

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

**O EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE A SÍNDROME HEPATOPULMONAR
INDUZIDA POR CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA EM RATOS**

Rafael Vercelino

**Orientadora
Prof^a Dr^a Norma Possa Marroni**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Fisiologia para
obtenção do Título de Mestre**

**Porto Alegre
2005**

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

**O EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE A SÍNDROME HEPATOPULMONAR
INDUZIDA POR CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA EM RATOS**

Rafael Vercelino

**Porto Alegre
2005**

À minha mãe, por todo amor incondicional;

Ao meu irmão, pela disposição e amizade;

Ao Dr. Alexandre Simões Dias, pelo exemplo e apoio.

*“Tenhais confiança não no mestre, mas no ensinamento,
tenhais confiança não no ensinamento, mas no espírito das palavras,
tenhais confiança não na teoria, mas na experiência,
não creiais em algo simplesmente porque vós ouvistes,
não creiais nas tradições simplesmente porque elas têm sido mantidas de geração
para geração,
não creiais em algo simplesmente porque foi falado e comentado por muitos,
não creiais em algo simplesmente porque está escrito em livros sagrados;
não creiais no que imaginais, pensando que um deus vos inspirou,
não creiais em algo meramente baseado na autoridade de seus mestres e anciãos,
mas após contemplação e reflexão, quando vós percebeis que algo é conforme ao
que é razoável e leva ao que é bom e benéfico tanto para vós quanto para os outros,
então o aceiteis e façais disto a base de sua vida.”*

Sidarta Gautama

AGRADECIMENTOS

À minha Mãe, Iolanda Maria Vercelino, por mostrar que o amor supera qualquer dificuldade, pela dedicação e esforço para tornar seus filhos pessoas dignas e de valor.

À Profa. Dra. Norma Marroni, pelo seu amor exigente, por sua dedicação à pesquisa e à sua arte em formar pesquisadores e pela presença constante na elaboração e desenvolvimento deste trabalho.

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

Ao Prof. Alexandre Simões Dias, pelo apoio, pelo exemplo como professor, pesquisador e amigo e por nunca deixar de acreditar.

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

Ao Dr. Michael Fallon, que sempre auxiliou através do envio de material didático, enriquecendo o conteúdo deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos de laboratório Inês Rodriguês, Andréia Janz Moreira, Nelson Alexandre, Graziella, Silvia, Alex, Clarissa, Carla, Leonardo e Lígia, pela colaboração e auxílio na elaboração das técnicas, e principalmente pela amizade.

À todos do departamento de fisiologia da UFRGS, que de alguma forma ou outra colaboraram para o meu crescimento como pesquisador e pessoa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURA.....	14
INTRODUÇÃO.....	16
1.1 CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA.....	19
1.2 SÍNDROME HEPATOPULMONAR.....	20
1.3 SHP EXPERIMENTAL.....	24
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO.....	27
1.5 SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	31
1.6 SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO.....	33
1.7 SISTEMA ANTIOXIDANTE NÃO-ENZIMÁTICO.....	35
1.8 N-ACETILCISTEÍNA.....	38
2. OBJETIVOS.....	42
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	44
3.2 ANIMAIS.....	44
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	45
3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	45
3.4.1 <i>Desenvolvimento do Modelo de Síndrome Hepatopulmonar.....</i>	<i>46</i>
3.4.2 <i>Administração da droga.....</i>	<i>46</i>

3.5 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E ANÁLISE DO SANGUE.....	46
3.6 AVALIAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO.....	49
3.6.1 Preparo do homogeneizado.....	49
3.6.2 Dosagem de proteína.....	49
3.6.3 Medida da Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico(TBA-RS)....	50
3.6.4 Determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD).....	51
3.6.5 Determinação da atividade da Catalase (CAT).....	52
3.6.6 Determinação da atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx).....	52
3.7 MEDIDA DE NITRITOS E NITRATOS.....	53
3.8 AVALIAÇÃO ANATOMOPATOPLÓGICA DOS TECIDOS.....	54
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
4. RESULTADOS.....	56
4.1 Avaliação da integridade hepática.....	57
4.2 Relação hepatossomática e pneumossomática.....	58
4.3 Gasometria arterial.....	59
4.4 Determinação da lipoperoxidação hepática e pulmonar.....	61
4.5 Atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD).....	63
4.6 Atividade da enzima antioxidante catalase (CAT).....	65
4.7 Atividade da enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GPx).....	67
4.8 Avaliação da produção de óxido nítrico através de nitratos totais.....	68
4.9 Avaliação histopatológica.....	70
5. DISCUSSÃO.....	74
CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

RESUMO

Este trabalho avaliou o potencial antioxidante da N-acetilcisteína (NAC) frente a síndrome hepatopulmonar, uma complicação da cirrose, no modelo de cirrose biliar secundária através da ligadura de ducto biliar em ratos. Foi utilizado ratos machos Wistar e investigou-se a integridade hepática através de enzimas séricas e a gasometria arterial, juntamente com o dano oxidativo, enzimas antioxidantes, nitratos totais, assim como a histologia através de hematoxilina e eosina do fígado e pulmão e picrosírius do fígado desses animais. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: CO – no qual foi simulado a cirurgia de ligadura de ducto biliar principal; LDB – no qual foi realizada a cirurgia de ligadura de ducto biliar principal; CO + NAC – no qual foi simulado a cirurgia de ligadura de ducto biliar principal e recebeu tratamento com NAC após o 14º dia da cirurgia; LDB + NAC – no qual foi realizada a cirurgia de ligadura de ducto biliar principal e recebeu tratamento com NAC após o 14º dia da cirurgia. A NAC foi administrada por via intraperitoneal, numa concentração de 10mg/Kg, durante 14 dias. Foi observado melhora nos parâmetros enzimáticos e gasométricos após o tratamento com a NAC. Constatou-se redução do dano oxidativo, verificado pelas substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), assim como as enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, que mostram-se com valores próximos ao do grupo controle após a administração da NAC. Na avaliação de nitratos totais, observou-se aumento na produção destes metabólitos no pulmão dos ratos cirróticos após o tratamento com NAC esses valores se equipararam ao grupo controle. Através da análise histológica, verificou-se nódulos de fibrose no tecido hepático e vasodilatação do tecido pulmonar, esses fenômenos foram revertidos após o uso da NAC. A partir desses dados, constatamos que a NAC mostra-se promissora no estudo das complicações hepáticas.

ABSTRACT

The present study was designed to investigate the potential antioxidant of N-acetylcysteine (NAC) on the hepatopulmonary syndrome, a complication of cirrhosis in the biliary cirrhosis based on bile duct ligation in rats. Male Wistar rats were used and their hepatic integrity was investigated through blood enzymes and arterial blood gases, together with oxidative injury, antioxidant enzymes, total nitrates, as well as histology using hematoxylin-eosin and picosirius of the liver and lung of those animals. Animals were divided in 4 experimental groups: CO - in which the surgery of the main biliary duct ligation was simulated; LDB - in which the surgery of the main biliary duct ligation was realized; CO + NAC - in which the surgery of the main biliary duct ligation was simulated and in which the animals were treated with NAC on day 14 after surgery; LDB + NAC - in which the surgery of the main biliary duct ligation was realized and in which the animals were treated with NAC after on day 14 after surgery. The NAC was administered intraperitoneally, at a concentration of 10mg/Kg, during 14 days. Improvement in the enzymatic parameters and arterial blood gases was observed after the treatment with NAC. Reduction of the oxidative damage was evidenced, verifying compounds that react to the thiobarbituric acid (TBARS), as well as antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, which showed values that are similar to the ones of the control group after the administration of NAC. Evaluation of total nitrate levels resulted in increased values in the production of these metabolites in the lung of the cirrhotic rats, which, after treatment with NAC, equalized with those values of the control group. The histological analysis demonstrated necrosis nodules in the liver and vasodilatation in the lung, which were reverted after the use of NAC. Based on the results we do conclude that NAC is a promising drug for the investigation of hepatic complications.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema da cirurgia experimental de ligadura de ducto biliar	18
FIGURA 2: Fisiopatologia da síndrome hepatopulmonar.....	26
FIGURA 3: Formação das EAO, a partir da redução do O ₂	30
FIGURA 4: Esquema da interação entre enzimas antioxidantes.....	35
FIGURA 5: Fórmula química da N-acetilcisteína.....	38
FIGURA 6: Valores médios da saturação da hemoglobina.....	61
FIGURA 7: Valores médios de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) no fígado dos diferentes grupos estudados.....	62
FIGURA 8: Valores médios de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico TBA-RS no pulmão dos diferentes grupos estudados.....	63
FIGURA 9: Valores médios da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no fígado dos diferentes grupos estudados.....	64
FIGURA 10: Valores médios da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no pulmão dos diferentes grupos estudados.....	65
FIGURA 11: Valores médios da atividade da enzima catalase (CAT) de fígado nos diferentes grupos estudados.....	66
FIGURA 12: Valores médios da atividade da enzima catalase (CAT) de pulmão dos diferentes grupos estudados.....	66
FIGURA 13: Valores médios da atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) no fígado dos diferentes grupos estudados.....	67
FIGURA 14: Valores médios da atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) no pulmão dos diferentes grupos estudados.....	68

FIGURA 15: Valores de nitratos totais no homogeneizado de fígado dos diferentes grupos estudados.....	69
FIGURA 16: Valores de nitratos totais no homogeneizado de grupos dos diferentes grupos estudados.....	69
FIGURA 17. Fotomicrografia de fígado de animais do grupo controle (CO+NaCl)...	70
FIGURA 18. Fotomicrografia de pulmão de animais do grupo controle (CO+NaCl)..	71
FIGURA 19. Fotomicrografia de figado de animais do grupo cirrótico (LDB+NaCl)..	71
FIGURA 20. Fotomicrografia de pulmão de animais do grupo cirrótico (LDB+NaCl)	72
FIGURA 21. Fotomicrografia de fígado de animais do grupo cirrótico tratado com NAC (LDB+NAC).....	73
FIGURA 22. Fotomicrografia de pulmão de animais do grupo cirrótico tratado com NAC (LDB+NAC).....	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Valores médios de enzimas plasmáticas: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transferase (γ GT) e fosfatase alcalina (FA).....	57
TABELA 2: Valores médios do peso do fígado, da relação hepatossomática, do peso do pulmão e da relação pneumossomática.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

γ GT	Gama-glutamil-transferase
pH	Potencial de hidrogênio
μ L	Microlitros
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlet
ALT	Alanina-aminotransferase
AST	Aspartato-aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CCl_4	Tetracloroeto de carbono
Cu^+	Íon cobre
e^-	Elétron
EAO	Espécies ativas de oxigênio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
ET-1	Endotelina 1
FA	Fosfatase alcalina
Fe^+	Íon ferro
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H^+	Íon hidrogênio
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HO_2^\bullet	Radical hidroperoxil
HOCl	Ácido hipocloroso
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível

LDB	Ligadura de ducto biliar
LPO	Lipoperoxidação
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	miligrama
mL	mililitro
NAC	N-acetilcisteína
NADPH	Fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo
Nm	namomôtro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OCl ⁻	Ânion hipoclorito
OH [•]	Radical hidroxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PO ₂	Pressão parcial de oxigênio
PCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
POD	Piruvato oxidase
ROO.	Radical peroxil
SatO ₂ /Hb	Saturação de oxigênio
SHP	Síndrome Hepatopulmonar
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbiturico
TBA-RS	Substâncias que Reagem ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TNF- α	Fator necrose tumoral α
U	Unidade

INTRODUÇÃO

As doenças hepáticas crônicas são de alta prevalência e incidência em todo o mundo, e as causas mais freqüentes relacionam-se ao vírus da hepatite B e C, ao alcoolismo, a doenças auto-imunes, a alterações metabólicas, tóxicas ou colestáticas. As cirroses colestáticas compreendem aquelas nas quais um impedimento funcional ou mecânico ao fluxo biliar e são chamadas cirroses biliares.

A cirrose biliar é uma enfermidade crônica e difusa do fígado com alterações da estrutura e função, seja intra ou extra-hepática, da árvore biliar (GONZÁLEZ-GALLEGO et al., 1998).

Essa doença é acompanhada pela dificuldade de eliminação da bÍlis, da destruição do parênquima hepático e de fibrose progressiva (ROJKIND e PONCENOYOLA, 1982). A cirrose biliar primária se caracteriza pela inflamação crônica e pela obstrução fibrótica dos ductos biliares intra-hepáticos. A cirrose biliar

secundária é consequência da obstrução mantida das vias biliares extra-hepáticas de maior calibre (PODOLSKY e ISSELBACHER, 1991).

A obstrução crônica da via biliar extra-hepática pode determinar a estase biliar e áreas focais de necrose centrolobular, necrose periportal, proliferação e dilatação dos ductos e canalículos biliares dos espaços porta, colangite estéril ou infecciosa com infiltração de polimorfonucleares, edema e fibrose dos espaços porta. Como em outras formas de cirrose, a lesão é acompanhada de fenômenos degenerativos e regenerativos do parênquima residual, com a formação de nódulos (ABDEL-AZIZ et al., 1990).

A cirrose biliar secundária ocorre em resposta à obstrução total ou parcial, prolongada, da árvore biliar. Acredita-se que um período de obstrução de 6 meses seja suficiente para induzir fibrose e cirrose. No entanto, geralmente ocorre após 1 ano de obstrução (FRIEDMAN et al., 2004).

Em crianças, a atresia biliar e a fibrose cística são as principais causas de cirrose biliar secundária. Em adultos, as causas mais freqüentes são coledocolitíase, estenoses benignas ou malignas da via biliar, cistos de colédoco, trauma pós-cirúrgico da via biliar, pancreatite crônica, tumores pancreáticos e colangite esclerosante primária (FRIEDMAN et al., 2004; SANJAY et al., 2004)

A colestase é uma manifestação comum em enfermidades crônicas do fígado e, quando, prolongada, pode representar importante causa de dano hepático, com acúmulo de ácidos biliares tóxicos, que têm papel fundamental na necrose e fibrose hepáticas (PAROLA et al., 1996).

Estudos prévios demonstraram que a indução de cirrose biliar secundária, através da ligadura de ducto biliar (LDB) (FIGURA 1), estabelecida por Kontouras e colaboradores, em 1984, simula a doença humana pelas alterações decorrentes, provenientes da reação inflamatória causada pelo refluxo biliar, e a desorganização da arquitetura natural do parênquima, com áreas inflamatórias e de deposição de colágeno e fibrose (PASTOR et al., 1997).

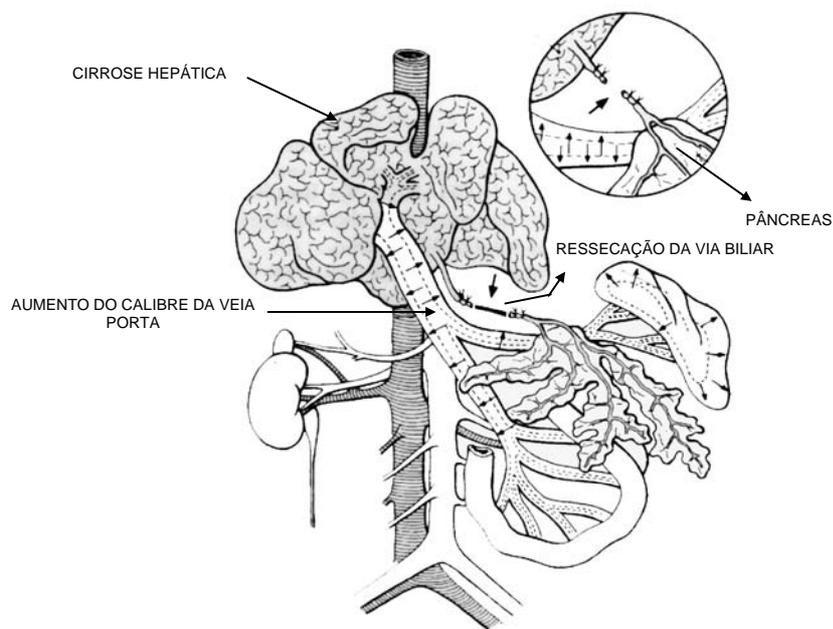


FIGURA 1: Esquema da cirurgia experimental de LDB (FERNANDES e MIES, 1998).

