

Ligadura de ducto biliar como modelo de cirrose biliar secundária: Efeito da S-Nitroso-N-Acetilcistena (SNAC)

BRUNA BORBA VALIATTI¹

RAFAEL VERCELINO²

JULIANA TIEPPO²

GRAZIELLA RODRIGUES³

CÍNTIA DE DAVID⁴

GABRIELA FREITAS DE SOUZA⁵

MARCELO GANZAROLLI DE OLIVEIRA⁶

NORMA POSSA MARRONI⁷

CLÁUDIO AUGUSTO MARRONI⁸

RESUMO

A Síndrome Hepatopulmonar é uma complicação da cirrose hepática que gera prejuízo na difusão de gases. Avaliamos o efeito da SNAC na difusão de gases e na lipoperoxidação (LPO) pulmonar e hepática em ratos com ligadura de ducto biliar comum (LDBC). Utilizamos 20 ratos Wistar, divididos em: 1-Sham Operated (SO); 2-LDBC; 3-SO+SNAC; 4-LDBC+SNAC. A SNAC foi administrada 14 dias após a LDBC, por 14 dias. Na histologia, o grupo 2 apresentou infiltrado inflamatório e aumento no diâmetro dos vasos. Houve diminuição

¹ Acadêmica do Curso Medicina/UFCSPA – Bolsista FAPERGS

² Fisioterapeuta, Mestre em Fisiologia/UFRGS

³ Bióloga/ULBRA, Mestranda do PPG Medicina: Ciências Médicas do HCPA/UFRGS

⁴ Farmacêutica, Doutoranda do PPG Ciências biológicas: Fisiologia/UFRGS

⁵ Química, Doutoranda do Programa de Química da UNICAMP

⁶ Professor Associado do Departamento de Físico-Química da UNICAMP

⁷ Professora do Curso de Biologia e do PPG Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA, Coordenadora do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes

⁸ Professor - Orientador do Curso de Medicina/UFCSPA

significativa da PO_2 e $SatO_2/Hb$ no grupo 2. Houve aumento significativo das provas de função hepática e da LPO do tecido pulmonar e hepático no grupo 2. Concluímos que a SNAC reduziu o dano hepático, a hipoxemia e a LPO pulmonar em ratos com LDBC, possivelmente por seus efeitos antioxidantes.

Palavras-chave: Ligadura de ducto biliar comum, estresse oxidativo, SNAC.

ABSTRACT

The Hepatopulmonary Syndrome is a complication of cirrhosis that affects gas diffusion. We evaluated SNAC's effect on gas diffusion and lipoperoxidation (LPO) in lung and liver of rats with common bile duct ligation (LDBC). We used 20 Wistar rats, divided into: 1 Sham-operated (SO) 2-LDBC, 3-SO + SNAC, 4-LDBC + SNAC. SNAC was administered 14 days after LDBC, for 14 days. In histological analysis, group 2 showed inflammatory infiltrate and increase in vessels diameter. There was a significant decrease of PO_2 and $SatO_2/Hb$ in group 2. There was significant increase in liver integrity markers and of LPO at lung and liver in group 2. We conclude that SNAC reduced the liver damage, the hypoxemia and pulmonary LPO in rats with LDBC, possibly by its antioxidant effects.

Key words: Common bile duct ligation, oxidative stress, SNAC

INTRODUÇÃO

Alterações na função respiratória são eventos comuns em pacientes que apresentam doença hepática crônica. As estimativas são tão altas que 50-70% dos pacientes se queixam de dispnéia (ROBERTS, ARGUEDAS e FALLON, 2007). Nos últimos anos, as anormalidades vasculares pulmonares foram reconhecidas cada vez mais como as entidades clínicas importantes que influenciam a sobrevivência do candidato ao transplante hepático. A anormalidade vascular mais comum é a síndrome hepatopulmonar (SHP), que ocorre quando há dilatação vascular intrapulmonar que prejudica a oxigenação arterial (FALLON e ABRAMS, 2000).

