

SEGIRSON DE FREITAS JUNIOR

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

***EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DA VITAMINA A SOBRE O
CONTEÚDO DE COLÁGENO NO FÍGADO DE RATOS
SUBMETIDOS À OBSTRUÇÃO BILIAR EXTRA-HEPÁTICA***

CAMPINAS

2001



SEGIRSON DE FREITAS JUNIOR

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da
FCM/UNICAMP, para obtenção do título de
Mestre em Cirurgia do Médico, **SEGIRSON
DE FREITAS JÚNIOR**.

Campinas, 09 de maio de 2001.



Prof. Dr. Luiz Sérgio Leonardi

***EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DA VITAMINA A SOBRE O
CONTEÚDO DE COLÁGENO NO FÍGADO DE RATOS
SUBMETIDOS À OBSTRUÇÃO BILIAR EXTRA-HEPÁTICA***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em Cirurgia,
área de Cirurgia.*

Orientador: Prof. Dr. Luiz Sérgio Leonardi

CAMPINAS

2001

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

F884e Freitas Junior, Segirson
Efeitos da administração da vitamina A sobre o conteúdo de colágeno no fígado de ratos submetidos à obstrução biliar extra-hepática / Segirson Freitas Junior. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Luiz Sérgio Leonardi
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Vitamina A. 2. Cirrose Hepática. 3. Colágeno. I. Luiz Sérgio Leonardi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ SÉRGIO LEONARDI

MEMBROS:

1.

2.

3.

4.

Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

DATA:

DEDICATÓRIA

*À Gisleine, querida companheira e amada esposa,
A meus pais, Segirson e Maria Deize, com orgulho e gratidão,
A meus filhos Gabriela, Vitor e Isabela,
alegrias em minha vida,
A meus irmãos: Maurício, o artista,
e Fábio,
A Deus*

Ao Prof. Dr. Luiz Sérgio Leonardi (Prof. Titular do Departamento de Cirurgia, Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestivo – FCM UNICAMP), meu orientador, a quem agradeço pela oportunidade de ser seu aluno;

Ao Prof. Dr. Joaquim Murray Bustorff-Silva (Coordenador da Disciplina de Cirurgia Pediátrica da FCM – UNICAMP), pelo decisivo apoio, exemplo e amizade.

Ao Prof. Dr. Orlando Castro e Silva Junior (Prof. Associado do Departamento de Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP), pela amizade e pelo apoio imprescindível para este trabalho;

Ao Prof. Dr. José Merzel (Professor do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP), pela orientação na metodologia do estudo morfométrico computadorizado das lâminas, e uso do equipamento de análise de imagens, adquirido com auxílio da FAPESP (Proc. 96 / 07166-4).

Ao Prof. Dr. Sérgio Roberto Perez Line (Professor Livre-Docente do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP), pelo apoio logístico, sugestões no desenvolvimento da pesquisa e orientação na coloração com Picrossírius;

Ao Prof.Dr. Pedro Duarte Novaes (Professor do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP), pelas sugestões no preparo histológico do tecido hepático;

À Dra. Mônica Machado Duarte (Pós-graduanda do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP), pelo apoio e sugestões na utilização do computador para o estudo morfométrico das lâminas;

À Biomédica Gracinda de Lourdes Jorge, do Laboratório Experimental da Unidade de Fígado e Transplante Hepático do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da UNICAMP, pela disponibilidade, colaboração técnica, experiência e incentivo durante todo o trabalho;

À Clarice Fleury Franco, especialista em análises bioquímicas do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, pelo inestimável apoio à realização de dosagens histológicas da hidroxiprolina hepática, eletroforese de proteínas e gama-GT;

Aos amigos Dr. Antônio César Colombo e Dr. Rogério Amalfi, pela paciência, apoio e consideração;

Ao amigo Dr. Antônio Sérgio Aloisi, pelo incentivo contínuo, motivação e estímulo para a pesquisa;

Ao Prof.Dr. Celso Paulino, pela motivação e amizade;

À Prof.^a Dr.^a Eliana C. de Faria e à Prof.^a Dr.^a Maria Helena S. Kraemer, do Departamento de Patologia Clínica da FCM – UNICAMP, por terem possibilitado a realização dos exames bioquímicos;

