResultados expressos como média ± erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs. grupo controle correspondente.

Tabela 3 – Lipoperoxidação, caracterizada pelos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, quimiluminescência e atividade antioxidante do superóxido dismutase, nos grupos controles e experimentais dos quatro modelos experimentais.^a

Modelo	TBARS (nmol/mg proteína)		CL (cps/mg proteína)		SOD (IU/mg proteína)	
	Co	Ex	Co	Ex	Co	Ex
CCl ₄ IN	0,758 ± 0,05	0,802 ± 0,13	20633,4 ± 4526,42	25282,6 ± 5369,40	2,65 ± 0,62	6,24 ± 0,89*
CCl ₄ IP	0,97 ± 0,22	1,48 ± 0,72	16764,20 ± 515,48	17797,20 ± 531,65	9,02 ± 0,76	10,76 ± 2,41
LPVP	0,552 ± 0,03	0,757 ± 0,15	13318,05 ± 2527,90	17807,25 ± 2813,22	4,79 ± 1,48	8,16 ± 1,18
LDB	0,835 ± 0,16	1,91 ± 1,91*	16008,41 ± 1171,45	20250,36 ± 827,82*	6,66 ± 1,34	16,06 ± 2,67*

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico); CL: quimiluminescência; SOD: superóxido dismutase; Co: controle; Ex: experimental; CCl₄ IN: tetracloreto de carbono inalatório; CCl₄ IP: tetracloreto de carbono intraperitoneal; LPVP: ligadura parcial da veia porta; e LDB: ligadura de ducto biliar. ^aResultados expressos como média ± erro padrão da média. *p < 0,05 vs. grupo controle correspondente.

relação peso pulmonar/peso corporal (p < 0,05 para todos), apesar destas diferenças terem sido observadas nos modelos CCl₄ IP ou LPVP.

A Tabela 3 mostra a lipoperoxidação, caracterizada pelos valores de TBARS, quimiluminescência e atividade de SOD. Nos modelos de CCl₄ IN, CCl₄ IP e LPVP, não houve diferenças significantes entre os grupos controles e experimentais. Entretanto, houve uma lipoperoxidação significativamente maior no grupo LDB-Ex que no grupo LDB-Co (p < 0,05). A atividade do SOD pulmonar foi significativamente maior no grupo CCl₄ IN-Ex, CCl₄ IP-Ex e LDB-Ex do que em seus grupos controles correspondentes (p < 0,05), apesar de não haver diferença entre os grupos LPVP-Ex e LPVP-Co.

Como pode ser observado na Figura 1, a análise histológica dos tecidos pulmonares dos animais em todos os grupos controles mostrou arquitetura normal do parênquima pulmonar e vasos com diâmetros normais. Apenas uma amostra de tecido pulmonar de um animal de um grupo controle é mostrada, já que os achados histológicos foram similares para todos os animais dos grupos controle. Os diâmetros dos vasos também estavam normais nos pulmões dos animais dos grupos experimentais dos modelos CCl₄ IN, CCl₄ IP e LPVP, apesar de diâmetros maiores terem sido observados nos animais do grupo experimental do modelo de LDB.

Discussão

Neste estudo, quatro modelos experimentais foram utilizados, três envolvendo a indução de cirrose e um envolvendo a indução de hipertensão portal. O CCl₄ é usado como indutor de cirrose, reduplicando com precisão anormalidades

hemodinâmicas, com resistência vascular hepática aumentada; levando à hipertensão portal e impedindo trocas entre os sinusóides e os hepatócitos, todos quais são responsáveis pelo maior dano hepático na cirrose.^(13,14) O modelo CCl₄ combina a inalação do CCl₄ com a administração de fenobarbital na água potável, o que acelera o processo metabólico ao aumentar a atividade do sistema citocromo P450, levando ao desenvolvimento da cirrose, com esplenomegalia e ascite acentuada, esta última sendo uma característica proeminente de falência crônica do fígado durante a cirrose.^(6,15) No presente estudo, os níveis séricos de AST, ALT e ALP encontravam-se mais elevados nos animais dos grupos experimentais do que em seus respectivos grupos controles para ambos os modelos de CCl₄, indicando uma perda de integridade hepática nos animais dos grupos CCl₄ IN-Ex e CCl₄ IP-Ex, já que os elevados níveis séricos destas enzimas estão diretamente relacionadas a lesão celular e necrose em atividade das células hepáticas.