A SHP é classicamente definida como um desequilíbrio no gradiente alvéolo-arterial ($Aa-PO_2$) em ar ambiente (>15 mmHg) com ou sem

o hipoxemia, resultante da vasodilatação intrapulmonar na presença do disfunção hepática e/ou hipertensão portal (RODRIGUEZ-ROISIN et al., 2004). Recentemente a SHP pode ser observada em pacientes com hipertensão portal na ausência de cirrose (trombose da veia porta, hiperplasia regenerativa nodular, fibrose hepática congênita) e também tem sido relatada em pacientes que apresentam hepatite crônica na ausência de hipertensão portal (GUPTA et al., 2001; REGEV et al., 2001).

Estudos prévios demonstraram que a indução de cirrose biliar secundária, através da ligadura de ducto biliar comum (LDBC) (TIEPPO et al., 2005; VERCELINO et al., 2008) simula a doença humana pelas alterações provenientes da reação inflamatória causada pelo refluxo biliar e a consequente desorganização da arquitetura natural do parênquima, com áreas inflamatórias e de deposição

de colágeno e formação de fibrose (KOUNTOURAS, BILLING e SCHEUER, 1984).

Experimentalmente, o modelo de ligadura de ducto biliar é o único modelo que identifica as características da síndrome hepatopulmonar. Fallon e colaboradores demonstraram que a ligadura de ducto biliar é um modelo para o estudo da SHP, com os animais cirróticos a partir de 4 semanas, quando já apresentam 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 (FALLON et al., 1997; TIEPPO et al., 2005).

A S-Nitroso-N-Acetilcisteína (SNAC) é um S-nitrosotiol (RSNOs) e atua como doador de óxido nítrico e tem potentes aplicações biomédicas. Os RSNOs são moléculas carregadoras de NO que, além de permitirem a liberação de NO, têm ações diretas e ainda realizam S-transnitrosação e S-tiolação, o que as torna diferentes de outros doadores de NO. A S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) constitui um exemplo de RSNO que pode ser empregado como fonte exógena de NO. Os RSNOs são considerados agentes terapêuticos em uma variedade de doenças no qual o NO pode estar envolvido. O principal papel intracelular dos RSNOs pode estar relacionado à redução do estresse oxidativo (HOGG, 2002).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da SNAC na difusão de gases e na lipoperoxidação (LPO) pulmonar e hepática em ratos com LDBC, como modelo de SHP.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimento Experimental

Foram utilizados 10 ratos machos Wistar para cada grupo experimental (n=10 baseado em cálculo amostral), com peso médio de 250 gramas, provenientes da FEPPS. Os animais foram mantidos durante o experimento na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em caixas plásticas individuais, de 47x34x18cm, forradas com maravalha, em ciclo de doze horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas) e temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. A água e a ração foram administradas livremente e os animais foram tratados diariamente com água e ração Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil).

Os procedimentos com os animais serão de acordo com o preconizado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação de Clínicas de Porto Alegre.

Grupos Experimentais

O modelo utilizado foi de cirrose biliar secundária através de ligadura de ducto biliar comum (LDBC), e os animais foram divididos em 4 grupos:

1. *Sham Operated (SO)* - Grupo submetido à simulação da cirurgia, sem a LDBC e administração de Veículo (NaCl);
2. LDBC (LDBC) - Grupo submetido à cirurgia de LDBC;
3. *Sham Operated + SNAC (SO + SNAC)* - Grupo submetido à simulação da cirurgia de LDBC e tratamento com SNAC;
4. LDBC + SNAC (LDBC + SNAC) - Grupo submetido à cirurgia de LDBC e tratamento com SNAC.

Desenvolvimento do Modelo de Síndrome Hepatopulmonar pela Indução de Cirrose Biliar Secundária

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 a realização de tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida de laparotomia ventral média, e de dissecação do ducto biliar comum na altura da desembocadura dos ductos pancreáticos, ligados 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 fechados com pontos contínuos. Os animais se recuperaram da anestesia em caixas individuais forradas com maravalha em incubadora para recém-nascidos (FANEM - SP), antes de serem devolvidos a condição padrão da Unidade de Experimentação.