Aos meus professores e colegas da Disciplina de Cirurgia Pediátrica da Unicamp, Dr. Edison Rissato de Oliveira, Dr. Shoji Miyabara, Dr. Antônio Gonçalves de Oliveira Filho, Prof.Dr. Lourenço Sbragia Neto, pela amizade e responsabilidade em minha formação profissional; e ao Dr. Márcio Miranda, pela amizade e incentivo;

Ao Sérgio Paulo de Magalhães e à Gisele Clotilde Ferreira, técnicos do Laboratório de Anatomia Patológica do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da UNICAMP, pelo preparo dos blocos dos fragmentos hepáticos em parafina;

À Ivani Odas Demétrio e à Maria Aparecida Santiago Varella, técnicas do Laboratório do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pelo imprescindível auxílio na confecção das lâminas e coloração com Picrossírius.

Aos amigos William Adalberto Silva e Ana Cristina de Moraes, pela disponibilidade e consideração;

À FAEP, pelo financiamento de parte dos exames bioquímicos.

	PÁG.
RESUMO	xix
1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVO	33
3. METODOLOGIA	37
3.1. Animais e ambiente de experimentação.....	39
3.1.1. Caracterização da amostra.....	39
3.1.2. Ambiente de experimentação.....	39
3.1.3. Delineamento experimental.....	39
3.1.3.1. Estudo piloto.....	39
3.1.3.2. Distribuição dos grupos.....	40
3.2. Anestesia e procedimento cirúrgico.....	40
3.2.1. Anestesia.....	40
3.2.2. Procedimento cirúrgico.....	41
3.2.3. Cuidados pós-operatórios.....	43
3.3. Sacrifício e coleta de material para análises.....	43
3.4. Avaliação bioquímica do sangue.....	44
3.4.1. Fosfatase alcalina.....	44
3.4.2. Bilirrubinas total, direta e indireta.....	45
3.4.3. Gamaglutamil transferase.....	45
3.4.4. Proteína total e frações α 1-globulina, α -2 globulina, β -globulina, γ -globulina e albumina.....	45

3.4.5. Hematócrito.....	45
3.4.6. Aspartato aminotransferase.....	46
3.4.7. Alanina aminotransferase.....	46
3.5. Quantificação estereológica do colágeno.....	46
3.5.1. Coloração pelo picrossirius (Sirius Red F3BA).....	46
3.5.2. Histomorfometria.....	46
3.6. Dosagem de hidroxiprolina hepática.....	47
3.7. Análises estatísticas.....	47
4. RESULTADOS.....	49
4.1. Hidroxiprolina.....	51
4.2. Quantificação estereológica do colágeno.....	52
4.3. Análise bioquímica do sangue.....	55
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÕES.....	71
7. SUMMARY.....	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
9. ANEXOS.....	95

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ALB	albumina
ALT	alanina aminotransferase
ANOVA	análise de variância
AST	aspartato aminotransferase
BD	bilirrubina direta
BI	bilirrubina indireta
BT	bilirrubina total
C	controle
CCL4	tetracloreto de carbono
Colág	colágeno
DP	desvio-padrão
EPM	erro-padrão da média
FA	fosfatase alcalina
g	grama
G / DL	grama por decilitro
GGT	gamaglutamil transferase
Hidroxiprol	hidroxiprolina
Htc	hematócrito
M	Mol
M	média
MG / DL	miligramas por decilitro
MM	milímetro

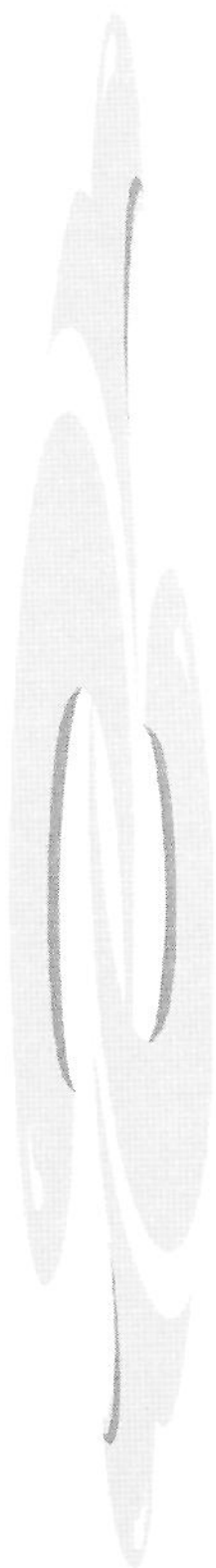
n	número
OB	grupo obstrução biliar
OS	grupo operação simulada (<i>SHAM</i>)
OV	grupo obstrução biliar + administração de vitamina A
PO	pós-operatório
PT	proteínas totais
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
TGFβ	fator transformador do crescimento beta (<i>transforming growth factor beta</i>)
U / L	unidades por litro
VA	vitamina A
α ₁	alfa -1
α ₂	alfa - 2
β	beta
γ	gama
μm ²	micrômetro quadrado
μm ³	micrômetro cúbico