1.1 CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA

A cirrose biliar secundária é uma complicação tardia da obstrução prolongada das vias biliares extra-hepáticas, ocorre em menos de 10% dos pacientes, mais freqüentemente em obstrução biliar benigna do que por neoplasia, pela curta sobrevivência dos pacientes neoplásicos. Por outro lado, ocorre mais em obstruções benignas não infectadas do que nas infectadas, pelo maior grau de obstrução no primeiro caso. A infecção das vias biliares, parece acelerar a formação da cirrose. A duração da obstrução para o desenvolvimento da cirrose é, em geral, superior a um ano, embora, em circunstâncias menos freqüentes, possa a mesma ser observada após 3 a 4 meses (SILVA e D'ALBUQUERQUE, 1986).

O extravasamento da bile dos canalículos biliares intralobulares em zonas de necrose periportal dá lugar à formação de "lagos biliares" e de fenômenos regenerativos no parênquima residual, com a formação de nódulos. A eliminação da obstrução costuma ser acompanhada de melhoria bioquímica e morfológica (ROJKIND et al., 1982).

O dano hepático colestático é uma característica da cirrose biliar secundária e se define com critérios histopatológicos específicos e bioquímicos bem estabelecidos. A citotoxicidade dos ácidos biliares é atribuída a diversos mecanismos, incluindo as suas propriedades detergentes, a alteração da homeostase do Ca^{++} intracelular, a depleção de ATP e ao dano mitocondrial.

Trabalhos recentes sugerem que na patogênese do dano colestático hepático participam as espécies ativas de oxigênio e reações de radicais livres (PAROLA et al., 1996; PASTOR et al., 1997; ORELLANA et al., 2000).

1.2 SÍNDROME HEPATOPULMONAR

A SHP tem sido freqüentemente definida como uma tríade que consiste em doença hepática, aumento do gradiente alvelo-capilar no ar ambiente e dilatações vasculares intrapulmonares na ausência de doença pulmonar ou cardíaca coexistente, as quais podem resultar em concentrações arteriais de oxigênio abaixo da normalidade, levando a alterações sistêmicas (KROWKA e CORTESE, 1990).

Doenças crônicas do fígado podem levar a disfunções sobre o sistema cardiovascular e pulmonar, com alterações hemodinâmicas que incluem aumento do débito cardíaco, baixa resistência vascular e vasodilatação (NELSON et al., 2001). A hipertensão portal, a encefalopatia hepática e o desenvolvimento de ascite são complicações secundárias dos distúrbios hemodinâmicos que ocorrem na presença de hepatopatias (BIMBI et al., 1998).

As conseqüências hemodinâmicas das doenças do fígado, na circulação sistêmica e pulmonar, incluem ainda a insuficiência cardíaca causada por *shunt* arteriovenoso hepático, hipertensão pulmonar plexogênica, cardiomiopatia e síndrome hepatopulmonar (NASCHITZ et al., 2000).

O primeiro relato de uma interação entre doença de fígado e pulmão foi em 1884, quando uma mulher jovem com cirrose apresentava cianose e hipocratismo digital, na ausência de doença pulmonar ou cardíaca. Snell, em 1935, descreveu hipoxemia em uma situação de hepatopatia. Rydell e Hoffbauer, em 1956, documentaram a presença de fístulas arteriovenosas e *shunt* em um paciente com cirrose juvenil. Esses achados caracterizam o que atualmente é definido como SHP (ABOUSSOUN e STOLLER, 2000).

Kennedy e Knudson, em 1977, relataram um caso de circulação hiperdinâmica e ortodeóxia, agravados pelo exercício associados à cirrose. Eles foram os primeiros a utilizar o termo de SHP, em analogia à síndrome hepatorenal.

Os pacientes com hepatite crônica podem apresentar sinais e sintomas como hemorragia digestiva, encefalopatia porto-sistêmica, ascite, eritema palmar e esplenomegalia (AUGUSTI et al., 1990). Alguns deles, 10 a 20%, apresentam dispnéia, platipnéia (dispnéia em ortostase), ortodeóxia (queda da saturação de oxigênio em ortostase), hipocratismo digital e cianose (KROWKA et al., 1993).

A baixa resistência vascular pulmonar e a baixa pressão arterial pulmonar estão presentes, devido às vasodilatações intrapulmonares, promovendo uma baixa tensão no leito vascular pulmonar (LEE, 1989).

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

A fisiopatologia da hipoxemia na SHP é multifatorial. Os mecanismos predominantes incluem *shunt* intrapulmonar, comprometimento da relação ventilação-perfusão, baixa difusão, desequilíbrio da difusão-perfusão ou do gradiente de oxigenação alvéolo-capilar (ABOUSSOUN e STOLLER, 2000).

O desequilíbrio entre a difusão-perfusão é um mecanismo que pode explicar a hipoxemia na SHP. Esse mecanismo pode ser responsável pela alteração do gradiente de oxigenação alvéolo-capilar ou efeito *shunt* e relaciona a hipoxemia com as dilatações vasculares pulmonares. No capilar dilatado, e com um diâmetro maior, a molécula de oxigênio vinda do alvéolo não pode difundir-se até o centro do vaso. Essa anormalidade na difusão-perfusão traduz a dificuldade do oxigênio em saturar as hemácias em um capilar pulmonar anormalmente dilatado, evidenciando o efeito *shunt* funcional. O *shunt* funcional ocorre devido à diminuição da difusão do oxigênio através da membrana alvéolo-capilar, uma consequência da anormalidade de perfusão que acomete o pulmão de pacientes cirróticos (GARCIA et al., 1998).

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

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

Atualmente, a atenção é focada sobre a função vasodilatadora do NO, como fator vasoativo responsável pela vasodilatação pulmonar. Muitas pesquisas reforçam essa idéia, e muitos estudos têm demonstrado a ação do NO na interação fígado-pulmão (MATSUMOTO et al., 1995; ROLLA et al., 1997; BRUSSINO et al., 2003).

Em modelos experimentais foi demonstrada a ação vasodilatadora do NO, e o aumento da NO sintase endotelial (eNOS) e pulmonar estaria relacionado à hipoxemia (FALLON et al., 1997; ROLLA et al., 2003; DINH-XUAN e NAEJIE; 2005). Eles sugerem a ação do NO como o responsável pela vasodilatação intrapulmonar encontrada na SHP. Novos estudos devem ser realizados para uma melhor compreensão dos mediadores causadores da SHP.

1.3 SHP EXPERIMENTAL

Devido ao desenvolvimento da ciência e da pesquisa experimental, é possível, atualmente reproduzir as alterações histológicas, as bioquímicas, as renais e as neurohumorais de diversas doenças, sem trazer riscos de manipulação ao investigador (CLÀRIA e JIMÉNEZ , 1992).

A obstrução prolongada do ducto biliar em ratos é um modelo experimental para induzir cirrose biliar secundária em torno de vinte e oito dias (KOUNTOURAS, 1984). Nesse período, a obstrução provoca dilatação do ducto biliar, edema e reações inflamatórias agudas pelo refluxo biliar. A fibrose periportal, devida a alterações na síntese e degradação de proteínas matriciais como colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos, causa desorganização da arquitetura natural do parênquima (ROJKIND, 1982).

Em ratos com cirrose biliar secundária, provocada pela obstrução do ducto biliar, observam-se hepatomegalia e esplenomegalia, que acontecem principalmente pelo aumento do tecido conjuntivo e do epitélio biliar. Paralelamente pode ocorrer a hipertensão portal que se manifesta pela dilatação das veias esplênicas. (YAARI et al., 1992).

Em 1992, Chang e O'Hara demonstraram que animais submetidos à ligadura de ducto biliar apresentavam desenvolvimento progressivo de anormalidades nas

trocas gasosas similares àquelas encontradas em humanos com SHP. Esses mesmos autores, em 1993, encontraram aumento do nível de glucagon circulante em animais com cirrose biliar secundária experimental e sugeriram que esses animais apresentavam estado circulatório hiperdinâmico devido à ação vasoativa deste hormônio (CHANG e OHARA, 1992; CHANG e OHARA, 1993).

A pesquisa sobre o modelo de ligadura de ducto biliar foi se aprofundando, e, em 1997, Fallon e colaboradores estabelecem a ligadura de ducto biliar como um modelo para o estudo da SHP, com os animais cirróticos de 5 semanas apresentando hipoxemia e vasodilatação intrapulmonar. O gradiente alvéolo-capilar apresenta diferença superior a 100% e é acompanhado de hipoxemia, com valores inferiores à 85 mmHg, quando comparados ao grupo controle. Esses achados foram associados à vasodilatação intrapulmonar, atribuída aos elevados valores de eNOS no homogeneizado de pulmão (FALLON et al., 1997).

Os estudos que envolvem o modelo de ligadura de ducto biliar como modelo de SHP identificaram uma seqüência de alterações moleculares na vasculatura pulmonar que influenciaria o tônus vascular durante a progressão dessa doença (FIGURA 2). Tem-se dado grande importância ao papel da endotelina 1 (ET-1), devido sua elevada produção pelas células estreladas do fígado e grande concentração plasmática, como um mediador das alterações endoteliais e a progressão da vasodilatação intrapulmonar. O aumento da produção hepática e circulante de ET-1 está relacionado à produção de eNOS que poderia estar

relacionada à gravidade das anormalidades nas trocas gasosas e à vasodilatação (LUO et al., 1998; LUO et al., 2004).

Um grupo de pesquisadores franceses relacionam o aumento de NO com a translocação bacteriana, que ocorre em 45-75% dos animais cirróticos induzidos experimentalmente. Essa translocação bacteriana favorece a entrada de bactérias e endotoxinas na circulação pulmonar, gerando acúmulo de macrófagos no endotélio, os quais secretam produtos para o meio extracelular, incluindo citocinas e NO, que, em altas quantidades, tornam-se uma fonte altamente tóxica e oxidante (THANNICKAL e FANBURG, 2000; RABILLER et al., 2002).

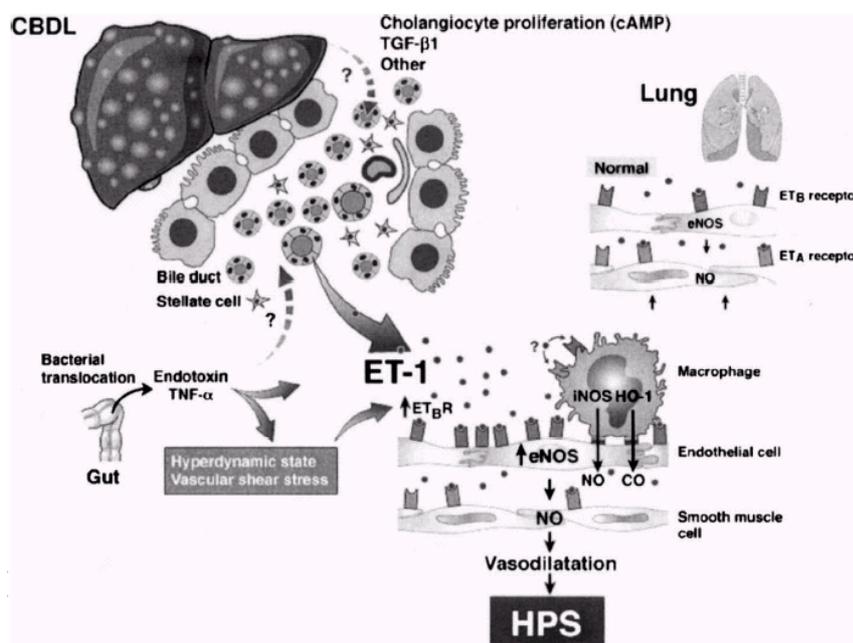


FIGURA 2: Fisiopatologia da SHP (FALLON, 2005).

As células fagocitárias geram ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que é capaz de oxidar a membrana plasmática, produzindo grande quantidade de espécies ativas do oxigênio (EAO), e quando combinado com NO pode formar peroxinitritos, um potente e versátil oxidante que pode atacar tecidos biológicos, promovendo danos por estresse oxidativo (THANNICKAL e FANBURG, 2000).

Foi demonstrado que animais cirróticos por ligadura de ducto biliar apresentavam hipoxemia e aumento da lipoperoxidação em homogeneizado de pulmão, provavelmente devido à ação oxidativa de radicais livres e do NO em altas concentrações na circulação pulmonar (TIEPPO e VERCELINO, 2003).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

A molécula de oxigênio, em seu estado natural é um birradical, possui dois elétrons desemparelhados e, dessa forma age como um bom agente oxidante e pode oxidar outros átomos ou moléculas (LLESUY, 2002).

O oxigênio é elemento indispensável para a vida, no entanto, é portador de um paradoxo, pois age como oxidante e, por ser tóxico quando exposto em concentrações elevadas maiores que as da atmosfera, pode gerar danos reversíveis ou irreversíveis, levando até a morte celular (LLESUY, 2002).

Esse efeito lesivo do oxigênio sobre organismos aeróbios varia consideravelmente, com a espécie do organismo, de idade, do estado fisiológico e da dieta. Os diferentes tecidos de um mesmo animal podem ser afetados de formas diferentes (FARBER et al., 1990). A lesão ocorre devido à elevada produção de radicais livres ou de espécies ativas de oxigênio (EAO).

O radical livre é uma espécie capaz de existir de forma independente e contém um ou mais elétrons desemparelhados, conferindo a esta espécie uma grande reatividade (PRYOR, 1976; DEL MAESTRO, 1980). Tais radicais podem ser formados em situações fisiológicas ou patológicas e são danosos às células do organismo quando produzidos em grandes quantidades (PERES, 1994).

Os radicais livres podem ser pequenos como a hidroxila, ou grandes e complexos, com átomos de carbono e cadeias laterais. Nem todas as formas que reagem para formar radicais livres têm número desemparelhado de elétrons. Esse grupo denomina-se EAO, e são formados pelo ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil (OH^{\bullet}), radical peroxil (ROO.), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion hipoclorito (OCl^-) e oxigênio *singlet* (1O_2) (PERES, 1994; YUNGSON, 1995; LESSUY, 2002).

As EAO podem ser formadas durante o metabolismo normal de qualquer célula através da perda de elétrons de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por não-radical (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

As EAO são moléculas intermediárias, parcialmente reduzidas, que participam do mecanismo de oxi-redução do oxigênio no metabolismo celular. A geração das EAO ocorre durante os processos de oxidação biológica, dentre os quais, podemos destacar a respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa, para formação de ATP na mitocôndria. O oxigênio (O_2) é reduzido até água (H_2O), recebe quatro elétrons de uma só vez pela citocromo oxidase, e devido a sua configuração eletrônica, tem forte tendência a receber um elétron de cada vez, gerando compostos intermediários altamente reativos (FIGURA 3). Desses compostos intermediários, destacam-se o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}). A formação dessas moléculas ocorre em 5% de todo o processo de redução do oxigênio até água. Algumas das EAO são fortemente oxidantes e apresentam pelo menos um elétron desemparelhado, geralmente no orbital mais externo, e são denominadas de radicais livres. Ainda se deve relatar o estado excitado do oxigênio denominado de "singlet", que também pode causar danos à célula (DEL MAESTRO, 1980; MENEGHINI, 1987; YU, 1994, LESSUY, 2002).

A formação desses compostos é estabelecida pela perda ou ganho de um elétron como, por exemplo, na fissão homolítica de uma ligação covalente, em que cada um dos átomos fica com um elétron desemparelhado. Cabe ressaltar que o oxigênio molecular é um birradical, embora sua reatividade seja baixa porque seus

dois elétrons desemparelhados tem “spins” paralelos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; YU, 1994).

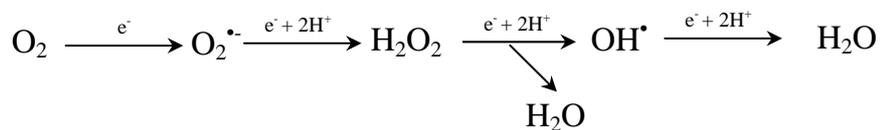


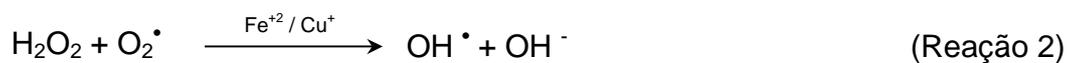
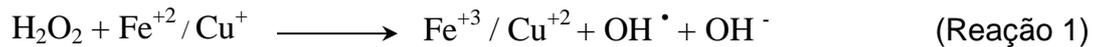
FIGURA 3: Formação das EAO, a partir da redução do O₂.

O ânion superóxido (O₂^{•-}) é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio à água e, a partir dele, são formadas as demais EAO. A sua dismutação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (YU, 1994).

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é o segundo intermediário do processo oxidativo, pode ser produzido, indiretamente, pela redução univalente do oxigênio, seguida da dismutação do ânion radical superóxido e/ou diretamente, pela redução bivalente do oxigênio molecular. Apesar de não ser um radical livre, essa espécie ativa pode originar o radical hidroxil (OH[•]), o que é bastante prejudicial à célula (DEL MAESTRO, 1980).