Pacientes com hipertensão portal desenvolvem maior fluxo de sangue para o estômago. As descobertas fisiológicas que se correlacionam com a piora da gastropatia hipertensiva portal incluem gradiente de pressão venosa portal aumentado e fluxo sanguíneo hepático diminuído. Com uma prevalência de 80% dos casos, a hipertensão portal está diretamente relacionada à duração da lesão hepática e à extensão da gastropatia.⁽¹⁶⁾ No presente estudo, os níveis séricos de AST, ALT e ALP eram normais nos animais dos grupos LPVP-Ex e LPVP-Co, indicando a falta de alterações hepáticas. Isto pode ser explicado pelo fato de que a LPVP é um modelo de hipertensão portal, que pode ser uma complicação da cirrose hepática, e não um modelo

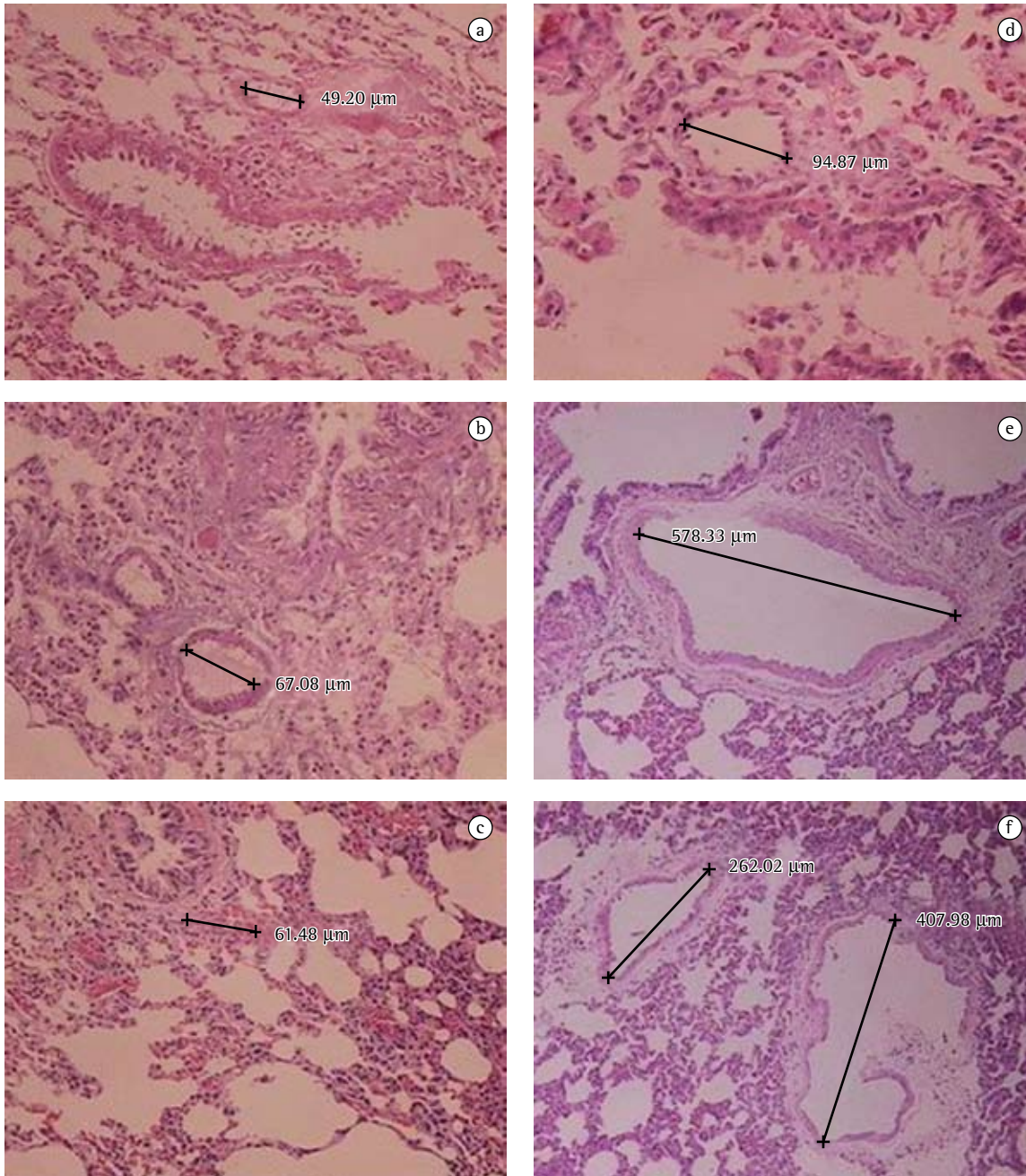


Figura 1 - Fotos de microscopia das amostras de tecido pulmonar coradas com hematoxilina e eosina: a) controle; b) tetracloreto de carbono inalatório; c) tetracloreto de carbono intraperitoneal; d) ligadura parcial da veia porta; e) e f) ligadura de ducto biliar. Aumento, 100x.

de cirrose em si. Estes achados corroboram os de um estudo prévio envolvendo um modelo animal de hipertensão portal.⁽¹⁷⁾ A cirrose hepática foi observada em animais dos grupos experimentais de todos os modelos, com exceção do modelo de LPVP.

Encontramos níveis séricos de ALT, AST e ALP mais altos no grupo LDB-Ex que no grupo LDB-Co. Na maioria dos pacientes com cirrose biliar secundária, o dano hepático e ao sistema biliar resultante da obstrução biliar produz hiperbilirrubinemia,

níveis mais altos de ALP e de aminotransferase. Os níveis elevados destas enzimas são, em grande parte, atribuídos à necrose de tecidos ricos em aminotransferase, bem como à colestase provocada por este modelo.⁽¹⁸⁾ Nossos achados demonstram o acometimento hepático produzido nos animais submetidos a este modelo.