Os animais dos grupos SO não foram submetidos a LDBC, sendo realizada somente a manipulação do ducto simulando o estresse cirúrgico. Após 28 dias, da LDBC, os animais foram sacrificados.

Administração do Veículo e da SNAC

O tratamento com SNAC iniciou-se a partir do 14º dia do procedimento cirúrgico, diariamente, por via intraperitoneal, na dose 1,15 mg/Kg. Os animais SO receberam solução fisiológica (NaCl 0,9%) no volume de 1mL/ Kg de peso corporal, pela mesma via.

Morte dos Animais e Obtenção das Amostras de Tecido e Sangue

Transcorridos os 28 dias do desenvolvimento do modelo e 14 dias de administração da SNAC ou NaCl, conforme o grupo, os animais foram novamente pesados e anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg), intraperitonealmente. Primeiramente, foi coletado sangue pela técnica da punção de plexo venoso retro-orbital com tubo capilar de vidro, utilizado para avaliar integridade hepática por meio das análises das aminotransferases aspartato-aminotransferase (AST) e alanina-aminotransferase (ALT), e da fosfatase alcalina (FA).

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

As dosagens sanguíneas (Enzimas Hepáticas e Gasometria Arterial) foram realizadas no Laboratório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Dando continuidade, foram retirados o fígado e os pulmões, separados em 2 porções:

- 1º) A porção anterior do lobo inferior do pulmão direito foi emergida em formol 10% para posterior análise histológica;
- 2º) O fígado e o restante do pulmão foram pesados e congelados a -80°C para posteriores análises.

Avaliações Bioquímicas

Preparação do Homogeneizado

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^o 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 -80 °C para posteriores dosagens.

Determinação da Lipoperoxidação

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 provenientes 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, agitou-se cada tubo, os quais foram aquecidos à temperatura de 100^o C durante 15 minutos. Após, os tubos foram resfriados, e acrescentou-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).

Quimiluminescência

O método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (hidroperóxido de tert-butila) ao homogeneizado de tecido em estudo. Avalia-se a capacidade de resposta mediante a determinação de quimiluminescência (QL) produzida pela amostra.

A QL foi medida em um contador com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio (Liquid Scintillation Corenter, 1209 RACKBETA, LKB Wallar) operando como um luminômetro. Adiciona-se 3,5 mL de tampão fosfato em vials de vidro de 25 mm de diâmetro por 50 mm de altura. Para evitar a fosforescência dos vials ativada pela luz fluorescente, eles foram protegidos da luz até o momento do uso e as determinações feitas em sala escura. Primeiramente se realiza apenas a leitura dos vials com tampão (QL Basal). Após, adicionar 0,5 mL de homogeneizado de tecido e faz-se a leitura, que corresponde a QL espontânea. Em seguida, foi adicionado o hidroperóxido de *tert-butila* que aumenta a QL (QL Máxima). A reação

total consiste de uma solução reguladora de tampão fosfato e de t-BOOH 3 mM.

Para cálculo de QL, iniciada por t-BOOH, foi considerada a emissão máxima (QL Máxima), descontada a emissão da QL espontânea (a QL do vial contendo o tampão e a amostra). Os resultados foram expressos em contagem por segundo (cps) por mg de proteína (GONZALEZ-FLECHA et al., 1991).

Avaliação Anatomopatológica dos Tecidos

O teste anatomopatológico foi realizado no Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Após obtenção dos tecidos, as peças foram fixadas em blocos de parafina, a partir do qual foram realizados cortes com 3 micra em Micrótomo (Leitz®1512). Na fase de coloração, as lâminas foram mergulhadas nos corantes hematoxilina-eosina durante 5 minutos cada uma, intermediadas por um banho de água corrente. Na fase de desidratação, as estruturas passaram por três recipientes com álcool absoluto e por dois de xilol. Colocou-se a lamínula sobre a lâmina, finalizando o processo de preparação. As lâminas foram analisadas em microscópio binocular Nikon Labophot.