O radical hidroxil (OH[•]), por sua vez, é um dos mais potentes oxidantes em sistemas biológicos. Esse radical livre possui a capacidade de atravessar as membranas e reagir com biomoléculas, como lipídios insaturados e DNA, apesar de seu baixo tempo de meia vida (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Sua formação pode se dar de acordo com a reação de Fenton (1894) (Reação 1), reação do

peróxido de hidrogênio com íons de ferro ou de cobre, e a reação de Haber-Weiss (1934) (Reação 2), reação do peróxido de hidrogênio com o ânion radical superóxido na presença de íons metálicos (YU, 1994).



Os radicais livres podem desencadear o processo de lipoperoxidação (LPO) e conduzir ao dano celular (KANNER e HAREL, 1985). A LPO consiste em reações em cadeia, nas quais as EAO atacam moléculas orgânicas (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 1999).

A LPO é a autooxidação das cadeias laterais dos ácidos graxos polinsaturados mediante a abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metileno (Fase de Iniciação). Após essa fase, forma-se um radical lipídio-carbono que reage com a cadeia lateral do ácido graxo polinsaturado adjacente (Fase de propagação). Dessa forma, um evento inicial pode desencadear vários ciclos de auto-oxidação, suficientes para alterar a função da membrana, interrompendo a ação sobre a permeabilidade seletiva, causando descontrole na entrada e saída de ânions, comprovado pela perda de fluidez (LLESUY, 2002).

1.5 SISTEMA ANTIOXIDANTE

Na vida aeróbica, o oxigênio é tão essencial quanto deletério para função celular, por isso tem ampla variedade de mecanismos de defesa antioxidante para proteger o organismo (MARRONI, 2002). A palavra antioxidante pode ser definida como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações – comparadas àquelas de um substrato oxidável – atrasa significativamente ou impede a oxidação daquele substrato (o termo oxidável, inclui macromoléculas tais como proteínas, lipídios, hidrato de carbono e DNA). A função dos antioxidantes é manter os níveis intracelulares de EAO em concentrações de estado estacionário baixos. Define-se como estado estacionário a situação em que a velocidade de formação de uma EAO é igual a velocidade de decaimento da mesma (HALLIWELL, 1999).

O sistema antioxidante é constituído por componentes enzimáticos e não-enzimáticos, que atuam conjuntamente na proteção celular. O sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio. Existem, também, as defesas secundárias que impedem a propagação da lipoperoxidação e as terciárias, enzimas de reparo de danos já instalados (YU, 1994).

Quando a substância neutraliza as EAO na fase de iniciação ou propagação da LPO e forma um composto menos reativo, é chamada de "scavenger". Ao passo que, se a substância antioxidante tiver a propriedade de absorver a energia de

excitação dos radicais, neutralizando-os, é denominada de "quencher" (SIES e MURPHY, 1991; HALLIWELL, 1997).

Os antioxidantes podem atuar em distintos níveis:

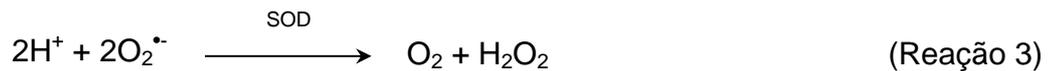
- prevenindo a formação de EAO, impedindo, inibindo ou interrompendo as reações que geram radicais livres porque podem unir-se aos metais iônicos necessários para catalisar os mesmos;
- interceptando as EAO ou seus precursores;
- reparando as macromoléculas danificadas;
- regulando a produção de defesas antioxidantes endógenos.

A ação protetora ou o mecanismo de ação dos antioxidantes depende de qual espécie ativa foi gerada, de que forma essa espécie foi gerada e onde a espécie ativa foi gerada (HALLIWELL, 1999).

1.6 SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO

O sistema antioxidante enzimático é formado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), e elas desempenham papel específico no controle do balanço oxidativo.

A SOD forma um grupo de enzimas que catalisa a reação de dois ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$) com conseqüente formação de peróxido de hidrogênio (Reação 3), que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas.



A SOD é classificada em três tipos distintos: SOD cobre e zinco (CuZnSOD), presente no citoplasma das células de eucariontes; SOD manganês (MnSOD), localizada na matriz mitocondrial e SOD ferro (FeSOD) que ocorre em bactérias (YU, 1994).

Outra enzima importante é a CAT, no qual o peróxido de hidrogênio, formado na dismutação do ânion superóxido, é transformado em água e oxigênio por ação desta enzima (Reação 4). Esta, por sua vez, tem uma ação muito específica, já que atua em reações com peróxidos de hidrogênio, metila e etila.



A glutathiona peroxidase (GPx) é uma enzima que catalisa a decomposição de peróxido inorgânico e peróxidos orgânicos (FLOHÈ, 1973) (Reação 5)



1.7 SISTEMA ANTIOXIDANTE NÃO-ENZIMÁTICO

Os antioxidantes não-enzimáticos atuam da mesma forma que os enzimáticos, evitam a cascata de perpetuação da LPO, protegem a célula contra o dano oxidativo. Os principais defesas não-enzimáticas são a glutathione (GSH), o ácido ascórbico (vitamina C), α - tocoferol (vitamina E), o β - caroteno e os flavonóides.

A GSH é um tripeptídeo de ácido α -glutâmico, cisteína e glicina e atua como co-substrato para GPx. Uma alta concentração de GSH intracelular protege a célula contra a ação de EAO. A sua ação mais importante é a proteção que exerce frente as EAO, geradas durante o metabolismo normal da célula. O GSH pode reagir por via não-enzimática com estas espécies.

O α - tocoferol é uma vitamina lipossolúvel que possui propriedades antioxidantes. Essa vitamina protege as moléculas contra o ataque de oxidantes, mantendo as proteínas sulfidril na sua forma reduzida e também atuando como um “scavenger” de radicais peroxil. O α - tocoferol encontra-se em altas concentrações em muitos tecidos, em nível intracelular está associado às membranas ricas em lipídios, como as membranas mitocondriais e do retículo endoplasmático. Pode reagir

tanto com lipoperóxidos como com radicais alcoxilo, sendo protetor efetivo da peroxidação lipídica de membranas biológicas (BURTON e TRABER, 1990).

Temos também o β - caroteno que é um precursor da vitamina A e se acumula na membrana de certos tecidos. É um “*scavenger*” eficaz de $^1\text{O}_2$ e reage diretamente com radicais peróxido (BUETTNER, 1993). *In vivo* apresentam uma atividade antioxidante eficiente porque podem inibir a peroxidação lipídica induzida pelo sistema da xantina oxidase (KRINSKI, 1982).

A vitamina C é um composto hidrossolúvel que atua como substrato na biossíntese do colágeno, de catecolaminas e de carnitina. Atua como “*scavenger*” de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e $\text{OH}^{\bullet-}$ com a formação de um composto intermediário que vem reduzindo sucessivamente pela GSH (HALLIWELL, 1996)

O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas em humanos. HIWELL e WYNGARDE, em 1960, descobriram a atividade antioxidante do ácido úrico frente EAO. O papel *in vivo* do urato, preserva os níveis de ascorbato plasmático, provavelmente através da formação de complexos com metais de transição com Fe^+ e o Cu^+ (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

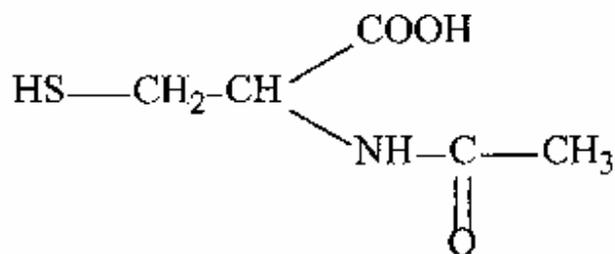
Sugere-se que os flavonóides possuam atividade antioxidante por protegerem os tecidos do dano oxidativo. Eles são um grupo de moléculas formadas pelo metabolismo secundário dos vegetais e são encontrados na maçã, laranja, pêra, uva,

melão e outros alimentos da dieta humana. Muitos trabalhos têm demonstrado a redução da fibrose em situações de cirrose biliar e hepática através da administração de flavonóides (PERES et al., 2000; PAVANATO et al., 2003) assim como da redução da hipertensão portal (MOREIRA et al., 2004).

1.8 N-ACETILCISTEÍNA

A N-acetilcisteína (NAC) é um composto tiólico em que contém um grupo sulfidril formado pela seguinte fórmula química $C_5H_9NO_3S$ (figura 5), seu peso molecular é igual a 163,2 (ZIMENT, 1988) e é amplamente usado na clínica médica.

FIGURA 5: Fórmula química da N-acetilcisteína.



A NAC é um mucolítico que teve suas primeiras aplicações no tratamento de doenças congestivas e obstrutivas pulmonares associadas à hipersecreção. A NAC também é usada no tratamento de intoxicação aguda por acetoaminofen e atualmente é utilizada no tratamento da síndrome da angústia respiratória no adulto e em casos de imunodeficiência adquirida na infecção por HIV (SARNSTRAND et al., 1995).

Sua ampla utilização é justificada pelo fato de que NAC possui propriedades antioxidantes e antiinflamatórias (COTGREAVE, 1997).

Sua atividade antioxidante é dada principalmente por dois mecanismos:

1 – reduzir diretamente o H_2O_2 e o $O_2^{\bullet-}$ a espécies menos reativas formando radicais sulfúricos ou cisteína;

2 – promover a biossíntese de GSH que funciona como “scavenger” de radicais livres ou como substrato no ciclo redox da glutatona (ARUOMA et al., 1989)

A NAC oferece proteção contra endotoxemia mediada pela administração de lipossacarídeo (LPS), observando diminuição de H_2O_2 , e isso estaria diretamente relacionado à sua capacidade de reduzir espécies ativas de oxigênio, mais do que à sua função de promover a biossíntese de glutatona (SPRONG et al., 1998).

Muitos trabalhos têm demonstrado os efeitos da NAC, principalmente modulando a atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (BERGAMINI et al., 2001), reduzindo a formação de citocinas inflamatórias e inibindo a ação de neutrófilos (BAKKER, 1994 e CUZZOCREA, 2000).

O fator de necrose tumoral α (TNF- α) e outras citocinas, assim como algumas EAO, alteram a atividade da NO sintase (NOS), o que provocaria as alterações hemodinâmicas em modelo de hipertensão portal pelo aumento da produção de NO. Antioxidantes contendo grupo tiol, como a NAC, inibem a indução de NOS através do TNF- α , prevenindo o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica provocada pelo aumento da produção NO mediada por citocinas (BIMBI et al., 1998).

As EAO também estão envolvidas nos processos de apoptose em muitos tipos celulares. Estudos têm demonstrado que o radical $O_2^{\bullet-}$ inicia a apoptose nas células hepG2 e que nessas situações, a NAC atua como “scavenger” de radicais livres, inibindo o estresse oxidativo e evitando a morte celular (KIM et al., 2004).

A intoxicação por acetoaminofen leva à hepatotoxicidade através de ativação de vários mediadores, como as interleucinas 1 e 6, estresse oxidativo pela ação de peroxinitritos, que se dá pela combinação do NO e o radical $O_2^{\bullet-}$, um composto altamente lesivo das membranas celulares, e através da ativação outras citocinas. Quando a NAC é administrada, observa-se aumento da sobrevivência e redução do dano hepático (JAMES et al., 2003).

O uso da NAC foi eficaz no tratamento de ratos cirróticos induzidos por ligadura de ducto biliar, na redução da pressão portal e fibrose hepática (BRAVO et

al., 1997) mostrando ser uma forma eficaz para minimizar os efeitos secundários das doenças hepáticas em modelos animais, como nas situações de mudanças hemodinâmicas (HARRINSON et al., 1991), funcionando igualmente como "*scavenger*" de radicais livres, bem como ocorreu no mesmo modelo, utilizando a quercetina e a rutina, que são dois flavonóides, na avaliação do tecido hepático, no qual foi observado diminuição estresse oxidativo e no dano hepático (BRAVO et al., 1997; PERES et al., 2000; DA SILVA et al., 2002).

Tendo em vista essas considerações, temos como objetivo avaliar o tecido pulmonar de ratos cirróticos por ligadura de ducto biliar frente ao uso de uma droga antioxidante, a NAC, na tentativa de proteger o tecido hepático e observar as alterações no tecido pulmonar nesse modelo animal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o possível potencial antioxidante da N-acetilcisteína sobre as alterações hepáticas e pulmonares no modelo de Síndrome Hepatopulmonar por ligadura do ducto biliar principal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir cirrose biliar secundária por ligadura do ducto biliar principal em ratos.
- Verificar a integridade hepática através da análise das transaminases (AST e ALT), gama glutamil transferase (γ GT) e fosfatase alcalina (FA).
- Estabelecer as alterações hepatossomáticas e pneumossomáticas dos animais estudados.
- Medir a gasometria arterial.
- Avaliar a lipoperoxidação do tecido hepático e pulmonar através do método de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico.

- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) em homogeneizado de pulmão e fígado.
- Medir os Nitritos e Nitratos em tecido hepático e pulmonar.
- Avaliar as alterações anatomopatológicas do tecido hepático e pulmonar por hematoxilina e eosina e picrossírios.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Este estudo tem caráter experimental qualitativo - quantitativo, e para isso, foi realizada a simulação da cirrose biliar secundária por ligadura de ducto biliar.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos Wistar, com peso entre 200 e 300 gramas, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Os animais foram mantidos no Biotério de Farmacologia durante o experimento, em caixas plásticas de 47x34x18cm forradas com maravalha, em ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura entre 20 e 25°C. A água e a ração forão administradas *ad libitum*.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL:

O modelo utilizado foi de cirrose biliar secundária através de ligadura de ducto biliar principal, e dividido em quatro grupos:

- I. **Controle (CO+NaCl)** - Grupo submetido à cirurgia simulada, sem a ligadura do ducto biliar principal;
- II. **Controle + NAC (CO + NAC)** - Grupo submetido a cirurgia simulada, sem a ligadura do ducto biliar principal e, após o 14º dia de pós-operatório, recebeu N-acetilcisteína;
- III. **Indução de cirrose por ligadura de ducto biliar (LDB+NaCl)** - Grupo submetido à cirurgia, tendo o seu ducto biliar ligado;
- IV. **Indução de cirrose por ligadura de ducto biliar tratado com a N-acetilcisteína (LDB+NAC)** - Grupo submetido à cirurgia, tendo o seu ducto biliar ligado e, após o 14º dia de pós-operatório, recebeu N-acetilcisteína.

3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.4.1 Desenvolvimento do Modelo de Síndrome Hepatopulmonar por Ligadura de Ducto Biliar

O processo iniciou com a anestesia do animal mediante a administração de fármacos anestésicos e posicionamento do mesmo para cirurgia. Foi utilizada uma mistura de Cloridrato de Xilazina 2% 50mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de

Cetamina 100mg/Kg de peso corporal intraperitonealmente. A intervenção cirúrgica iniciou com uma laparotomia ventral média, seguida de uma dissecação do ducto biliar na altura da desembocadura dos ductos pancreáticos, ligando-se por meio de dois nós para posterior secção entre eles. A cavidade abdominal foi fechada com pontos individuais em “U” no plano cutâneo, e o peritônio e a camada muscular abdominal foram fechadas com pontos contínuos. Os animais se recuperaram da anestesia sob lâmpada para aquecimento corporal, antes de serem devolvidos às condições padrão do experimento. Os animais do grupo controle sofreram a simulação da ligadura de ducto biliar. Após 28 dias os animais foram sacrificados.

3.4.2 Administração da droga

No 14^o dia de LDB, os animais começaram a receber a N-acetilcisteína diariamente, em dose de 10mg/Kg por via intraperitoneal. A N-acetilcisteína foi previamente dissolvida em Cloreto de Sódio e administrada nos animais CO + NAC e LDB + NAC. Os animais do grupo CO e LDB recebiam Cloreto de Sódio no mesmo volume.

3.5 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E ANÁLISES DO SANGUE

Transcorridos os vinte oito dias do desenvolvimento do modelo e do tratamento, os animais foram novamente pesados e anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilasina (10 mg/kg).

O sangue foi coletado pela técnica da punção de plexo veno retro-orbital com tubo capilar de vidro. Esse sangue foi utilizado para avaliar integridade hepática por meio das análises de aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT), gama glutamil transferase (γ GT) e fosfatase alcalina (FA).