No modelo LDB, a relação peso pulmonar/peso corporal foi maior no grupo LDB-Ex que no grupo LDB-Co. Um estudo animal mostrou um aumento posterior à LDB nos diâmetros das arteríolas.⁽¹⁹⁾ No presente estudo, a diferença na relação peso pulmonar/peso corporal provavelmente se deveu ao *shunt* e à dilatação vascular intrapulmonar causados pelo acúmulo de sangue no órgão.

A avaliação da gasometria é um indicador usado para facilitar o diagnóstico do SHP. Na maioria dos pacientes cirróticos, PaO₂ é <80 mmHg, SaO₂ é ≤92%, e PaCO₂ é ≈30 mmHg.⁽²⁰⁾ Em nosso estudo, demonstramos diferenças significativas entre os grupos experimentais e controles em termos destes parâmetros. Estudos experimentais mostraram que animais controle apresentam valores de PaO₂ de 90-99 mmHg e valores de PaCO₂ de 40 mmHg,^(21,22) valores comparáveis àqueles observados nos animais do grupo CCL₄ IN-Co avaliados no presente estudo. Observamos que PaO₂ e SaO₂ foram significativamente mais baixos no grupo CCL₄ IN-Ex que no grupo CCL₄ IN-Co, enquanto o PaCO₂ foi mais alto, mesmo não significativamente. Estas alterações provavelmente se devem ao potencial tóxico do CCL₄ inalatório no sistema respiratório. O modelo LPVP não foi associado a anormalidades na difusão pulmonar,⁽²³⁾ como demonstrado em nosso estudo. Observamos diferenças significativas entre os grupos LDB-Ex e LDB-Co em termos de achados gasométricos, demonstrando que animais com cirrose biliar secundária apresentam hipoxemia. Esta hipoxemia pode ser associada com a translocação bacteriana que a LDB causa em 45-75% dos animais cirróticos, nos quais o dano hepatocelular induzido pelo LDB impede a filtração adequada do sangue, promovendo o desenvolvimento de *shunts* portossistêmicos e uma queda dramática na capacidade fagocítica do fígado, permitindo a entrada de bactérias e endotoxinas na circulação pulmonar. Nesta situação, o pulmão filtra o sangue, compensando pela queda da função fagocítica do fígado. Durante a fagocitose, a ativação de inúmeros macrófagos resulta na secreção de produtos como citocinas e ácido