Análise 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 SPSS, versão 13.0, para Windows XP2000. Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Student-Newman-Keuls, sendo o nível de significância adotado de 5% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

A análise histológica do tecido pulmonar dos animais dos grupos controle (SO e SO+SNAC) demonstrou tecido pulmonar no padrão da normalidade e vasos com diâmetro usual (Figura 1A). Os animais do grupo LDBC apresentaram importante infiltrado inflamatório e aumento significativo no diâmetro dos vasos pulmonares (Figura 1B). O tratamento com a SNAC não reduziu o infiltrado inflamatório pulmonar nos animais do grupo LDBC+SNAC (Figura 1C), no entanto, os vasos apresentaram diâmetro usual, demonstrando que o tratamento com SNAC reduziu o diâmetro dos vasos nos animais tratados de forma a deixá-los de tamanho similar aos animais controles.

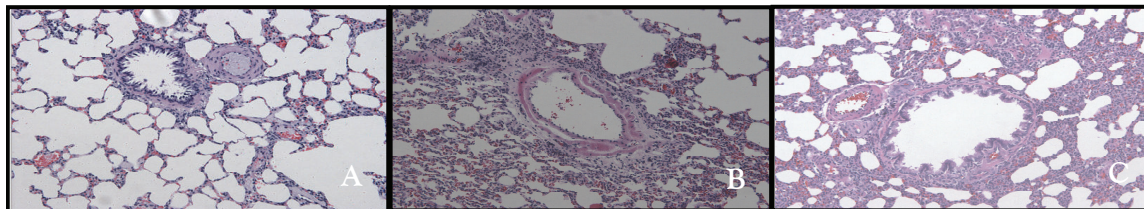


Figura 1 - Corte Histológico de tecido Pulmonar (HE). Aumento de 200x. (a) Animal controle: parênquima pulmonar normal. (b) Animal com ligadura de ducto biliar comum: vasos de diâmetro aumentado e parênquima pulmonar com infiltrado inflamatório. (c) Animal com ligadura de ducto biliar parênquima pulmonar, os vasos apresentam diâmetro semelhante ao do comum tratado com SNAC: apesar de mantido o infiltrado inflamatório no animal controle.

Os animais do grupo com ligadura de ducto biliar comum e sem tratamento apresentaram aumento significativo das provas de integridade hepática AST, ALT e FA (Tabela 1), em comparação com os demais grupos, demonstrando a efetividade do modelo em gerar dano hepático. O tratamento com SNAC em animais com LDBC reduziu significativamente os valores das provas de integridade hepática, entretanto ALT e FA se mantiveram elevados quando comparados aos grupos controle.

Tabela 1 - Provas de Integridade Hepática.

	AST	ALT	FA
<i>SHAM OPERATED</i>	111,86(±59,7)	42,7(±5,83)	110,43(±6,16)
<i>SHAM OPERATED+SNAC</i>	107,88(±9,7)	43,6 (±6,15)	125,13 (±27,66)
LDBC	386,3 (±8,49)*	159,2(±75,31)*	352,4(±132,89)*
LDBC+SNAC	280,78(±58,55)	83,6(±34,81)**	264,67(±82,5)**

Dados apresentados em média ± desvio padrão. (*) Diferença significativa em comparação com os demais grupos. (**) Diferença significativa em relação aos grupos *Sham operated* e *Sham operated+SNAC*.

Na avaliação da gasometria arterial, a pressão parcial de oxigênio (PaO₂), que demonstra a eficácia das trocas de oxigênio entre os alvéolos e os capilares pulmonares, se mostrou significativamente reduzida nos animais com ligadura de ducto biliar comum não tratados (Tabela 2), enquanto o tratamento com a SNAC manteve os níveis de PaO₂ do grupo LDBC+SNAC sem diferença significativa quando comparado aos grupos controle. Da mesma forma, a saturação de oxigênio da hemoglobina (SatO₂/Hb) que se apresentou significativamente diminuída nos animais do grupo LDBC (Tabela 2), teve níveis comparáveis aos controles nos animais do grupo SO+SNAC, demonstrando a efetividade dessa droga em melhorar a difusão de gases.

Tabela 2 - Avaliação da Gasometria Arterial.