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

A AST catalisa a reação do α -cetogluturato e do ácido alanín sulfínico a piruvato e glutamato. A ALT catalisa a reação do α -cetogluturato e alanina a piruvato e glutamato. O piruvato se hidrolisa a acetilfosfato, após a ação do piruvato oxidase (POD), anidrase carbônica e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em presença de POD, o H_2O_2 oxida a forma reduzida incolor do indicador à forma azul.

A γ -glutamil-transferase catalisa a transferência do grupamento glutamil do substrato L-glutamil p-nitroanilida para a glicilglicina com a formação de p-nitroanilina, uma substância cromogênica que pode ser medida espectrofotometricamente. A atividade da enzima foi obtida pela determinação da média das diferenças de extinção, calculada através de um fator, o qual varia de acordo com os reagentes utilizados. O método utilizado para o exame foi o cinético automatizado.

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

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

Após a coleta de sangue, a retirada do fígado e dos pulmões, os animais anestesiados foram sacrificados por exanguinação.

O fígado e os pulmões foram pesados, sendo, posteriormente, separados em duas partes. Uma parte foi congelada a -70°C , e a outra parte colocada em *bouin* para posterior análise histológica. Com os pesos do fígado realizou-se a relação hepatossomática, e, com os pesos do pulmão, a relação pneumossomática.

3.6 AVALIAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)

3.6.1 Preparo dos homogeneizados

Para homogeneizar o fígado e o pulmão, foram colocados 9 mL de tampão fosfato (KCL 140 mM, fosfato 20 mM; pH 7,4) por grama de tecido. A homogeneização foi realizada em um aparelho

Ultra-Turrax (IKA-WERK) durante 40 segundos, à temperatura de 0 a 4° C. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado em uma centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) por 10 min a 3000 rpm (1110 x g). O precipitado foi desprezado, e o sobrenadante retirado e congelado em freezer à temperatura de -70 °C para posteriores dosagens.

3.6.2 Dosagem de Proteína

A concentração de proteínas no homogeneizado de pulmão e fígado foram determinadas utilizando, como padrão, uma solução de albumina bovina 1mg/mL (utilizaram-se volumes de 50, 100 e 150 µL). Colocou-se uma alíquota do homogeneizado (20µL) em 780 µL de água destilada e 2,0 mL do reativo C que era preparado com 50 ml de NaHCO₃, 0,5 mL do reativo B1 (CuSO₄.H₂O 1%) e 0,5 mL do reativo B2 (tartarato de sódio e potássio 2%). Após a adição do reativo C, aguardaram-se 10 minutos e colocou-se 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteu diluído na proporção 1:3 em água destilada. Após 30 minutos, realizou-se a medida em espectrofotômetro a 625 nm (LOWRY et al. 1951).

3.6.3 Determinação das Substâncias que reagem ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Foi determinada a lipoperoxidação através do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). A técnica de TBA-RS consiste no aquecimento do material homogeneizado na presença de ácido tiobarbitúrico e

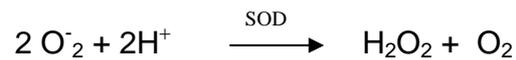
conseqüente formação de um produto de coloração rósea, medido em espectrofotômetro a 535nm. O aparecimento de coloração ocorre devido à presença do malondialdeído e outras substâncias proveniente da peroxidação lipídica no material biológico.

Foram colocados em tubo de ensaio, nesta ordem de adição, 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%, 0,25mL de água destilada, 0,75mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 0,25mL do homogeneizado. O TBA reagiu com produtos da lipoperoxidação formando uma base de Schiff, e o TCA teve função de desnaturar as proteínas presentes, além de acidificar o meio de reação. A seguir, agitava-se cada tubo, os quais foram aquecidos à temperatura de 100° C durante 15 minutos. Após, os tubos eram resfriados, e acrescentava-se 1,5 mL de álcool n-butílico, para extrair o pigmento formado. Os tubos foram colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos e centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (1110 x g). Por último, o produto corado foi retirado e realizada a leitura em espectrofotômetro (CARY 3E – UV – Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 535nm. A concentração de TBA-RS foi expressa em nmoles/mg de proteína (BUEGE e AUST, 1978).

3.6.4 Determinação de Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade desta enzima é definida por sua capacidade para inibir um sistema de detecção que reage com o O_2^- .

A reação catalisada é a seguinte:



A técnica de medida da SOD foi baseada na inibição dessa reação. Para isto, utilizou-se adrenalina que, no meio alcalino, transformou-se em adrenocromo, produzindo O_2^- que é o substrato da enzima (MISRA e FRIDOVICH, 1972). Antes de realizar a determinação com o homogeneizado, faz-se a medida do meio de reação (glicina-NaOH 50 mM, pH 9,6) com 50 μ L de adrenalina (60 mM, pH 2,0), esta corresponde a 100% da reação. Essa mistura foi agitada e lida a 480 nm. Posteriormente, adicionam-se diferentes volumes do homogeneizado e mede-se a inibição da reação. A atividade enzimática foi expressa em unidades SOD/g de tecido (quantidade de SOD que inibe em 50% a velocidade de redução da adrenalina).

3.6.5 Determinação de Catalase

A enzima catalase catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, segundo a seguinte reação.



A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade enzimática e obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem com respeito ao peróxido de hidrogênio. O ensaio consiste em medir a diminuição da absorção a 240 nm (longitude de onda pela qual absorve o peróxido de hidrogênio).

A medida espectrofotométrica consistiu em colocar nas cubetas o meio de reação (solução reguladora de fosfato 50 mM) com distintas alíquotas da amostra. Depois, fez-se um gráfico com uma linha de base. Em seguida, adicionaram-se 20 µL de H₂O₂ 300 mM. A concentração foi expressa em pmol/g de tecido (BOVERIS e CHANCE, 1973).

3.6.6 Determinação da Glutathione Peroxidase (GPx)

A enzima catalisa a redução do H₂O₂, utilizando o GSH como um doador de hidrogênio.



A atividade da GPx pode ser estudada, medindo a velocidade de consumo de NADPH em um sistema que contenha GSH.



A técnica consistiu em determinar a atividade da enzima espectrofotometricamente, medindo-se a velocidade de oxidação de NADPH em uma mistura de reação. Em uma cubeta, foram colocados 500 μL de solução reguladora de fosfatos de potássio (100 mM, pH 7,0), 100 μL de H_2O bidestilada, 50 μL de Azida Sódica 20mM, com 50 μL de glutathiona reduzida (GSH) 40mM, 50 μL de glutathiona redutase (GR) e 50 μL NADPH. Essa mistura foi encubada durante 3 minutos, e logo após se adicionaram 100 μL de amostra diluída e 100 μL de H_2O_2 . As amostras foram lidas a 340 nm . A atividade foi expressa em nmol/min/mg de proteína (FLOHÉ e GUNZLER, 1984).

3.7. MEDIDA DE NITRITOS E NITRATOS

O NO é uma substância extremamente lábil, com uma meia vida de apenas alguns segundos em sistemas biológicos. Desta forma a medida do NO faz-se de forma indireta, através da medida de nitritos e nitratos.

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

Para realizar a técnica foram necessários 500 μl de amostra, 100 μl NADPH (0,2 mM), 70 μl Tris Buffer 1M, pH 7,5, 230 μl de uma mistura formada

por 6P (50 mM) e glicose 6-fosfato desidrogenase (100 U/ml), 100 µl de nitrato redutase (10/ml), essa mistura foi incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Posteriormente utilizaram-se 750 µl dessa mistura e adicionaram-se 750 µl do reativo de Griess, incubando-a novamente, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. A leitura foi realizada a 550 nm e feita uma curva padrão para a determinação de nitritos e nitratos (GRANGER et al., 1999).

3.8 AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA DOS TECIDOS

O teste anatomopatológico foi realizado no laboratório de patologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre por um patologista.

Para a dissecação anatômica do fígado e do pulmão direito, seccionaram-se todas as demais estruturas, obtendo-se pulmão e fígado que foram incluídos em blocos de parafina.

Na etapa seguinte, os blocos de parafina eram fixados ao Micrótomo (Leitz® 1512) onde se realizavam cortes com 3 micra (3µ). Na fase de coloração, as lâminas eram mergulhadas nos corantes hematoxilina-eosina durante 5 minutos cada uma, intermediadas por um banho de água corrente. Somente o

fígado foi recebeu coloração de picrossírios. Na fase de desidratação, as estruturas passaram por 3 recipientes com álcool absoluto e por 2 de xilol. Colocou-se a lamínula sobre a lâmina utilizando-se Bálsamo do Canadá ou Entellan, finalizando, assim, o processo de preparação. As lâminas foram analisadas em microscópio binocular *Nikon Labophot* nos diferentes aumentos.

3.9 ANALISE ESTATÍSTICA

A partir dos dados coletados, as médias e os erros padrões das médias de cada grupo foram calculadas, utilizando para análise estatística o software GraphPad InStat, versão 3.0 para Windows 95 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). Foi realizado análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Student-Newman-Keuls, sendo o nível de significância adotado de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

A apresentação dos resultados segue a seguinte ordem no modelo experimental utilizado nesta pesquisa:

1º) Avaliação da integridade hepática através dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (AST), gama glutamil-transferase (γ GT), fosfatase alcalina (FA).

2º) Determinação do peso hepático e pulmonar em relação ao peso corporal total (relação pneumossomática e hepatossomática) dos animais controles e cirróticos.

3º) Determinação das alterações na difusão dos gases pulmonares através de Gasometria Arterial.

4º) Medida da lipoperoxidação no tecido hepático e pulmonar pelo uso da técnica de determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).

5º) Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) presente no tecido hepático e pulmonar dos animais controle e cirróticos.

6º) Avaliar a presença metabólitos do NO nos homogeneizados de fígado e pulmão.

7º) Análise histológica do tecido hepático e pulmonar dos animais controle e cirrótico.

4.1 Avaliação da integridade hepática

Na tabela 1, observamos os resultados da enzimas séricas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (AST), gama glutamil-transferase (γ GT), fosfatase alcalina (FA) e estão expressas em U/L (**TABELA 1**).

TABELA 1. Valores médios de enzimas plasmáticas: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transferase (γ GT) e fosfatase alcalina (FA).

Enzimas Plasmáticas	Grupos Experimentais			
	CO+NaCl	LDB+NaCl	CO+NAC	LDB+NAC
AST (U/L)	98,35 ± 13,53	674,83 ± 38,09 ^a	85,9 ± 7,4	371,50 ± 63,8 ^{a,b}
ALT (U/L)	56,71 ± 4,55	158,00 ± 8,80 ^a	48,0 ± 2,8	103,80 ± 21,6 ^{a,b}
γ GT (U/L)	1,38 ± 0,95	60,43 ± 5,78 ^a	0,1 ± 0,1	33,33 ± 11,5 ^{a,b}
FA (U/L)	138,83 ± 18,38	407,00 ± 33,94 ^a	146,3 ± 17,9	309,00 ± 75,3 ^a

Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), de 6 animais em cada grupo. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

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

^b – diferença significativa em relação ao grupo cirrótico ($p < 0,05$)

Observamos aumento significativo das enzimas AST, ALT, γ GT e FA nos animais cirróticos por ligadura de ducto biliar em relação ao grupo controle (CO+NaCl), e, quando os animais cirróticos receberam tratamento com NAC (LDB+NAC), houve diminuição dessas enzimas em relação ao grupo cirrótico (LDB+NaCl).

4.2 Relação Hepatosomática e Pneumosomática

Na tabela 2, observamos os valores do peso do fígado, a relação hepatossomática, o peso do pulmão e a relação pneumossomática nos animais controle e nos animais cirróticos com e sem tratamento com NAC. Observamos aumento significativo tanto no peso do pulmão quanto do fígado, quando comparados com o grupo controle (CO+NaCl).

Observamos aumento de 110% e 32% nos fígados dos animais LDB+NaCl e LDB+NAC respectivamente, quando comparados aos animais do grupo CO+NaCl. A relação hepatossomática apresentou aumento de 113% no grupo LDB+NaCl e 24% no grupo LDB+NAC comparados ao grupo CO+NaCl.

O peso do pulmão dos animais do grupo LDB+NaCl teve aumento significativo de 40%; e do grupo LDB+NAC, 4% em comparação ao grupo CO+NaCl. Na relação pneumossomática, no grupo LDB+NaCl, houve aumento significativo de 41% em relação ao grupo CO+NaCl. O grupo LDB+NAC não apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos controle.

TABELA 2. Valores médios do peso do fígado, da relação hepatossomática, do peso do pulmão e da relação pneumossomática.

	Grupos Experimentais			
	CO+NaCl	LDB+NaCl	CO+NAC	LDB+NAC
Peso do fígado (g)	8,75 ± 0,448	18,48 ± 1,85 ^a	9,14 ± 0,56	11,58 ± 2,14 ^{a,b}
Relação hepatossomática (%)	2,83 ± 0,11	6,04 ± 0,47 ^a	2,97 ± 0,20	3,51 ± 0,30 ^{a,b}
Peso do pulmão (g)	1,25 ± 0,05	1,76 ± 0,04 ^a	1,22 ± 0,05	1,30 ± 0,10 ^b
Relação pneumossomática (%)	1,25 ± 0,05	1,77 ± 0,04 ^a	1,22 ± 0,05	1,24 ± 0,07 ^b

Os resultados acima são expressos como a média ± erro padrão da média (EPM), de 6 animais em cada grupo. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

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

^b – diferença significativa em relação ao grupo cirrótico ($p < 0,05$)

4.3 Gasometria Arterial

Na tabela 3, verificamos os valores referentes à difusão de gases, quando foi avaliado a pressão parcial de oxigênio (PO_2), a pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2) e o potencial de hidrogênio (pH). Na figura 6, pode-se observar a

saturação da hemoglobina (SatO₂/Hb). Esses resultados são mostrados nos animais dos grupos controles e cirróticos com e sem tratamento com NAC.

Foi observado diferença significativa tanto na PO₂ quanto na PCO₂ dos animais cirróticos (LDB+NaCl) em relação ao grupo controle (CO+NaCl) e controle que receberam tratamento com NAC (CO+NAC), e da mesma forma dos animais cirróticos tratados com NAC (LDB+NAC) apresentaram diferença significativa quando comparados aos animais do grupo LDB+NaCl.

Houve diminuição de 50% e 20% na PO₂ nos animais dos grupos LDB+NaCl e LDB+NAC, respectivamente, em relação ao grupo controle. E quanto à PCO₂, apresentou-se aumento, igualmente de 50% e 20% nos animais dos grupos LDB+NaCl e LDB+NAC respectivamente, em relação ao grupo controle. O potencial de hidrogênio não apresentou diferenças significativas nos grupos comparados.

TABELA 3. Valores médios da pressão parcial de oxigênio (PO₂), pressão parcial de dióxido de carbono (PCO₂) e potencial de hidrogênio (pH)

	Grupos Experimentais			
	Co+NaCl	LDB+NaCl	Co+NAC	LDB+NAC
PO ₂ (mmHg)	93,33 ± 8,92	47,46 ± 4,51 ^a	94,00 ± 4,67	76,42 ± 3,34 ^{a,b}
PCO ₂ (mmHg)	45,33 ± 4,00	70,17 ± 3,18 ^a	51,33 ± 7,32	55,48 ± 3,02 ^{a,b}
pH	7,35 ± 0,02	7,23 ± 0,03	7,34 ± 0,05	7,32 ± 0,03

Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), de 6 animais em cada grupo. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

^b – diferença significativa em relação ao grupo cirrótico ($p < 0,05$)

Na saturação da hemoglobina (SatO_2/Hb), observamos diminuição altamente significativa ($p < 0,001$) no grupo LDB+NaCl em relação ao grupo CO + NaCl, CO+NAC e LDB + NAC, com uma diminuição de 42% quando comparado somente com o grupo CO+NaCl.

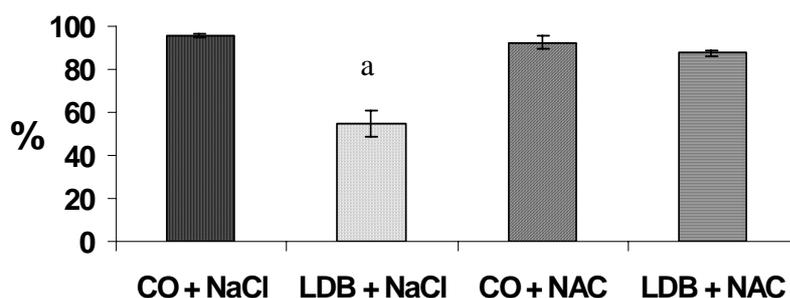


FIGURA 6. valores médios da saturação da hemoglobina, nos diferentes grupos estudados.

Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), de 6 animais em cada grupo. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa em relação aos demais grupos ($p < 0,001$)

4.4 Determinação da lipoperoxidação hepática e pulmonar

Nos dados de lipoperoxidação hepática, vistos na figura 7, que foram avaliados através das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS),

observamos aumento significativo no grupo cirrótico (LDB+NaCl) em relação aos demais grupos (CO+NaCl, CO+NAC e LDB+NAC). Não houve diferença significativa entre o grupo LDB+NAC quando comparados aos grupos controle (CO+NaCl e CO+NAC). Observaram-se aumento da lipoperoxidação superior a 3 vezes no grupo LDB+NaCl, quando comparado ao grupo CO+NaCl, e, quando os animais cirróticos são tratados com NAC, observou-se redução de 50% na lipoperoxidação hepática.

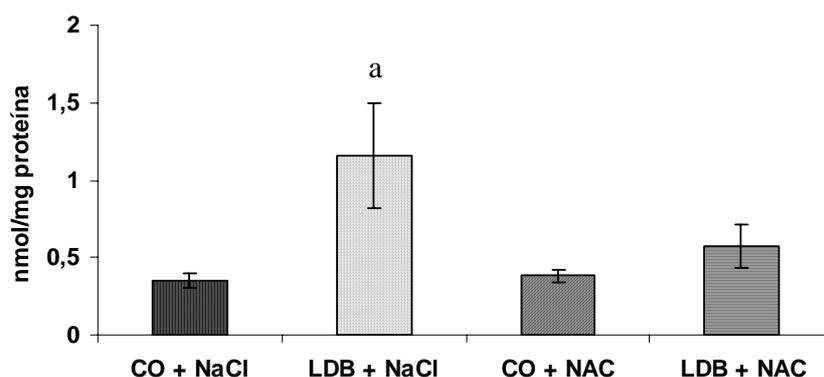


FIGURA 7. Valores médios de TBA-RS no fígado dos diferentes grupos estudados. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), de 6 animais em cada grupo.

As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

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

Na avaliação da lipoperoxidação do tecido pulmonar, observado na figura 8, encontrou-se aumento de 80% no grupo cirrótico (LDB+NaCl) em relação ao

grupo controle, e quando tratado com NAC, observa-se redução de TBA-RS, sendo comparável aos demais grupos.

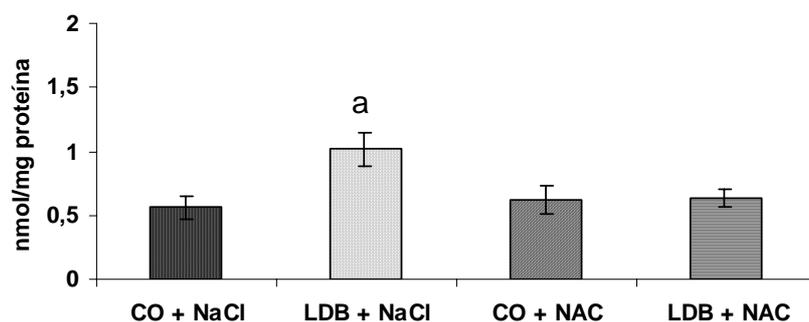


FIGURA 8. Valores médios de TBA-RS no pulmão dos diferentes grupos estudados

Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), de 6 animais em cada grupo.

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

4.5 Atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD)

Na figura 9, são apresentados os resultados da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no homogeneizado de fígado e observamos diminuição de 50% da atividade da enzima quando comparados com o grupo controle (LDB+NaCl). Os animais cirróticos que receberam tratamento com NAC (LDB+NAC) apresentaram aumento de 87% na atividade da enzima SOD quando comparados com o grupo LDB+NaCl.

Na avaliação da atividade SOD em homogeneizado de pulmão, apresentados na figura 10, observa-se diferença significativa do grupo cirrótico (LDB+NaCl) em relação aos demais grupos, com diminuição de 63% da atividade da enzima neste grupo em relação ao grupo controle (CO+NaCl). O grupo cirrótico com NAC (LDB+NAC) apresentou aumento de 80% na atividade da enzima quando comparado com o grupo LDB+NaCl, apresentando diferença significativa também quando comparado com os grupos controles (CO+NaCl e CO+NAC).

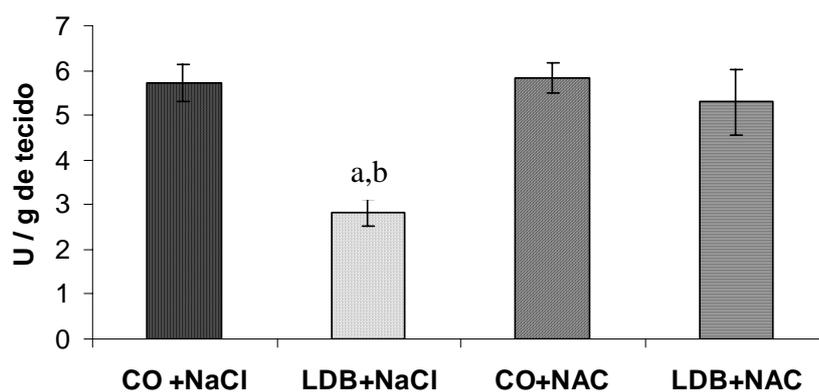


FIGURA 9. Valores médios da atividade da SOD no fígado dos diferentes grupos estudados. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), de 6 animais em cada grupo. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa em relação aos grupos controles ($p < 0,001$)

^b – diferença significativa em relação ao grupo cirrótico com NAC ($p < 0,05$)

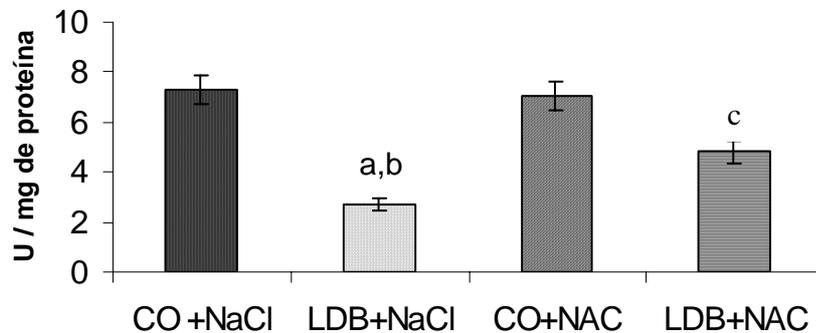


FIGURA 10. Valores médios da atividade da SOD no pulmão dos diferentes grupos estudados. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), de 6 animais em cada grupo. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

- ^a – diferença significativa em relação aos grupos controles ($p < 0,001$)
- ^b – diferença significativa em relação ao grupo cirrótico com NAC ($p < 0,01$)
- ^c – diferença significativa em relação aos grupos controle ($p < 0,01$)

4.6 Atividade da enzima antioxidante catalase (CAT)

Na figura 11, são observados os valores da atividade da enzima catalase no homogeneizado de fígado de ratos controles e cirróticos, com e sem tratamento com NAC. A catalase apresenta atividade aumentada nos grupos cirróticos e cirróticos com NAC (LDB+NaCl e LDB+NAC), mostrando diferença altamente significativa quando comparada aos grupos controle (CO+NaCl e CO+NAC). O grupo LDB+NaCl apresenta atividade aumentada CAT, quando comparada com o grupo cirrótico com NAC (LDB+NAC), mostrando diferença significativa. Na figura 12, são apresentados os valores resultantes da enzima catalase (CAT) no homogeneizado de pulmão de ratos controles e cirróticos com e sem tratamento com NAC. Não foi observado diferença significativa nos grupos avaliados.

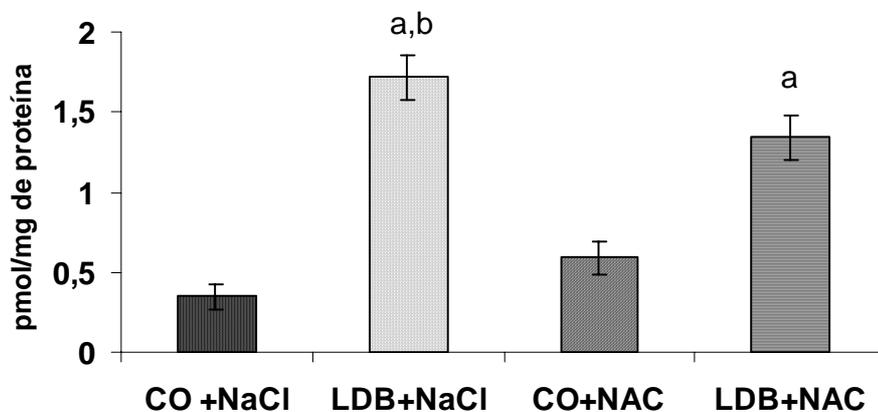


FIGURA 11. Valores médios da atividade da CAT no fígado dos diferentes grupos estudados. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), de 6 animais em cada grupo. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa em relação aos grupos controle ($p < 0,001$)

^b – diferença significativa em relação ao grupo cirrótico com NAC ($p < 0,05$)

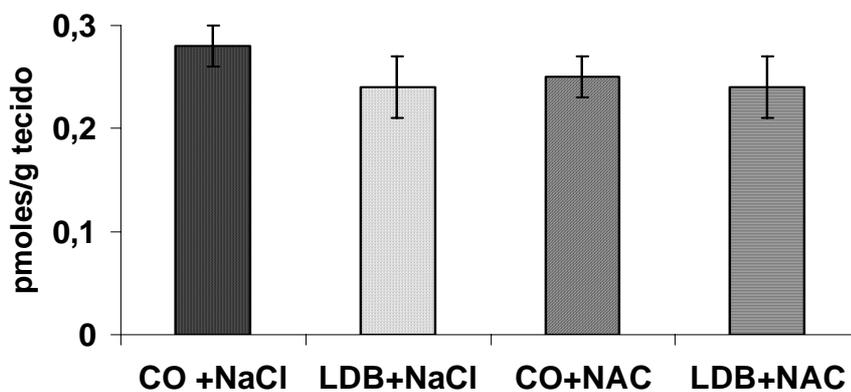


FIGURA 12. Valores médios da atividade da CAT no pulmão dos diferentes grupos estudados. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), de 6 animais em cada grupo. Não houve diferença significativa nos grupos comparados.

4.7 Atividade da enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GPx)

Na figura 13, são apresentados os valores resultantes da enzima glutathiona peroxidase (GPx) no homogeneizado de fígado de ratos controle e cirróticos com e sem tratamento com NAC. Não foi observada diferença significativa nos grupos avaliados.

Observamos na figura 14 os valores resultantes da atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) no homogeneizado de pulmão de ratos controles e cirróticos com e sem tratamento com NAC. Não foi observado diferença significativa nos grupos avaliados, possivelmente devido ao erro padrão nos diferentes grupos.

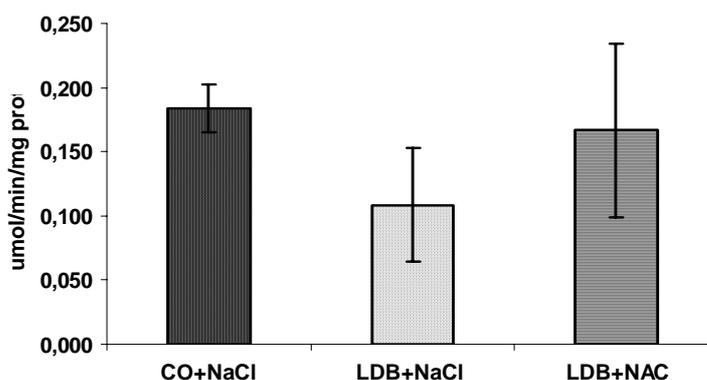


FIGURA 13. Valores médios da atividade da enzima GPx no fígado dos diferentes modelos estudados. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), de 4 animais em cada grupo. Não houve diferença significativa nos grupos comparados.

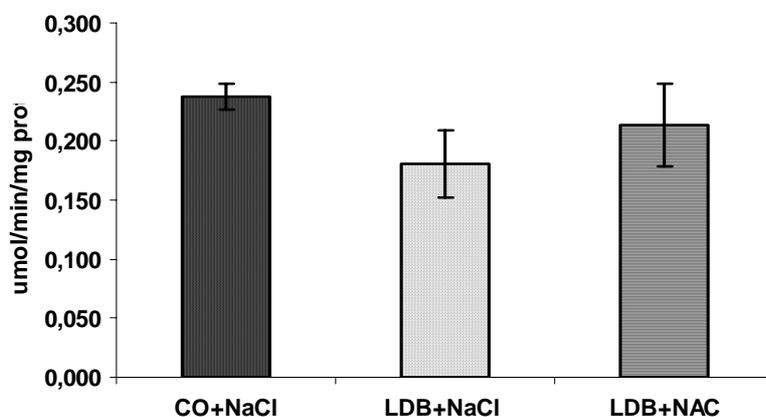


FIGURA 14. Valores médios da atividade da enzima GPx no pulmão dos diferentes grupos estudados. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), de 4 animais em cada grupo. Não houve diferença significativa nos grupos comparados.

4.8 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) através de nitratos totais

Na figura 15, observamos os valores referentes aos nitratos totais no homogeneizado de fígado dos animais controles e cirróticos com e sem tratamento com NAC. Observa-se diminuição significativa ($p < 0,05$) dos nitratos totais nos grupos cirrótico (LDB+NaCl) e cirrótico tratado com NAC (LDB+NAC).

Observamos, na figura 16, os valores resultantes de nitratos totais no homogeneizado de pulmão de ratos controles e cirróticos com e sem tratamento com NAC. Observamos diferença altamente significativa ($p < 0,001$) no grupo cirrótico em relação aos demais grupos.

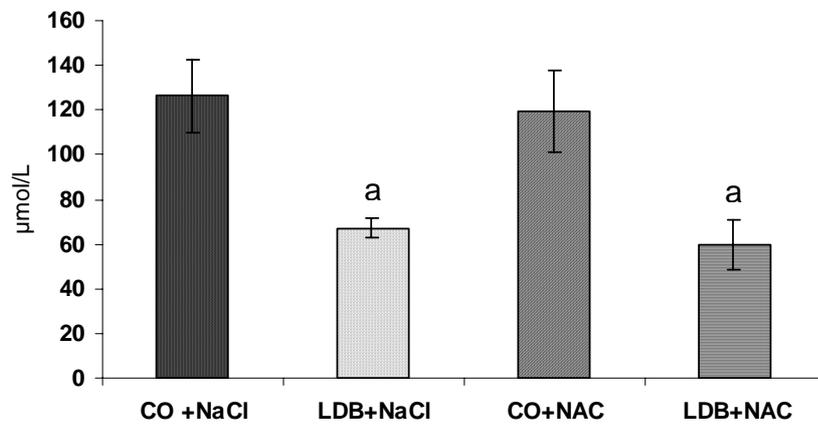


FIGURA 15. Valores de nitratos totais no homogeneizado de fígado dos diferentes grupos estudados. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), de 6 animais em cada grupo. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

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

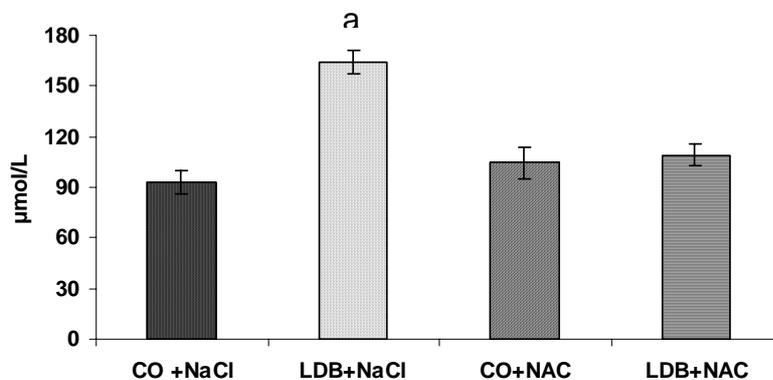


FIGURA 16. Valores de nitratos totais no homogeneizado de pulmão dos diferentes modelos estudados. Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), de 6 animais em cada grupo. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

^a – diferença significativa em relação aos demais grupos ($p < 0,001$)

4.9 Avaliação Histopatológica

A histopatologia foi realizada por meio de coloração de hematoxilina-eosina e picrossírius dos animais controle (CO+NaCl), animais com cirrose biliar secundária (LDB+NaCl) e animais com cirrose biliar secundária tratados com NAC (LDB+NAC).

Na figura 17, a fotomicrografia do fígado do grupo controle, mostra a estrutura lobular hepática normal.