nítrico no meio extracelular, sendo o ácido nítrico um potente vasodilatador e também envolvido nos mecanismos de desequilíbrio dos sistemas antioxidantes e oxidantes.⁽²⁴⁾ O ácido nítrico funciona como um sinalizador molecular (mediando a vasodilatação quando produzido em baixas concentrações pelo óxido nítrico sintetase em macrófagos no processo inflamatório), então promovendo a vasodilatação intrapulmonar seguida de hipoxemia.⁽²⁵⁾

Vários autores relataram que, na presença de cirrose, há um aumento considerável da lipoperoxidação devido à formação de espécies reativas do oxigênio.⁽²⁶⁾ Nos modelos experimentais, este fenômeno também ocorre, levando a alterações morfológicas envolvendo o retículo endoplasmático dos hepatócitos. No modelo de CCL₄, estas alterações originam-se do metabolismo do próprio agente tóxico CCL₄, que é metabolizado nos radicais livres triclorometil e triclorometil-peróxil, radicais lesivos que podem iniciar o processo de lipoperoxidação.⁽²⁷⁾

Apesar de a peroxidação hepática ser amplamente descrita em modelos de cirrose induzida por CCL₄, bem como os modelos de hipertensão portal induzida pela LPVP, o mesmo não observado em tecidos pulmonares.^(6,15,17) Entretanto, no presente estudo, observou-se que a atividade do SOD estava alterada nos homogeneizados de amostras de tecido pulmonar coletados dos animais dos grupos CCL₄ IN-Ex e LDB-Ex.

No modelo de cirrose induzida por CCL₄, alterações nos gases arteriais e níveis elevados de atividade do SOD foram observados, possivelmente como uma defesa contra dano oxidativo causado pela inalação do CCL₄. Entretanto, estas alterações não são características da SHP, já que o CCL₄ inalatório tem efeitos tóxicos nos pulmões e rins que são aumentados pela alta concentração arterial da droga, que promove sua passagem através dos pulmões, através da circulação pulmonar em direção ao átrio esquerdo.⁽²⁸⁾

No presente estudo, os animais submetidos à LDB apresentaram lipoperoxidação significativamente mais alta (níveis mais altos de TBARS e quimiluminescência) que seus controles correspondentes. Este achado pode ser associado com produção aumentada dos radicais livres, já que a translocação bacteriana e a migração fagocítica para o tecido pulmonar aumenta a geração de superóxido capazes de oxidar a membrana plasmá-

tica, gerando uma grande quantidade de espécies reativas do oxigênio. É possível que, em resposta a este dano, houve um aumento da atividade de SOD endógeno, que tem um papel importante no equilíbrio da oxido-redução celular, uma vez que catalisa os radicais livres gerados em uma tentativa de proteger o tecido contra lesões.

Entre os vários modelos clássicos de cirrose experimental e hipertensão portal, o modelo de cirrose induzida por LDB parece ser o mais útil para o estudo da SPH, uma vez que promove cirrose verdadeira e altera todos os parâmetros de troca gasosa arterial, aumenta a lipoperoxidação e a defesa antioxidante do SOD.