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1: Valores de hidroxiprolina e colágeno.....	51
Tabela 2: Valores das dosagens bioquímicas do sangue.....	55

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1: Ducto hepático dissecado.....	42
Figura 2: Ducto hepático fixo por interposição de cateter.....	42
Figura 3: Aspecto do fígado, 5 semanas após obstrução biliar.....	44
Figura 4: Representação gráfica dos valores individuais de hidroxiprolina hepática.....	52
Figura 5: Representação gráfica dos percentuais de colágeno.....	53
Figura 6: Aspecto microscópico do fígado, em um animal do grupo OB.....	54
Figura 7: Aspecto microscópico do fígado, em um animal do grupo OV.....	54
Figura 8: Aspecto microscópico do fígado, em um animal do grupo OS.....	54



RESUMO

A cirrose hepática está entre as principais causas de morte no mundo todo, podendo ser provocada por diversas condições, tais como o alcoolismo, hepatite crônica, obstrução biliar, hemossiderose e outras doenças mais raras. Em crianças, a atresia de vias biliares constitui importante causa de cirrose hepática, sendo responsável por mais de 50 % dos transplantes hepáticos, nessa faixa etária. Apesar de apresentar toxicidade clínica, quando administrada cronicamente, a vitamina A tem sido implicada como fator de proteção hepática contra o surgimento de cirrose em modelos experimentais com tetracloreto de carbono, dimetilnitrosamino, e na cirrose induzida por soro heterólogo em ratos. Foi demonstrado também, que a privação da vitamina A resulta em piora da fibrose hepática nesses modelos experimentais. Com o propósito de determinar se a vitamina A pode interferir no processo de fibrose hepática por colestase, a mesma foi administrada a ratos submetidos à obstrução biliar, e comparados com ratos submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico sem vitamina A adicional. O presente estudo tem como objetivo a estimativa da fibrose hepática por meio da quantificação estereológica do colágeno e bioquímica da hidroxiprolina tecidual do fígado de ratos, submetidos à obstrução biliar que receberam vitamina A adicional.

Foram utilizados 40 ratos, divididos em 3 grupos: Grupo Obstrução Biliar (OB): submetidos à obstrução do ducto biliar comum; Grupo Obstrução Biliar + Vitamina A (OV): submetidos à obstrução do ducto biliar comum e que receberam injeções subcutâneas de vitamina A nos períodos pré e pós – operatórios; Grupo Operação Simulada - sham (OS): submetidos à laparotomia e manipulação suave das vias biliares apenas. Foram feitas análises bioquímicas dos índices de hidroxiprolina hepática e histológicas do colágeno total em fragmentos hepáticos e também dosagens séricas bioquímicas de fosfatase alcalina, bilirrubinas, GGT, transaminases e eletroforese de proteínas, dentro de 5 semanas do período pós-operatório. Os ratos colestáticos que receberam vitamina A apresentaram índices de hidroxiprolina ($\mu\text{g} / 100 \text{ mg}$ de tec. hepático seco) e volumetria do colágeno (%) menores que seus controles que não receberam vitamina A, sendo as médias \pm EPM, respectivamente, do grupo OB: $330,25 \pm 28,23$ e $12,86 \pm 0,86$; do grupo OV: $209,38 \pm 14,47$ ($p < 0,001$), e $8,72 \pm 1,26$ ($p < 0,01$). Não houve diferença entre os níveis séricos de fosfatase alcalina, bilirrubinas e gamaglutamil transferase dos animais obstruídos que receberam ou não a vitamina A ($p < 0,05$). Os níveis séricos de alanina

aminotransferase e aspartato aminotransferase foram maiores nos ratos obstruídos que receberam vitamina A do que em seus controles obstruídos que não a receberam ($p < 0,05$, e $p < 0,05$, respectivamente).