Na figura 18, a fotomicrografia do pulmão de animais controle avaliado por hematoxilina-eosina, evidenciou uma arquitetura normal do parênquima pulmonar e o diâmetro normal dos vasos.

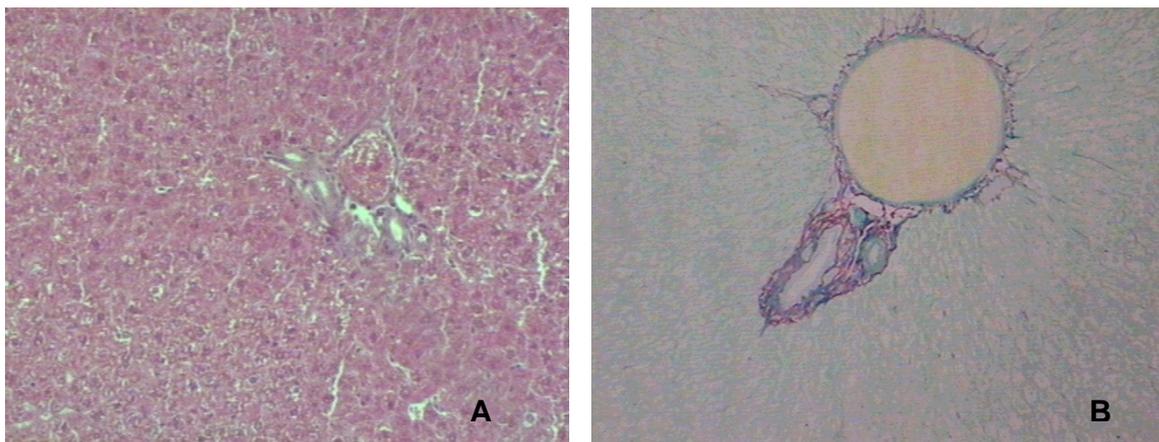


FIGURA 17. Fotomicrografia de fígado de animais do grupo controle (CO+NaCl) com coloração de (A) hematoxilina-eosina e (B) picrossírius, mostra a estrutura lobular hepática (100x).

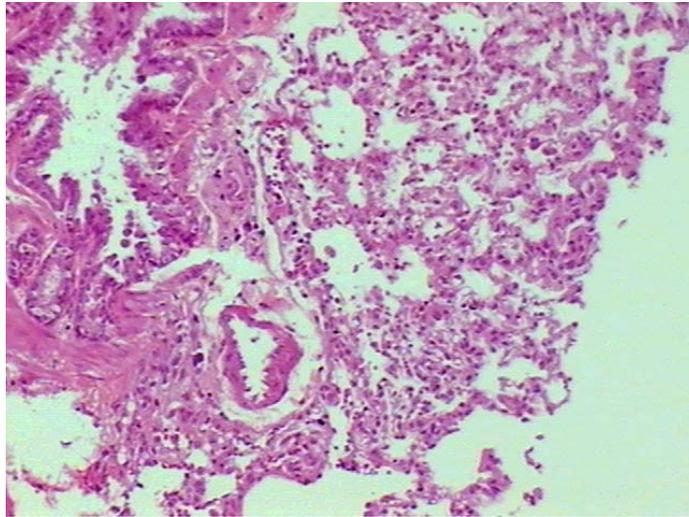


FIGURA 18. Fotomicrografia de pulmão de animais do grupo controle (CO+NaCl) com coloração de hematoxilina-eosina mostrando a estrutura normal do parênquima pulmonar (200x).

Na figura 19, observa-se a fotomicrografia do fígado do grupo cirrótico (LDB+NaCl) mostrando alterações no parênquima hepático com presença de nódulos regenerativos, necrose celular e presença de fibrose.

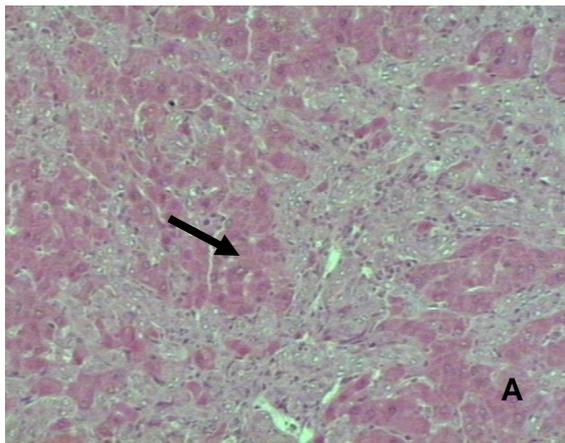


FIGURA 19. Fotomicrografia de fígado de animais do grupo cirrótico (LDB+NaCl) com coloração de (A) hematoxilina-eosina (100x) e (B) picosírius (40x) mostrando alterações no parênquima hepático, com presença de nódulos regenerativos, necrose e fibrose

A figura 20 mostra a fotomicrografia do pulmão dos ratos cirróticos (LDB+NaCl) por hematoxilina eosina. Observam-se aumento do diâmetro do vaso e estase sangüínea no seu interior.

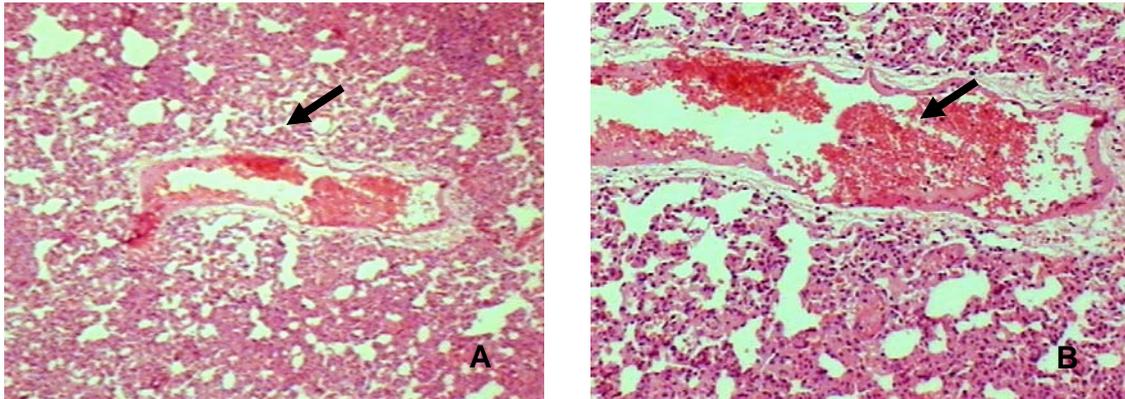


FIGURA 20. Fotomicrografia de pulmão de animais do grupo cirrótico (LDB+NaCl) com coloração de hematoxilina-eosina mostrando alterações no parênquima mostrando vasodilatação e estase sangüínea (A. 40x; B. 200x).

Na figura 21, a fotomicrografia do fígado do grupo cirrótico tratado com NAC (LDB+NaCl), observou-se redução dos nódulos de fibrose. A figura 22 mostra a fotomicrografia do pulmão de ratos cirróticos tratados com NAC, nota-se uma redução da vasodilatação e da estase sangüínea.

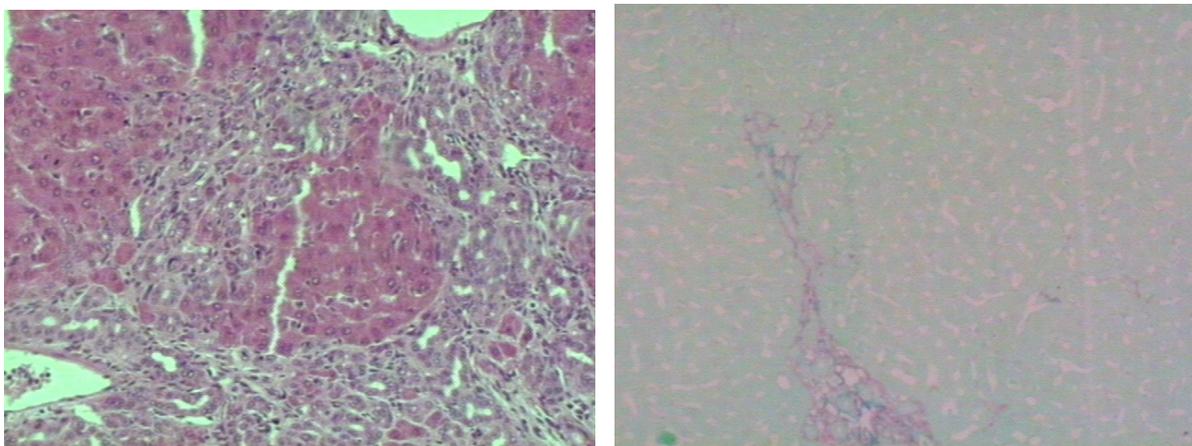


FIGURA 21. Fotomicrografia de fígado de animais do grupo cirrótico tratado com NAC (LDB+NAC) com coloração de (A) hematoxilina-eosina (100x) e (B) picrosírius (100x) mostrando ausência de fibrose e nódulos.

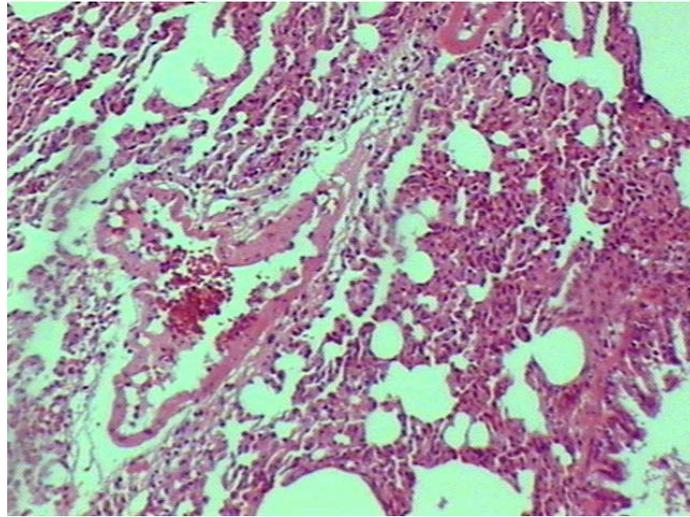


FIGURA 22. Fotomicrografia de pulmão de animais do grupo cirrótico tratado com NAC (LDB+NAC) com coloração de hematoxilina-eosina mostrando redução da vasodilatação e da estase sangüínea (200x).

DISCUSSÃO

A associação entre a doença hepática e as anormalidades vasculares pulmonares é reconhecida há mais de 100 anos. No entanto, o interesse pela pesquisa clínica e experimental da interação fígado-pulmão ocorreu somente nos últimos 15 anos. A síndrome hepatopulmonar é uma complicação da cirrose e ou hipertensão portal, que se caracteriza pela presença de dilatações vasculares intrapulmonares que levam a alterações na difusão arterial de gases (FALLON, 2005).

Experimentalmente, o modelo de ligadura de ducto biliar, o qual desenvolve cirrose biliar secundária, é o único modelo que identifica as características da síndrome hepatopulmonar (FALLON et al., 1997; TIEPPO e VERCELINO, 2003; RODRÍGUEZ-ROISIN et al., 2004; LEE et al., 2004).

Neste trabalho foi utilizado o modelo de ligadura de ducto biliar (LDB) para avaliar o potencial antioxidante da N-acetilcisteína sobre as alterações hepáticas e

pulmonares na cirrose biliar. Foram analisados a integridade hepática, o peso corporal, a lipoperoxidação, as enzimas antioxidantes, nitritos e nitratos e histologia em fígado e pulmão de ratos cirróticos.

Na avaliação da integridade hepática, através das enzimas séricas, observamos aumento das transaminases (aspartato aminotransferase , AST; alanino amino transferase, ALT) no grupo cirrótico por LDB. Isto decorre das alterações hepáticas estabelecidas que elevam os níveis de AST e ALT, por estarem diretamente relacionadas à lesão e a necrose celular em tecidos ricos dessas enzimas (BRANDÃO e MARRONI, 2001).

A fosfatase alcalina (FA) apresentou-se elevada no grupo cirrótico por LDB, e sua elevação é indicativo de colestase e pode estar diretamente relacionada à doença hepatobiliar ocasionada pela obstrução do fluxo biliar (SANTOS et al., 1998).

Em pacientes com doença hepatobiliar, o aumento da gama glutamil-transferase (γ GT) correlaciona-se com a fosfatase alcalina, constituindo-se num teste bastante sensível para indicar doença da árvore biliar (MARRONI e BRANDÃO, 2001). Neste trabalho observou-se grande aumento da γ GT no animais com cirrose biliar secundária, comprovando comprometimento da árvore biliar.

Nossos achados de integridade hepática e obstrução do fluxo biliar estão de acordo com trabalhos de outros autores que fizeram uso do modelo de LDB, indicando o comprometimento hepático e a fidelidade deste modelo animal (PASTOR et al., 1997; PERES et al., 2000; ZHANG et al., 2003; MONTERO et al., 2005).

Os animais cirróticos que receberam a N-acetilcisteína tiveram diminuição da atividade de todas as enzimas séricas avaliadas, mostrando o efeito hepatoprotetor desta droga. Este dado também foi mostrado por PASTOR *et al.*, 1997, no mesmo modelo animal utilizando a NAC. Em outros estudos, utilizando modelos de cirrose induzida por LDB ou por uso de tetracloreto de carbono (CCl₄), mas tratados com flavonóides, observaram-se efeitos similares na avaliação destas enzimas, (PERES et al., 2000; PAVANATO et al., 2003).

Na avaliação do peso do fígado e da relação hepatossomática, observamos aumento significativo, tanto do peso do órgão quanto da relação hepatossomática. Esses dados coincidem com os trabalhos de PASTOR *et al.* (1997) e PERES *et al.* (2000), nos quais foi mostrado que tais aumentos foram atenuados após o uso da NAC e da quercetina, um flavonóide de ação antioxidante, no modelo de LDB. Tal efeito também ocorreu nesse trabalho, cujos animais cirróticos que receberam tratamento com NAC tiveram o peso do fígado e da relação hepatossomática próximos aos do grupo controle.

Em relação ao peso do pulmão e à relação pneumossomática, observamos um aumento significativo no grupo cirrótico em relação aos demais grupos. Esse aumento poderia ser pela infiltração do parênquima pulmonar por células inflamatórias e proteínas plasmáticas. Tal edema pulmonar pode resultar do aumento da permeabilidade vascular e da pressão de filtração vascular pulmonar e diminuição da pressão oncótica (CHANG e OHARA, 1993).

Um aspecto importante no diagnóstico da síndrome hepatopulmonar é a alteração na difusão de gases. Todos os estudos apontam para um considerável desarranjo estrutural na microcirculação pulmonar, suficiente para permitir a passagem de sangue venoso misto para as veias pulmonares, que é representado pela disseminada vasodilatação pré-capilar no leito vascular pulmonar próximo às áreas de trocas gasosas, permitindo diminuição nas concentrações de gases arteriais (LIMA et al., 2004).

Na avaliação da gasometria, observamos diminuição significativa da pressão parcial de oxigênio (PO_2) e um aumento significativo da pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2) nos ratos cirróticos, demonstrando a alteração na difusão de gases neste modelo. Os valores de pH não mostraram diferenças significativas nos grupos, apesar de apresentar-se diminuído no grupo cirrótico. Tais dados confirmam os achados de diversos autores que utilizaram o mesmo modelo para avaliar as alterações pulmonares associadas à cirrose, e que esta hipoxemia pode estar

relacionada à vasodilatação intrapulmonar ocasionada por um aumento da produção de substâncias vasodilatadoras no endotélio pulmonar, principalmente o óxido nítrico (NO) (FALLON et al., 1997; NUNES et al., 2001; ZHANG et al., 2003; FALLON, 2005).

A saturação da hemoglobina (SatO_2/O_2) mostrou-se diminuída nos ratos cirróticos em relação ao grupo controle. Isso se deve provavelmente ao aumento do PCO_2 juntamente com a diminuição do pH, mesmo não sendo significativo. Essas duas variáveis proporcionam alterações no desvio da curva de dissociação da hemoglobina para direita, diminuindo a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, e favorecendo a dessaturação (WEST, 2001).

Os animais cirróticos que receberam tratamento com NAC tiveram melhora da PO_2 juntamente com aumento do pH e da SatO_2/Hb a valores próximos ao controle. Isto nos leva a pensar que a NAC pode apresentar um possível efeito sobre o pH arterial, favorecendo melhor afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, melhorando a saturação, mesmo com a PO_2 inferior a 80 mmHg.