Referências

1. Onori P, Morini S, Franchitto A, Sferra R, Alvaro D, Gaudio E. Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl₄-treated rats. *J Hepatol.* 2000;33(4):555-63.
2. Rodriguez-Roisin R, Agustí A, Roca J. Pulmonary function and liver disease. *Current Opinion Gastroenterol.* 1988;4:609-14.
3. Rodríguez-Roisin R, Agustí AG, Roca J. The hepatopulmonary syndrome: new name, old complexities. *Thorax.* 1992;47(11):897-902.
4. Jiménez W, Clária J, Arroyo V, Rodés J. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 1992;7(1):90-7.
5. McLean EK, McLean AE, Sutton PM. Instant cirrhosis. An improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. *Br J Exp Pathol.* 1969;50(5):502-6.
6. 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(4):824-9.
7. Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *Am J Physiol.* 1983;244(1):G52-7.
8. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol.* 1984;65(3):305-11.
9. Halpern BN, Pacaud A. [Technique of obtaining blood samples from small laboratory animals by puncture of ophthalmic plexus.][Article in Undetermined Language]. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1951;145(19-20):1465-6.
10. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
11. 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.
12. 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(10):3170-5.
13. Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, López V, López-Barrera F, Yáñez L, Vidrio S, et al. Balance between oxidative damage and proliferative potential in an experimental rat model of CCl₄-induced cirrhosis: protective role of adenosine administration. *Hepatology.* 1997;26(5):1100-10.
14. Corrales F, Giménez A, Alvarez L, Caballeria J, Pajares MA, Andreu H, et al. S-adenosylmethionine treatment prevents carbon tetrachloride-induced S-adenosylmethionine synthetase inactivation and attenuates liver injury. *Hepatology.* 1992;16(4):1022-7.
15. 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][Article in Portuguese]. *Arq Gastroenterol.* 2001;38(1):40-7.
16. Primignani M, Carpinelli L, Preatoni P, Battaglia G, Carta A, Prada A, et al. Natural history of portal hypertensive gastropathy in patients with liver cirrhosis. The New Italian Endoscopic Club for the study and treatment of esophageal varices (NIEC). *Gastroenterology.* 2000;119(1):181-7.
17. 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;68(10):1939-46.
18. Pastor A, Collado PS, Almar M, González-Gallego J. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *J Hepatol.* 1997;27(2):363-70.
19. Berthelot P, Walker JG, Sherlock S, Reid L. Arterial changes in the lungs in cirrhosis of the liver--lung spider nevi. *N Engl J Med.* 1966;274(6):291-8.
20. Krowka MJ, Cortese DA. Hepatopulmonary syndrome: an evolving perspective in the era of liver transplantation. *Hepatology.* 1990;11(1):138-42.
21. Zhang XJ, Katsuta Y, Akimoto T, Ohsuga M, Aramaki T, Takano T. Intrapulmonary vascular dilatation and nitric oxide in hypoxemic rats with chronic bile duct ligation. *J Hepatol.* 2003;39(5):724-30.
22. Zhang HY, Han DW, Wang XG, Zhao YC, Zhou X, Zhao HZ. Experimental study on the role of endotoxin in the development of hepatopulmonary syndrome. *World J Gastroenterol.* 2005;11(4):567-72.
23. Fallon MB. Mechanisms of pulmonary vascular complications of liver disease: hepatopulmonary syndrome. *J Clin Gastroenterol.* 2005;39(4 Suppl 2):S138-S42.
24. Rabiller A, Nunes H, Lebrec D, Tazi KA, Wartski M, Dulmet E, et al. Prevention of gram-negative translocation reduces the severity of hepatopulmonary syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(4):514-7.
25. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279(6):L1005-28.
26. Britton RS, Bacon BR. Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepatogastroenterology.* 1994;41(4):343-8.
27. Rechnagel RO, Glende EA Jr. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. *CRC Crit Rev Toxicol.* 1973;2(3):263-97.
28. Proctor E, Chatamra K. High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology.* 1982;83(6):1183-90.