	PaO ₂	SatO ₂ /Hb (%)
<i>SHAM OPERATED</i>	94,4(±1,7)	96,2(±1,8)
<i>SHAM OPERATED+SNAC</i>	98,4(±10,7)	97,4(±1,4)
LDBC	72,1(±14,1)*	83,9(±3,6)*
LDBC+SNAC	90,9(±11,1)	95,2(±2,9)

PaO₂ – pressão parcial de oxigênio (mmHg) e saturação de oxigênio da hemoglobina (%). Dados apresentados em média ± desvio padrão. (*) Diferença significativa em comparação com os demais grupos.

A lipoperoxidação demonstrou-se aumentada de forma significativa nos animais com ligadura de ducto biliar comum por ambas as técnicas utilizadas – TBARS e QL – no tecido pulmonar (Tabela 3) e no tecido hepático (Tabela 4). Não houve diferença na lipoperoxidação entre os demais grupos, evidenciando a capacidade do tratamento com a SNAC de gerar redução do dano causado por radicais livres.

Tabela 3 - Lipoperoxidação – Tecido Pulmonar.

	TBARS	QL
<i>SHAM OPERATED</i>	0,475(±0,12)	907,65(±142,43)
<i>SHAM OPERATED+SNAC</i>	0,468(±0,10)	903,94(±170,32)
LDBC	0,947(±0,17)*	1289,34(±220,18)*
LDBC+SNAC	0,550(±0,22)	923,45(±208,86)

TBARS (mmol.mg de proteína) e Quimiluminescência (cps.mg de proteína). Dados apresentados em média ± desvio padrão. (*) Diferença significativa em comparação com os demais grupos.

Tabela 4 - Lipoperoxidação – Tecido Hepático.

	TBARS	QL
<i>SHAM OPERATED</i>	0,346(±0,02)	502,97(±58,87)
<i>SHAM OPERATED+SNAC</i>	0,328(±0,04)	480,34(±79,27)
LDBC	0,624(±0,17)*	818,2(±86,89)*
LDBC+SNAC	0,452(±0,10)	554,40(277,34)

TBARS (mmol.mg de proteína) e Quimiluminescência (cps.mg de proteína). Dados apresentados em média ± desvio padrão. (*) Diferença significativa em comparação com os demais grupos.

DISCUSSÃO

A LDBC comum é um modelo estabelecido de dano hepático, assemelhando-se à atresia biliar, que se caracteriza por apoptose de hepatócitos, necrose, infiltrado linfocítico e, posteriormente por fibrose hepática (LEE et al., 2008). A obstrução do ducto biliar produz dano hepatocelular e resposta inflamatória. O acúmulo de sais biliares tóxicos no fígado gera apoptose e necrose de hepatócitos. O processo de regeneração celular determina a formação de tecido cicatricial, fibrose e cirrose (SCHMUCKER et al., 1990). A cirrose, que é o estágio mais avançado da fibrose hepática, leva a uma distorção do parênquima hepático associada com formação de septos e nódulos, alteração do fluxo sanguíneo e risco de insuficiência hepática (FRIEDMAN, 2008).

O modelo de LDBC, que determina cirrose biliar secundária é o único modelo de cirrose hepática que gera a síndrome hepatopulmonar, caracterizada por dilatações vasculares intrapulmonares que alteram a difusão arterial de gases (FALLON, et al., 1997; TIEPPO, et al., 2003; RODRÍGUEZ-ROISIN, et al., 2004; LEE et al., 2004). Nesse estudo, o modelo de ligadura de ducto biliar comum foi utilizado para a avaliação dos efeitos da administração da S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) sobre o dano hepático e sobre a difusão de gases nesses animais.

A análise histológica demonstrou aumento do diâmetro dos vasos pulmonares nos animais com LDBC. Tal achado confirma a efetividade do modelo em gerar a síndrome hepatopulmonar, com hipoxemia e vasodilatação intrapulmonar (FALLON, et al., 1997; TIEPPO, et al., 2003; RODRÍGUEZ-ROISIN, et al., 2004; LEE et al., 2004) que são geradas, nesse modelo, pelo aumento da produção de substâncias vasodilatadoras, principalmente o óxido nítrico (NO) (FALLON et al., 1997; ZHANG et al., 2003). O tratamento

com a SNAC foi capaz de reduzir o diâmetro dos vasos pulmonares, assim como melhorar a difusão de gases nos animais tratados.