Em vista dos resultados obtidos, conclui-se que a administração de vitamina A diminui de forma significativa a fibrose hepática em ratos submetidos a este modelo de obstrução biliar.



1. INTRODUÇÃO

O conjunto de funções do fígado compreende a manutenção da homeostase metabólica do organismo, incluindo o processamento dos aminoácidos, carboidratos, lipídios e vitaminas; fagocitose de partículas materiais da circulação esplâncnica, síntese de proteínas séricas, biotransformação de metabólitos circulantes, detoxificação e excreção na bile de produtos catabólicos endógenos e poluentes xenobióticos (CRAWFORD, 1994). Entre os cordões de hepatócitos estão localizados os sinusóides vasculares, de forma que os hepatócitos têm os dois lados banhados pelo sangue portal e arterial. Os sinusóides são revestidos por células endoteliais fenestradas e descontínuas, com alta capacidade de endocitose. Além deste tipo particular de célula endotelial, existem outros tipos de células no estroma hepático: célula de Kupffer, célula estrelada (de Ito), "pit cell", células mesenquimais do tecido perivascular e do tecido conjuntivo capsular (BHUNCHET & WAKE, 1992, WISSE *et al.*, 1985, WISSE *et al.*, 1996). Discretas quantidades de material semelhante a uma lâmina basal com colágeno tipo IV estão presentes, (WISSE *et al.*, 1985, WISSE *et al.*, 1996), formando um arcabouço de sustentação mecânica tecidual e um microambiente para hepatócitos e células do espaço de Disse (OHTANI, 1988).

As células de Ito são as principais células de armazenagem de vitamina A no organismo (HENDRIKS, BROUWER, KNOOK, 1987; BATRES & OLSON, 1987; BLOMHOFF & WAKE, 1991) além de serem também as principais produtoras de matriz extracelular hepática (BLOMHOFF & WAKE, 1991; CASU, CANEPA, NANNI, 1994; HAUTEKEETE & GEERTS, 1997). Estas células mesenquimais estão localizadas no espaço perisinusoidal de Disse e são dotadas de longos processos citoplasmáticos ramificados, com propriedades contráteis, que envolvem e circundam as células endoteliais dos sinusóides (BLOMHOFF & WAKE, 1991, KAWADA, 1997). Regulam assim o diâmetro destes vasos, controlando o fluxo sanguíneo e, do mesmo modo, o calibre e o fluxo dos canalículos biliares (CASU *et al.*, 1994).

A matriz extracelular (MEC) é constituída por macromoléculas organizadas em estrutura tipo intersticial ou membrana basal e sua função não é só de sustentação da célula, mas também a mediação de citocinas e de fatores de crescimento, que agem como sinais de interações inter-celulares e da célula com a própria matriz. Estas interações ocorrem para proliferação, diferenciação e migração da célula (ALBERTS & BRAY,

1997). Em geral, os principais componentes da MEC hepática são os vários tipos de colágeno, as glicoproteínas estruturais, os proteoglicanos e a elastina (BISSEL *et al.*, 1990; REIF *et al.*, 1990; CASU *et al.*, 1994). As células de Ito, ao serem *ativadas in vitro* (DE LEEUW *et al.*, 1984; GEERTS *et al.*, 1989; WEINER *et al.*, 1990; BARONI *et al.*, 1998), ou em situações de sofrimento ou dano tecidual hepático (MAK, LEO, LIEBER, 1984; MAK & LIEBER, 1988; FRENCH *et al.*, 1988; GEERTS *et al.*, 1991), diferenciam-se em miofibroblastos e tornam-se responsáveis pela superprodução do colágeno.