Na avaliação da lipoperoxidação, observamos aumento das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) no fígado dos animais cirróticos em relação ao grupo controle. Sugere-se que o aumento da lipoperoxidação esteja relacionada ao aumento do estresse oxidativo. Esse aumento no modelo de LDB pode ser

explicado pela endotoxemia e pelo aumento de ácidos biliares, que poderiam desequilibrar a atividade da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria hepática e assim, favorecer o aumento da produção de espécies ativas de oxigênio. (PASTOR et al., 1997; ORELLANA et al., 2000).

Os animais cirróticos que foram tratados com NAC apresentaram valores de TBARS próximos ao do grupo controle, indicando o potencial antioxidante desta droga. A diminuição da lipoperoxidação também foi demonstrada utilizando outras substâncias com ação antioxidante, como a quercetina, a rutina e a melatonina no modelo de cirrose biliar secundária (PASTOR et al., 1997; PERES et al., 2000; ESREFLOGLU et al., 2005).

A obstrução biliar no modelo de LDB causa dano hepatocelular agudo e leva à fibrogênese progressiva. Já está bem esclarecido o envolvimento do estresse oxidativo nestes eventos e da ação das enzimas antioxidantes na tentativa de proteger o fígado da ação lesiva dos radicais livres (PERES et al., 2000; ORELLANA et al., 2000).

Na avaliação da lipoperoxidação no tecido pulmonar, observamos um aumento significativo no grupo cirrótico em relação ao grupo controle. Esse aumento pode ser justificado pela endotoxemia presente no modelo de cirrose biliar secundária através da LDB (CHANG e OHARA, 1994) .

Um estudo realizado por RABILLER *et al.*, 2003, demonstrou que animais cirróticos por LDB, após serem tratados com norfloxacina, um antibiótico ativo contra bactérias gran-negativas intersticiais, mostrou resultados com melhora na difusão de gases, com diminuição da diferença alvéolo-arterial de oxigênio. Dessa maneira, acredita-se que a dilatação vascular intrapulmonar pode estar relacionada com a translocação bacteriana do trato gastrointestinal, um fenômeno que expõe o pulmão ao efeito de endotoxinas e citocinas inflamatórias (CHU *et al.*, 1997). Esse aumento de endotoxinas na circulação pulmonar promove o acúmulo de macrófagos intravasculares na microcirculação pulmonar e se correlaciona com o aumento da expressão de óxido nítrico induzível (iNOS) (NUNES *et al.*, 2001).

A presença de citocinas na circulação pulmonar promove o estresse oxidativo pela geração de radical superóxido e o aumento da lipoperoxidação, o que é observado neste trabalho. Nos animais cirróticos que receberam tratamento com NAC, observamos que os valores de lipoperoxidação permaneceram próximos aos do grupo controle. Esse dado está de acordo com outros estudos, em que a NAC inibe a liberação de fatores quimiotáticos por neutrófilos, reduzindo a infiltração de neutrófilos nos pulmões de ratos intoxicados com paraquat (HOFFER *et al.*, 1993). TSUJI *et al.* (1999), também mostraram efeitos anti-inflamatórios da NAC, suprimindo a liberação de citocinas.

A NAC protegeu o tecido pulmonar contra o aumento da lipoperoxidação, provavelmente por atenuar a translocação bacteriana do trato gastrointestinal após a hepatectomia parcial em ratos. Isso ocorre, possivelmente, devido papel da NAC em inibir as células inflamatórias ativas na translocação bacteriana (OKAY, 2005).

A enzima superóxido dismutase (SOD) tem a função de dismutar o radical superóxido ($O^{\bullet-}$) formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (YU, 1994). Vários estudos relacionam a diminuição da atividade da enzima SOD com o aumento do estresse oxidativo (HODGSON e FRIDOVICH, 1975; SANTIARD et al., 1995). Neste trabalho, houve diminuição da atividade da enzima SOD no fígado no grupo cirrótico, o que pode estar relacionado com a inativação do radical superóxido. Os animais cirróticos que foram tratados com NAC mantiveram os valores da atividade da enzima SOD próximos aos do grupo controle. Tais dados foram também observados por PERES *et al.* (2000) ao utilizar o flavonóide quercetina e por PASTOR *et al.* (1997) ao utilizar NAC em modelo de cirrose por LDB.

Na avaliação da atividade da enzima SOD no pulmão, observamos uma diminuição no grupo cirrótico em relação aos demais grupos. Sugerimos que, se há aumento de citocinas no endotélio pulmonar devido à translocação bacteriana e endotoxemia, o que eleva a formação de espécies ativas de oxigênio (WARNER e BRAIN, 1990), a diminuição da atividade da SOD seria pelo consumo desta enzima pela grande quantidade de radical superóxido. Nos animais que receberam NAC,

observamos que os valores da atividade da SOD no pulmão mantiveram-se próximas aos do grupo controle, provavelmente porque a NAC inibiu a translocação bacteriana neste modelo, diminuindo a entrada de citocinas na circulação pulmonar e evitando a formação de radical superóxido (OKAY et al., 2005).

A enzima SOD, ao dismutar o radical superóxido, forma a espécie ativa de oxigênio H_2O_2 , que é o substrato para a atividade da enzima catalase (CAT) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Observamos neste trabalho o aumento da atividade da enzima CAT no fígado do grupo cirrótico, que ocorreu provavelmente pela dismutação do radical superóxido e a conseqüente formação de H_2O_2 , estimulando a atividade desta enzima. No grupo de animais cirróticos tratados com NAC, a atividade da enzima CAT diminuiu a sua atividade, com uma tendência a permanecer próxima à do grupo controle. Esses dados são confirmados pela diminuição do TBARS no grupo cirrótico tratado com NAC, provavelmente pela proteção antioxidante desta droga.

A atividade da catalase no homogeneizado pulmonar não apresentou diferenças significativas entre os grupos.

A glutathione peroxidase (GPx) em fígados cirróticos tem uma especial importância fisiopatológica porque catalisa a decomposição de peróxido inorgânico e peróxido orgânicos, empregando as glutathione (GSH) como co-substrato. Esta bem

descrita na literatura a diminuição da atividade da GPx em animais cirróticos com LDB, o que também é demonstrado neste trabalho. Essa redução da atividade da GPx nos animais cirróticos é bloqueada após a administração do antioxidante, fato este observado, neste trabalho, no fígado e no pulmão dos animais cirróticos. Em trabalhos anteriores do grupo, o uso de antioxidantes em animais controle não apresentou nenhuma alteração, mantendo-se semelhantes aos controles, fato este observado neste trabalho (PASTOR et al., 1997; PERES et al., 2000; ORELLANA et al., 2000; MOREIRA et al., 2004).

Na avaliação de nitratos totais no homogeneizado de fígado, observamos diminuição significativa na produção destes metabólitos nos grupos cirróticos tratados e não-tratados com NAC, em relação aos grupos controles.

No fígado cirrótico, ocorre desequilíbrio entre as substâncias vasoconstritoras, como a endotelina-1, e vasodilatadoras, como o NO. Este fato caracteriza a endoteliopatia presente no fígado cirrótico, o qual apresenta maior síntese de endotelina-1. Este fenômeno promove vasoconstrição e o aumento da resistência intra-hepática ao fluxo sanguíneo, o que comprovaria a baixa quantidade de nitratos totais neste trabalho (SHAH et al., 1999).

Na avaliação da produção de nitratos totais no homogeneizado de pulmão dos grupos estudados, observamos grande aumento na produção desses metabólitos no grupo cirrótico em relação aos demais grupos. Esse dado está de acordo com os

últimos estudos, que correlacionam a vasodilatação intrapulmonar de ratos cirróticos por LDB à grande presença de óxido nítrico (NO) no tecido pulmonar (NUNES et al., 2001; ZHANG et al., 2004; XUAN e NAEIJE, 2004).

A excessiva produção de NO está associada à patogênese da endotoxemia (TITHERADGE, 1999), que relaciona-se ao desenvolvimento da SHP no modelo de LDB, pela atividade de macrófagos intravasculares pulmonares e expressão de iNOS no tecido pulmonar (NUNES et al., 2001).

Os valores de nitratos totais dos animais que receberam tratamento com NAC permaneceram próximos aos do grupo controle, mostrando que a NAC apresentou um efeito inibitório sobre a produção de NO, provavelmente por diminuir a translocação bacteriana, assim minimizando o acúmulo de citocinas e células de defesa no endotélio pulmonar. Esse acúmulo acarreta aumento na produção de EAO e promove a lipoperoxidação. Devido a sua ação antioxidante, a NAC, também inibiu a presença de lipoperoxidação no tecido pulmonar.

A atividade diminuída da enzima superóxido dismutase, observada neste trabalho, pode estar relacionada à grande quantidade de radical superóxido ($O^{\bullet-}$) no tecido pulmonar. O $O^{\bullet-}$ pode se associar ao NO e, assim, formar um potente oxidante celular, o peroxinitrito ($ONOO^-$) (BECKMAN e KOPPENOL, 1996). Imagina-se que esta enzima estaria diminuída na tentativa de proteger a célula do oxidante.

O aumento de NO está relacionado à depleção da metionina-adenosil transferase (RUIZ et al., 1998), o que leva à depleção da glutathiona, fato este, que é observado neste trabalho nos pulmões dos animais cirróticos, que apresentam GPx diminuída e aumento dos nitratos totais.

A NAC também pode reduzir a formação de peróxinitritos (ONOO^-), através da inibição da produção de metabólitos do NO. Esse efeito se dá pela combinação do composto tiol da NAC com o NO, produzindo, assim, um composto chamado de nitrotiol. Esse composto pode preservar e acumular o NO na sua forma biologicamente ativa (FAILLI et al., 2002). Uma vez em sua forma biologicamente ativa, o NO pode ter ação antioxidante, inibindo a ação de EAO no tecido pulmonar. Quando os peróxidos entram nas células, eles podem reagir com metaloproteínas, formando complexos, que levariam ao aumento da lipoperoxidação. O NO, como antioxidante, pode reagir com estas metaloproteínas, prevenindo reações oxidativas e limitando, assim, o dano celular mediado pelo estresse oxidativo (RUBBO e RADI, 2002).

Na avaliação da histologia hepática por meio de hematoxilina-eosina, confirma-se o desenvolvimento de cirrose no grupo com ligadura de ducto biliar (LDB+NaCl), através do aparecimento de nódulos regenerativos e focos de necrose. Os animais cirróticos tratados com NAC (LDB+NAC) apresentaram uma atenuação desse fenômeno. Esses achados estão de acordo com outros estudos que utilizaram NAC e também outras substâncias antioxidantes, como a quercetina e a rutina, em

que, se observa a redução da fibrose hepática (PASTOR et al., 1997; PERES et al., 2000; PAVANATO et al., 2003). Esta melhora no parênquima hepático, foi observada nos parâmetros enzimáticos, bioquímicos, assim como na integridade da membrana plasmática, observada na redução na lipoperoxidação.

Na histologia do pulmão, observamos aumento do diâmetro dos vasos dos ratos cirróticos (LDB+NaCl), fenômeno que caracteriza a síndrome hepatopulmonar. Esse achado está de acordo com outros autores que utilizaram o mesmo modelo para investigação da síndrome hepatopulmonar (CHANG e OHARA, 1993; FALLON et al., 1997; NUNES et al., 2001; ZHANG et al., 2003).

Os animais cirróticos, quando tratados com a NAC, reduziram vasodilatação, fenômeno este acompanhado pela redução da fibrose hepática, citado anteriormente. Isso ocorre, provavelmente, devido o potencial antioxidante da NAC, que reduz a lesão oxidativa no fígado dos animais com ligadura de ducto biliar, acarretando melhora na função hepática e conseqüentemente levando à redução da endotoxemia e à diminuição de NO e EAO no tecido pulmonar, reduzindo a lesão oxidativa, a vasodilatação e restabelecendo as alterações na difusão de gases.

O entendimento da ação da N-acetilcisteína no modelo de síndrome hepatopulmonar promete ser promissor para investigações futuras.

CONCLUSÃO

Em relação ao modelo experimental de cirrose biliar secundária por lidadura de ducto biliar principal e a ação da NAC podemos concluir que :

- A administração da NAC em ratos cirróticos por LDB melhorou as enzimas relacionadas à integridade do parênquima hepático, bem como restabeleceu as relações hepatossomática e pneumossomática.
- A NAC restabeleceu os valores de gasometria nos animais cirróticos permanecendo os valores semelhantes aos animais normais.
- A administração da NAC em ratos cirróticos diminuiu o dano sobre os lipídios das membranas tanto no fígado como no pulmão, resultado observado pela diminuição das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico.

- A NAC administrada aos animais cirróticos mantém os valores da SOD, tanto do fígado como do pulmão semelhantes aos dos controles. A CAT no pulmão manteve-se inalterada. A GPx não mostrou alteração significativa nos grupos estudados.
- Nos animais submetidos a ligadura de ducto biliar notou-se diminuição no nitratos totais no fígado, mas quando avaliado o tecido pulmonar este encontra-se aumentados significativamente. O uso da NAC reverteu somente a situação do pulmão nos animais com ligadura de ducto biliar.
- Os ratos cirróticos com ligadura de ducto biliar desenvolveram as alterações pulmonares semelhantes a SHP e que foram revertidas com o uso da N-acetilcisteína.
- Os aspectos histológicos do fígado apresentam sinais de necrose no modelo de cirrose biliar secundária, efeito esse que é minimizado após o uso da N-acetilcisteína.
- A N-acetilcisteína minimiza a vasodilatação e a estase sangüínea observada nos animais com ligadura de ducto biliar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AZIZ, G.; LEBEAU, G.; RESCAN, P.Y.; CLEMENT, B.; RISSEL, M. DEUGNIER, Y.; CAMPION, J.P.; GUILLOUZO, A. Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in the rat. *Am. J. Pathol.*, 137: 1333-42, 1990.

ABOUSSOUN, L.S.; STOLLER, J.K. The hepatopulmonary syndrome. *Baill. Clin. Gastroent.*, 14: 1033-48, 2000.

AGUSTI, A.G.; ROCA, J.; BOSCH, J.; RODRIGUEZ-ROISIN, R. The lung in patients with cirrhosis. *J. Hepatol.*, 10: 251-7, 1990.

ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; HOEY B.M.; BUTLER J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Rad. Biol. Med.*, 6:593-7,1989.

BAKKER, J.; ZHANG, H.; DEPIERREUX, M.; VAN ASBECK, S.; VINCENT J.L. Effects of N-acetylcysteine in endotoxic shock. *J. Crit. Care*, 9(4):236-43, 1994.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.*, 271:C1424-37, 1996.

BERGAMINI, S.; ROTA, C.; CANALI, R.; STAFFIERI, M.; DANERI, F.; BINI, A.; GIOVANNINI, F.; TOMASI, A.; IANNONE, A. N-acetylcysteine inhibits in vivo nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*, 5: 349-60, 2001.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 134: 707-16, 1973.

BRANDÃO, A.B. L.; MARRONI, C.A. Testes de função hepática. *In: Compêndio de Hepatologia*. MATTOS, A.A.; DANTAS, W. (Eds.)... (et al.). São Paulo. Fundação BYK, 2ª ed. 2001.

BRAVO, A.; PASTOR, A.; COLLADO, P.S.; ALMAR, M.; GONZALEZ-GALLEGU, J. Effects of S-adenosylmethionine and N-acetylcysteine on histological changes induced by biliary obstruction in the rat. *Biomed. Res.*, 18: 279-86, 1997.

BRUSSINO, L.; BUCCA, C.; MORELLO, M.; SCAPPATICCI, E.; MAURO, M.; ROLLA, G. Effect on dyspnoea and hypoxaemia of inhaled N^G-nitro-L-arginine methyl ester in hepatopulmonary syndrome. *The Lancet*, 362: 43-4, 2003.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzimol.* 52: 302-09, 1978.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radical and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, ascorbate. *Arch. Biochem. biophys.*, 300, 535-43, 1993.

BURTON, G.W.; TRABER, M.G. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu. Rev. Nutr.*, 10: 357-82, 1990.

CHANG, S.W.; OHARA, N. Chronic biliary obstruction induces pulmonary intravascular phagocytosis and endotoxin sensitivity in rats. *J. Clin. Invest.*, 94(5):2009-19, 1994.

CHANG, S.W.; OHARA, N. Increased pulmonary vascular permeability in rats with biliary cirrhosis: role of thromboxane A₂. *Am. J. Physiol.*, 264: L245-52, 1993.

CHANG, S-W.; O'HARA, N. P. Circulatory dysfunction in rats with biliary cirrhosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148: 798-805, 1992.

CHU, C.J.; LEE, F.Y.; WANG, S.S.; LU, R.H.; TSAI, Y.T.; LIN, H.C.; HOU, M.C.; CHAN, C.C.; LEE, S.D. Hyperdynamic circulation of cirrhotic rats with ascites: role of endotoxin, tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide. *Clin. Sci.*, 93(3):219-25, 1997.