Na avaliação das provas de integridade hepática pela quantificação das enzimas séricas, houve aumento significativo das transaminases AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanino aminotransferase) nos animais ligados, evidenciando a lesão e necrose celular no tecido rico nessas enzimas (BRANDÃO e MARRONI, 2001). A FA (fosfatase alcalina) também se apresentou significativamente elevada nos animais ligados, o aumento desproporcional da FA é sugestivo de colestase, indicando comprometimento hepatobiliar nos animais (BRANDÃO e MARRONI, 2001). Tais dados são compatíveis com outros trabalhos que utilizam o modelo de LDBC, indicando a afetividade do modelo em gerar comprometimento hepático (FALLON et al., 1997; MONTERO et al., 2005; VERCELINO et al., 2008, ZHANG et al., 2003).

Os animais cirróticos que receberam tratamento com SNAC apresentaram diminuição das provas de integridade hepática, mostrando o efeito hepatoprotetor dessa droga. Não há publicações utilizando a SNAC no modelo de LDBC. Entretanto, a SNAC foi utilizada na prevenção da esteato-hepatite não alcoólica (NASH), em animais com dieta pobre em colina e, apesar da eficácia na prevenção de NASH, não houve alteração nas provas de integridade hepática em nenhum dos grupos (OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008). Outra droga com poder antioxidante, a N-acetilcisteína também foi efetiva na redução das provas de integridade hepática em animais com LDBC (VERCELINO et al., 2008)..

Na avaliação da gasometria arterial, houve redução significativa da pressão parcial de oxigênio (P_{aO_2}) e da saturação da hemoglobina (Sat_{O_2}/O_2)

nos animais cirróticos não tratados, demonstrando a redução da efetividade das trocas gasosas e da afinidade de hemoglobina pelo oxigênio nesses animais. Tal fato ratifica os achados de diversos autores que utilizam o modelo de LDBC para avaliar as alterações pulmonares da cirrose hepática (FALLON et al., 1997; TIEPPO et al., 2003; RODRÍGUEZ-ROISIN et al. 2004; LEE et al., 2004). O tratamento com a SNAC foi capaz de melhorar a difusão de gases nos animais tratados.

A lipoperoxidação, avaliada pelas técnicas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e por Quimiluminescência (QL), mostrou-se aumentada no tecido hepático dos animais cirróticos. O aumento da lipoperoxidação pode estar associado ao aumento do estresse oxidativo, podendo ser explicado pela endotoxemia (gerada pelo aumento da translocação bacteriana no intestino do animal cirrótico) e pelo aumento dos ácidos biliares, que desequilibram a atividade da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria hepática, favorecendo a produção de espécies ativas de oxigênio (PASTOR et al., 1997).

Os animais tratados com SNAC apresentaram níveis de lipoperoxidação no tecido hepático semelhantes aos dos grupos controle, evidenciando o potencial antioxidante da droga. Em modelo de cirrose biliar secundária outras drogas com poder antioxidante também foram efetivas na redução da lipoperoxidação, como a quercetina e a melatonina (PASTOR et al., 1997; ESREFLOGLU et al., 2005). A SNAC mostrou-se igualmente efetiva na redução da lipoperoxidação pulmonar em modelo de NASH (OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

Na avaliação da lipoperoxidação pulmonar houve aumento significativo no grupo cirrótico em relação aos demais, o que pode ser justificado pela endotoxemia, característica da cirrose, que estimula

o acúmulo de macrófagos na microcirculação pulmonar, estimulando a produção de óxido nítrico (FALLON et al., 1997; ZHANG et al., 2003).