Estas células de Ito transativadas e transformadas em miofibroblastos caracterizam-se pela ausência de gotas lipídicas citoplasmáticas e pela expressão da proteína α -actina de músculo liso (SCHMITT-GRÄFF *et al.*, 1991; YAMAOKA *et al.*, 1993). Exibem nessa condição um alto índice de proliferação e sintetizam um amplo espectro de componentes de matriz extracelular que se acumulam no fígado. Segundo TSUKAMOTO, 1999, o processo de transativação e as propriedades mitogênicas subsequentes são estimulados por mecanismos parácrinos e autócrinos, envolvendo citocinas, com propriedades mitogênicas (que estimulam a proliferação celular) e fibrogênicas (que induzem à formação de proteínas matriciais). O mesmo autor relata também que os macrófagos hepáticos, células endoteliais, células do epitélio biliar, linfócitos, plaquetas, hepatócitos e células hepáticas estreladas (de forma autócrina) são fontes celulares de citocinas em potencial. A $TGF\beta$ é a principal citocina implicada na patogênese da fibrose hepática e cirrose, pois leva à ativação das células de Ito (OKUNO *et al.*, 1997), e altera a degradação da matriz extracelular suprimindo a produção de collagenase.

O estresse oxidativo, radicais livres derivados do oxigênio e peroxidação lipídica, têm também sido apontados como causa de fibrose hepática (BRITTON & BACON, 1994; LEE *et al.*, 1995; TSUKAMOTO *et al.*, 1995; PAROLA *et al.*, 1993; BARONI *et al.*, 1998), e as células de Ito podem ser ativadas por radicais livres, assim como pelo malondialdeído, um produto da peroxidação lipídica (LEE *et al.*, 1995). Foi demonstrado que a ativação das células de Ito pelo colágeno tipo I é bloqueada por antioxidantes, sugerindo que a peroxidação lipídica é importante no mecanismo de hepatofibrogênese (LEE *et al.*, 1995). A extensão da deposição de proteínas da matriz é modulada pela atividade da metaloproteinase no local da fibrogênese (ARTHUR, 1997).

Em suma, a fibrose hepática é, em grande parte, o resultado da ativação da célula de Ito, cujo principal efeito é a substituição da matriz extracelular hepática normal, de baixa densidade, por uma matriz extracelular cicatricial com acúmulo de seus constituintes (FRIEDMAN, 1999).

A formação de bile é uma função vital e o seu acúmulo hepático por drogas ou infecção, problemas auto-imunes, mecânicos, metabólicos ou genéticos, resulta em síndrome comumente denominada de colestase. A secreção biliar depende da função de um número de sistemas de transporte de membrana em hepatócitos e colangiócitos, e da integridade funcional e estrutural do aparelho secretor biliar (TRAUNER, MEIER, BOYER; 1998).

Na colestase extra-hepática ocorre uma distensão do sistema de canálculos biliares com proliferação ductal (SLOTT, LIU, TAVOLINI, 1990), solução de continuidade da zônula de oclusão que compartimentaliza a bile e passagem de seus constituintes para a circulação sistêmica (METZ *et al.*, 1977). Segundo CASTRO E SILVA JR. *et al.*, 1998, a retenção de ácidos biliares, lecitina e bilirrubinas no parênquima hepático, produz efeitos tóxicos no meio intracelular. Na colestase extra-hepática, ocorre também queda do fluxo sanguíneo portal, que leva a uma isquemia funcional. A diminuição dos níveis hepáticos da vitamina E, a isquemia funcional e a impregnação hepática pelos sais biliares e bilirrubinas levam a um aumento dos níveis de substâncias oxidantes (como o malonaldeído) e redução de enzimas anti-oxidantes (como a glutathione, a glutathione peroxidase e a glutathione transferase) implicando num aumento tecidual de radicais livres, altamente lesivos às membranas hepatocelulares pela peroxidação lipídica que produzem.

A vitamina A tem sido implicada na manutenção, diferenciação e proliferação celular de diversos tecidos (GOODMAN, 1984). Embora, quando administrada em grande quantidade e por tempo prolongado apresente toxicidade sistêmica e hepática (RUSSELL, BOYER, BAGHERI, 1974; MALLIA, SMITH, GOODMAN, 1975; LEO *et al.*, 1982; GOODMAN, 1984; LEO & LIEBER, 1988), evidências do benefício de sua utilização têm sido obtidas em diversos modelos experimentais de fibrose hepática. Segundo BLANER & OLSON, 1994, o retinol derivado do intestino é incorporado aos quilomícrons após esterificação para retinil ésteres. Após absorção e liberação para a circulação, estes