CLÀRIA, J.; JIMÉNEZ W. Cirrosis hepática experimental y fisiopatología de la formación de ascitis en la enfermedad hepática crónica. *Gastroenterol. Hepatol.*, 15(3), 1992.

COTGREAVE. I.A. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv. Pharmacol.*, 38: 205-27, 1997.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; COSTANTINO, G.; SERRAINO, I.; DE SARRO, A.; CAPUTI, A.P. Effects of n-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.*, 47: 537-48, 2000.

DA SILVA, J. HERRMANN, S.M.; HEUSER, V.; PERES, W.; POSSA MARRONI, N.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; ERDTMANN, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food. Chem. Toxicol.*, 40: 941-7, 2002.

DEL MAESTRO, R. F. Na approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol. Scand.*, 492: 153 - 67, 1980.

DEL MAESTRO, R. F. Na approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 492: 153 - 68, 1980.

DINH-XUAN, A.T.; NAEIJE, R. The hepatopulmonary syndrome: NO way out? *Eur. Respir. J.*, 23: 661-2, 2004.

ESREFOGLU, M.; GUL, M.; EMRE, M.H.; POLAT, A.; SELIMOGLU, M.A. Protective effect of low dose of melatonin against cholestatic oxidative stress after common bile duct ligation in rats. *World. J. Gastroenterol.* 11: 1951-6, 2005.

FAILLI, P.; PALMIERI, L.; D'ALFONSO, C.; GIOVANNELL, I.L.; GENERINI, S.; ROSSO, A.D.; PIGNONE, A.; STANFLIN, N.; ORSI, S.; ZILLETTI, L.; MATUCCI-CERINIC, M. Effect of N-acetyl-L-cysteine on peroxynitrite and superoxide anion production of lung alveolar macrophages in systemic sclerosis. *Nitric Oxide*, 7(4):277-82, 2002.

FALLON, M. B. Mechanisms of Pulmonary Vascular Complications of Liver Disease. *J. Clin. Gastroenterol.*, 39: S138-42, 2005.

FALLON, M.B.; ABRAMS, G.A.; MC GRATH, J.W.; HOU, Z.; LUO, B. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome. *Am. J. Physiol.*, 272: G779-G784, 1997.

FARBER, J.L.; KYLE, M.; COLEMAN, J.B. Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxy species. *Lab. Invest.*, 62: 670 - 79, 1990.

FERNANDES, A.O. e MIES, S. Hipertensão Portal. In: SILVA, O.C.; ZUCULOTO, S.; BEER, A. *Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia*. São Paulo: Robe, 1998.

FERNANDO, B.; MARLEY, R.; HOLT, S.; ANAND, R.; HARRY, D., SANDERSON, P.; SMITH, R.; HAMILTON, G.; MOORE, K. N-acetylcysteine prevents development of the hyperdynamic circulation in the portal hypertensive rat. *Hepatology*, 28: 689-94, 1998.

FLOHÉ, L; GUNZLER, WA. e SCHOCK, H.H. Glutathione peroxidase: a seleno-enzyme. *Febs. Lett.*, 32: 132-34, 1973.

FRIEDMAN, S. L.; SCHIANO, T. D. Cirrhosis and its sequelae. In: *Cecil Textbook of Medicine*. GOLDMAN, L.; AUSIELO, D. Philadelphia: Saunders, 22^a ed. 2004.

GARCIA, E.; SILVERIO, A.; CASSAL, A. Síndrome Hepatopulmonar: Fisiopatogenia e Opções Terapêuticas. *GED*, 17, 1998.

GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; ESTELLER, A. El hígado. Fisiopatología de las hepatopatías. In: *Fundamentos de fisiopatología*. ESTELLER, A.; CORDERO, M. Ed. McGraw Hill - Interamericana, Madrid, 295-328, 1998.

GRANGER, D.L.; ANSTEY, N.M.; MILLER, W.C.; WEINBERG, J.B. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol.*, 301: 49-61, 1999

HALLIWEL, B. Antioxidants: The basis what they are and how to evaluate them. In: *Antioxidants in diseases: Mechanisms and therapy*. SIES, H. California. Academic Press, 1997.

HALLIWELL, B. Vitamin C: Antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic. Res.* 25: 439-54, 1996.

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

HARRISON, P.M.; WENDON, J.A.; GIMSON, A.E.; ALEXANDER, G.J.; WILLIAMS R. Improvement by acetylcysteine of hemodynamics and oxygen transport in fulminant hepatic failure. *Engl. J. Med.*, 324: 1852-7, 1991.

HODGSON, E.K.; FRIDOVICH, I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation. *Biochemistry*, 14: 5299-303, 1975.

HOFFER, E.; AVIDOR, I.; BENJAMINOV, O.; SHENKER, L.; TABAK, A.; TAMIR, A.; MERZBACH, D.; TAITELMAN, U. N-acetylcysteine delays the infiltration of inflammatory cells into the lungs of paraquat-intoxicated rats. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 120: 8-12, 1993.

JAMES, L.P.; MCCULLOUGH, S.S.; LAMPS, L.W.; HINSON, J.A. Effect of N-Acetylcysteine on Acetaminophen Toxicity in Mice: Relationship to Reactive Nitrogen and Cytokine Formation. *Toxicological Sciences*, 75: 458-67, 2003.

KANNER, J. E.; HAREL, S. Initiation of membranal lipid peroxidation by activated metmyoglobin and methemoglobin.. *Arch. Biochem. Biophys.*, 237:214-321, 1985.

KANNER, J. E.; HAREL, S. Liciation of membranal lipid peroxidation by activated metmyoglobin and methemoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 237: 214-321, 1985.

KENNEDY, T.C. e KNUDSON, R.J. Exercise-aggravated hypoxemia and orthodeoxia in cirrhosis. *Chest*, 72: 305-09, 1977.

KIM, Y-K.; JHON, D-Y.; LEE, K-Y. Involvement of ROS and JNK1 in selenite-induced apoptosis in Chang liver cells *Experimental And Molecular Medicine*, 36: 157-64, 2004.

KOUNTOURAS, J.; BILLING, B.H.; SCHEUER, P.J. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhoses in the rat. *Br. J. Exp. Pathol.*, 65: 305-11, 1984.

KRINSKI, N.I. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Rad. Biol. Med.*, 7: 617-35, 1982.

KROWKA, M.J. e CORTESE, D.A. Hepatopulmonary Syndrome. *Chest*, 98: 1053-54, 1990.

KROWKA, M.J.; DICKSON, E.R.; CORTESE, D.A. Hepatopulmonary syndrome. Clinical observations and lack of therapeutic response to somatostatin analogue. *Chest*, 104: 515-521, 1993.

LEE, K-N.; YOON, S.K.; LEE, J. W.; KIM, K.N.; PARK, B-H.; KWAK, J. Y.; JEONG, J. S.; KIM, Y. H. Hepatopulmonary syndrome induced by common bile duct ligation in a rabbit model: correlation between pulmonary vascular dilatation on thin-section ct and angiography and serum nitrite concentration or endothelial nitric oxide synthase (enos)1 expression *Korean J. Radiol.*, 5: 149-56, 2004.

LEE, S.S. Cardiac abnormalities in liver cirrhosis. *West. J. Med.* 151: 530-5, 1989.

LIMA, B.; MARTINELLI, A.; FRANÇA, A.V.C. Síndrome hepatopulmonar - Patogenia, diagnóstico e tratamento. *Arq. Gastroenterol.*, 41(4): 250-8, 2004.

LIU, H.; LEE, S.S. Cardiopulmonary dysfunction in cirrhosis. *J. Gastrol. Hepatol.* 14: 600 – 08, 1999.

LLESUY, S.F. Especies Activas de Oxígeno. *In: Estresse Oxidativo e Antioxidantes.* MARRONI, N.A.P. et al. Canoas: Ulbra, 2002.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, M.J.; FARR, A.L. Protein measurement with the foline reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-75, 1951.

LUO, B.; ABRAMS, G.A.; FALLON, M.B., Endothelin-1 in the rat bile duct ligation model of hepatopulmonary syndrome: correlation with pulmonary dysfunction. *J. Hepatology.*, 29:571– 8, 1998.

LUO, B.; TANG, L.; ZHANG, J. Biliary epithelial derived endothelin-1: an endocrine mediator of experimental hepatopulmonary syndrome. *Hepatology*, 40:214, 2004.

MATSUMOTO, A.; OGURA, K.; HIRATA, Y; KAKOKI, M.; WATANABE, F.; TAKENAKA, K.; SHIRATORI, Y.; MOMOMURA, S.; OMATA, M. Increased nitric oxide in the exhaled air of patients with decompensated liver cirrhosis. *Ann. Int. Med.*, 123: 110-13, 1995.

MIRSA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, 247: 3170-5, 1972.

MOLDEUS, P.; COTGREAVE, I.A.; BERGGREN, M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration*, 1:31-42, 1986.

MONTERO, E.F.; QUIREZE, C. JR.; D'OLIVEIRA, D.M. Bile duct exclusion from selective vascular inflow occlusion in rat liver: role of ischemic preconditioning and N-acetylcysteine on hepatic reperfusion injury. *Transplant. Proc.*, 37(1):425-7, 2005.

MOREIRA, A.J.; FRAGA, C.; ALONSO, M.; COLLADO, P.S.; ZETLLER, C.; MARRONI, C.; MARRONI, N.; GONZALEZ-GALLEGO, J. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem. Pharmacol.*, 68:1939-46, 2004.

NASCHITZ, J.E.; SLOBODIN, G.; LEWIS, R.J.; ZUCKERMAN, E.; YESHURUN, D. Heart disease affecting the liver and liver disease affectin the heart. *Am. Heart. J.* 140: 111-20, 2000.

NELSON, R.S.; EICHINGER, M.R. Role of nitric oxide (NO) in pulmonary dysfunction associated with experimental cirrhosis. *Respir. Physiol.* 126: 65-74, 2001.

NUNES, H.; LEBREC, D.; MAZMANIAN, M.; CAPRON, F.; HELLER, J.; TAZI, K.A.; ZERBIB, E.; DULMET, E.; MOREAU, R.; DINH-XUAN A.T.; SIMONNEAU, G.; HERVE, P. Role of nitric oxide in hepatopulmonary syndrome in cirrhotic rats. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 164(5):879-85, 2001.

OKAY, E.; KARADENIZLI, A.; MÜEZZINOGLU B.; ZEYBEK U.; ERGEN, H. A.; ISBIR T. N-acetylcysteine attenuates bacterial translocation after partial hepatectomy in rats. *Journal of Surgical Research*, In Press, Corrected Proof, 2005.

ORELLANA, M.; RODRIGO, R.; THIELEMANN, L.; GUAJARDO, V. Bile duct ligation and oxidative stress in the rat: effects in liver and kidney. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 126: 105-11, 2000.

PANOS, R.J.; BAKER, S.K. Mediators, cytokines and growth factors in liver-lung interaction. *Clin. Chest Med.*, 17:151-69, 1996.

PAROLA, M.; LEONARDUZZI, G.; ROBINO, G.; ALBANO, E.; POLI, G.; DIANZANI, M.U. On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Rad Biol Med* 20: 351-9, 1996.

PASTOR, A.; SÁNCHEZ COLLADO, P.; ALMAR, M.; BARRIENTOS, C.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of S-adenosylmethionine. *J Hepatol.*, 27:363-7, 1997.

PAVANATO, A.; TUÑÓN, M.J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; MARRONI, C.A.; LLESUY, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; MARRONI, N. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Diges. Dis. Sci.*, 4: 824-9, 2003.

PERES, W. Radicais livres em níveis biológicos. Pelotas, Educat, 1994.

PERES, W.; TUÑÓN, M.J.; COLLADO, P.S.; MATOS, S.H.; MARRONI, N.; GONZALEZ-GALLEGO, J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J. Hepatol.* 33: 742-50, 2000.

PODOLSKY, B.; ISSELBACHER, M. Cirrosis hepática. *In: Tratado de Hepatología Clínica*, Rodés E. et al., Ed. Masson-Salvat, Barcelona, pp. 1553-5, 1991.

PRYOR, W.A. The role of free radical reactions in biological systems. *In: Free Radicals in Biology.*, New York: Academic Press. P.1-49, 1976.

RABILLER, A.; NUNES, H.; LEBREC, D.; TAZI, K.A.; WARTSKI, M.; DULMET, E.; LIBERT, J.M.; MOUGEOT, C.; MOREAU, R.; MAZMANIAN, M.; HUMBERT, M; HERVE, P. Prevention of gram-negative translocation reduces the severity of hepatopulmonary syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 166: 514-7, 2002.,

RHODEN, E.L.; PEREIRA-LIMA, J.; ZETTLER, C.E. Modelo experimental de indução de cirrose hepática em ratos por tetracloreto de carbono. *GED* 10: 149 - 52, 1991.

ROBIN, E.D.; LAMAN, D.; HORN, B.R.; THEODORE, J. Platypnea related to orthodeoxia caused by true vascular lung shunts. *N. Engl. J. Med.*, 294: 941-3, 1976.

ROJKIND, M.; PONCENOYOLA, P. The extracellular matrix of the liver. *Collagen. Rel. Res.* 2: 151-75, 1982.

ROLLA, G.; BRUSSINO, L.; COLAGRANDE, P.; DUTTO, L.; POLIZZI, S.; SCAPPATICCI, E.; BERGERONE, S.; MORELLO, M.; MARZANO, A.; MARTINASSO, G.; SALIZZONI, M.; BUCCA, C. Exhaled nitric oxide and oxygenation abnormalities in hepatic cirrhosis. *Hepatol.*, 26: 842-7, 1997.

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

SANTIARD, D.; RIBIERE, C.; NORDMANN, R.; HOUEE-LEVIN, C. Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by free radicals derived from ethanol metabolism: a gamma radiolysis study. *Free Radic. Biol. Med.*, 19(1):121-7, 1995.

SANTOS, J.B.; ZUCULOTO, S.; CASTRO E SILVA JR, O.; SALGADO JR, W. CENEVEIA, R. Cirrose Biliar Secundária. In: *Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia*. CASTRO e SILVA JR., O; ZUCULOTO, S.; BEER JR, A. Ed. Robe, São Paulo, pp. 377-88, 1998.

SARNSTRAND, B.; TUNEK, A.; SJODIN, K.; HALLBERG, A. Effects of N-acetylcysteine stereoisomers on oxygen-induced lung injury in rats. *Chem. Biol. Interact.*, 94(2):157-64, 1995.

SHAH,V.; TORUNER, M.; HADDAD, F.; CADELINA, G.; PAPAPETROPOULOS, A.; CHOO, K.; SESSA, W.C. Impared endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology.*, 117: 1222-8, 1999.

SIES, H. Antioxidants in disease mechanisms and therapy. *Advances in Pharmacology*, Part II, Vol. 38, 707p, 1991.

SIES, H.; MURPHY, M.E. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol B.*, 8(2):211-8, 1991.

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

SPRONG, R.C.; WINKELHUYZEN-JANSSEN, A.M.; AARSMAN, C.J.; VAN OIRSCHOT, J.F.; VAN DER BRUGGEN, T.; VAN ASBECK, B.S. Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:1283-93, 1998.

THANNICKAL, V.J.; FANBURG B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.*, 279: L1005–L1028, 2000.

TIEPPO, J. e VERCELINO, R. Comparação de modelos experimentais para verificação das alterações características da síndrome hepatopulmonar. CANOAS: ULBRA, 2003. Trabalho de conclusão de curso, Faculdade de Fisioterapia, Universidade Luterana do Brasil, 2003.

TITHERADGE, M.A. Nitric oxide in septic shock. *Biochim. Biophys. Acta*, 1411(2-3):437-55, 1999.

WARNER, A.; BRAIN, J. The cell biology and pathogenic role of pulmonary intravascular macrophages. *Am. J. Physiol.* L1-L12, 1990.

WEST, J.B. Fisiologia respiratória moderna, São Paulo, ed. manole, 2000.

YAARI A, SIKULER E, KEYNAN A, BEN-ZVI Z. Bromosulfophthalein disposition in chronically bile duct obstructed rats. *J. Hepatol.* 15: 67-72, 1992.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.*, 74: 139-62, 1994.

YUNGSON, R. Como combater os radicais livres. Rio de Janeiro, Ed. Campus, p.2-14, 1995.

ZHANG, X.J.; 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.*, 39: 724-30, 2003.

ZIMENT, I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. *Biomed Pharmacother.* 42: 513-20, 1988.