O tratamento com SNAC protegeu o tecido pulmonar dos animais contra o aumento da lipoperoxidação, provavelmente por atenuar o dano hepático e assim reduzir a formação de mediadores que determinam a complicação pulmonar.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Síndrome Hepatopulmonar é uma complicação pulmonar, mas não apresenta nenhuma modificação no parênquima desse órgão, sendo a alteração puramente vascular e gerada por mediadores produzidos pelo fígado cirrótico. Ou seja, qualquer tratamento para a SHP direcionado para o pulmão seria somente sintomático e o prejuízo na difusão de gases não seria totalmente corrigido. A administração da SNAC por via intragástrica permite que ela seja absorvida diretamente para a circulação porta, gerando efeito primariamente sobre o fígado doente. Ao atenuar a doença hepática, a produção de mediadores que induzam a complicação pulmonar será progressivamente reduzida, melhorando a difusão de gases e conseqüentemente a oxigenação sanguínea. A SNAC parece ser uma droga promissora para o tratamento da Síndrome Hepatopulmonar.

REFERÊNCIAS

- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzimology*, v. 52, p. 302-309, 1978.
- BRANDÃO, A.B.L.; MARRONI, C.A. Testes de função hepática. In: MATTOS, A.A. et al.

Compêndio de Hepatologia. 2. ed. São Paulo: Fundação BYK, 2001.

ESREFOGLU, M. et al. Protective effect of low dose of melatonin against cholestatic oxidative stress after common bile duct ligation in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n.13, p. 1951-1956, 2005.

FALLON, M.B. et al. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. 779-784, 1997.

FALLON, M.B.; ABRAMS, G.A. Pulmonary dysfunction in chronic liver disease. **Hepatology**, v. 32, p. 859-865, 2000.

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

GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 10, p. 93-100, 1991.

GUPTA, D. et al. Prevalence of hepatopulmonary syndrome in cirrhosis and extrahepatic portal venous obstruction. **American Journal of Gastroenterology**, v. 96, p. 3395-3399, 2001.

HOGG, N. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 42, p. 585-600, 2002.

KOUNTOURAS, J.; BILLING, B.H.; SCHUEER, P.J. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 65, p. 305-311, 1984.

LEE, S. et al. Reduction of hepatocellular injury after common bile duct ligation using omega-3 fatty acids. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 43, p. 2010-2015, 2008.

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. **Transplantation Proceedings**, v. 37, p.425-427, 2005.

OLIVEIRA, C.P. et al. Modulation of hepatic microsomal triglyceride transfer protein (MTP) induced by S-nitroso-N-acetylcysteine in ob/ob mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, p. 290-297, 2007.

OLIVEIRA, C.P. et al. Oral administration of S-nitroso-N-acetylcysteine prevents the onset of non alcoholic fatty liver disease in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, p. 1905-1911, 2006.

OLIVEIRA, C.P. et al. Prevention and reversion of nonalcoholic steatohepatitis in OB/OB mice by S-nitroso-N-acetylcysteine treatment. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 27, p. 299-305, 2008.

PASTOR, A. et al. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats/; effects of N-acetylcysteine. **Journal of Hepatology**, v. 27, p. 363-370, 1997.

REGEV, A. et al. Transient hepatopulmonary syndrome in a patient with acute hepatitis A. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 8, p. 83-86, 2001.

ROBERTS, D.N.; ARGUEDAS, M.R.; FALLON, M.B. Cost-effectiveness of screening for hepatopulmonary syndrome in liver

transplant candidates. **Liver Transplantation**, v. 13, p. 206-214, 2007.

RODRIGUEZ-ROISIN, R. et al. Pulmonary-hepatic vascular disorders (PHD). **European Respiratory Journal**, v. 24, p. 861-880, 2004.

SCHMUCKER, D.L. et al. Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. **Hepatology**, v. 12, p. 1216-1221, 1990.

TIEPPO, J. et al. Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxi-

dativa stress. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 42, p. 244-248, 2005.

VERCELINO, R. et al. N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 102, p. 370-376, 2008.

ZHANG, X.J. et al. Intrapulmonary vascular dilatation and nitric oxide in hypoxemic rats with chronic bile duct ligation. **Journal of Hepatology**, v. 39, p. 724-730, 2003.