quilomícrons com retinil-ésteres são captados pelos hepatócitos, convertidos a retinol, transferidos ao retículo endoplasmático, e ligados à proteína de ligação ao retinol, sendo então a maior fração deste complexo captada pelas células de Ito, e aí reconvertidos a retinil-éster. Assim, as células de Ito são caracterizadas por grandes quantidades de retinil-éster estocado em gotas lipídicas citoplasmáticas, em sua forma quiescente. Quando grandes doses de vitamina A são administradas, o número e tamanho das gotículas de gordura aumentam consideravelmente, e as células de Ito tornam-se maiores e mais proeminentes histologicamente (WAKE, 1980).

Em muitas doenças e situações de lesão hepática, como na intoxicação por etanol (SATO & LIEBER, 1981; LEO *et al.*, 1982), por CCL4 (YAMANE *et al.*, 1993; SEIFERT *et al.*, 1994) e na cirrose, ocorre uma redução da vitamina A total (LEO, SATO, LIEBER, 1983). Os mecanismos envolvidos parecem ser a depleção das células de Ito ao se tornarem ativadas (CASU *et al.*, 1994) e as alterações do metabolismo desta vitamina. Sabe-se também, que a colestase crônica leva à má absorção de vitamina A, com baixos níveis hepáticos desta (ANDREWS *et al.*, 1981; AMÉDÉE-MANESME *et al.*, 1987; KAUFMAN *et al.*, 1987; AMÉDÉE-MANESME *et al.*, 1988; FUKUI *et al.*, 1993; BORGES, BRAGA, PETROIANU, 1998), e redução da síntese de proteínas que realizam o seu transporte no plasma (IMAMINE *et al.*, 1996). Foi demonstrado *in vitro* que o retinol e a matriz extracelular podem influenciar a produção e o fenótipo de colágeno pela célula de Ito (DAVIS, PRATT, MADRI, 1987). Muitos estudos (SHIRATORI *et al.*, 1987; DAVIS & VUCIC, 1988) têm demonstrado que a adição de retinóide pode levar à diminuição da síntese de colágeno e de vários outros componentes da matriz extracelular pelas células de Ito isoladas e submetidas ao processo de transdiferenciação *in vitro*. Ainda mais significativo, é a reversão do fenótipo miofibroblástico àquele de lipócito em cultura celular acrescida de vitamina A (DAVIS, KRAMER, DAVIDSON, 1990; MARGIS & BOROJEVIC, 1989).

SENOO & WAKE, 1985, administraram vitamina A, na forma de palmitato de retinil, em altas doses, a ratos que receberam CCL4 ou soro heterólogo de porco. Verificaram que houve supressão da fibrose hepática, porém sem ação protetora contra a hepatotoxicidade causada pelo tetracloreto de carbono. As células de Ito dos ratos que

receberam vitamina A tiveram uma tendência a manter seu fenótipo quiescente, repletas de gotas lipídicas no citoplasma, não assumindo o fenótipo de miofibroblasto. Assim, sugeriram que esse efeito antifibrogênico se deva à ação da vitamina A sobre as células de Ito.

CHEHTER *et al.*, 1988, verificaram que a administração prévia de vitamina A em ratos, em que a fibrose hepática foi induzida por CCL4, resultou em significativa redução dos valores de colágeno hepático e na fibrose hepática histologicamente avaliada.

PARISE *et al.*, 1992, verificaram que o tratamento prévio com palmitato de retinil reduz o depósito de colágeno hepático e modifica a deposição de glicosaminoglicanos sulfatados no fígado, e pode inibir ou retardar o desenvolvimento de cirrose hepática em ratos tratados cronicamente com CCL4.

Há importante correlação entre a vitamina A total hepática e a indução da fibrose hepática. YAMANE *et al.*, 1993, demonstraram que na fibrose hepática induzida por CCL4 ocorre uma diminuição progressiva do conteúdo total de vitamina A no fígado, com aumento proporcional dos níveis de retinol e redução dos níveis de palmitato de retinil, correlacionados à elevação do conteúdo de colágeno. SEIFERT *et al.*, 1994, em estudo experimental, demonstraram que o *status* da vitamina A no fígado tem um efeito modulador sobre a indução da fibrose hepática por CCL4. Nos ratos com baixos níveis hepáticos de retinóides, a fibrogênese foi acelerada e intensificada, comparada aos ratos com níveis normais de retinóides.

Visando o benefício do uso dos retinóides e para contornar o problema da toxicidade de seu uso excessivo, SEIFERT *et al.*, 1995, evidenciaram o mesmo efeito antifibrogênico no fígado de ratos que receberam CCL4 e tratados com beta-caroteno oral, sem os inconvenientes da toxicidade da vitamina A em sua forma ativa. Demonstraram também que a administração de β -caroteno poderia prevenir a perda prolongada de retinóides pela lesão hepática por CCL4. Neste estudo, nenhum efeito tóxico significativo por beta-caroteno, como previamente foi encontrado com o uso de retinil-ésteres (SEIFERT *et al.*, 1989) foi observado, sugerindo que essa forma de pró-vitamina A tem um potencial terapêutico para reduzir a fibrose hepática sem apresentar a toxicidade da hipervitaminose A.

Sobre o mecanismo de ação antioxidante da vitamina A, MIZOBUCHI *et al.*, 1998, verificaram que o tratamento com palmitato de retinil prévio ou posterior à administração de dimetilnitrosamino ou soro heterólogo de porco inibiu a peroxidação induzida na mitocôndria do fígado de rato, evitou o aumento dos níveis hepáticos de malondialdeído e do número de células de Ito ativadas, suprimindo a produção de colágeno e da fibrose hepática, sugerindo que, ao menos em parte, isto se deva à inibição da ativação dessas células.

Segundo MAVIER & MALLAT, 1995, várias intervenções farmacológicas podem ser aplicadas a diferentes níveis da cascata fibrogênica do fígado:

- 1) inibição da transativação da célula de Ito;
- 2) inibição da proliferação dos miofibroblastos derivados das células de Ito e da síntese da matriz extracelular;
- 3) estimulação da degradação da matriz protéica;
- 4) inativação de citocinas pró-fibrogênicas.

Segundo esses autores, os retinóides poderiam ser úteis na inibição da cascata fibrogênica, inibindo a transativação da célula de Ito, uma vez que ocorre a perda da vitamina A estocada durante esse processo, porém consideram não estar clara ainda essa relação.

Está, assim, bem demonstrado, na literatura, a supressão da síntese de colágeno pela vitamina A, administrada em modelos experimentais de indução de cirrose hepática, como a intoxicação de ratos por tetracloreto de carbono, administração de dimetilnitrosamino, ou de soro heterólogo (de porco) em ratos. Em outros modelos experimentais, como na infestação de ratos por *Schistosoma mansoni*, a administração de vitamina A não alterou o processo da fibrose (BARBOSA JUNIOR, PFEIFER, ANDRADE, 1993). LEO *et al.*, 1982, verificaram que a combinação da vitamina A em altas doses e etanol resultou em lesões hepáticas marcantes, com mitocôndrias gigantes, contendo inclusões paracristalinas e depressão do consumo de oxigênio no hepatócito.

Estudos associando administração crônica de Etanol juntamente com vitamina A, produziram resultados controversos como acentuação da hepatotoxicidade, indução de fibrose hepática e cirrose no rato (LEO & LIEBER, 1983) ou inconclusivos, atribuindo-se as divergências às diferentes susceptibilidades das raças utilizadas (BOSMA *et al.*, 1991; SEIFERT *et al.*, 1991). Na intoxicação por vitamina A ocorre hipertrofia e proliferação das células hepáticas estreladas e de células similares aos miofibroblastos, que podem levar à hipertensão portal não cirrótica, fibrose e cirrose hepáticas (RUSSEL *et al.*, 1974; JACQUES, BUSCHMANN, LAYDEN, 1979; LEO & LIEBER, 1988; HORSMANS, RAHIER, GEUBEL, 1995; HAUTEKEETE & GEERTS, 1997). Como a hipervitaminose A pode induzir fibrose hepática em seres humanos, mais estudos são necessários para investigar o emprego da vitamina A em pacientes com doença hepática crônica.

Em crianças, uma das principais causas de cirrose hepática é a colestase extra-hepática, secundária à atresia de vias biliares (ROWE *et al.*, 1995; PUIGDEVALL & D'AGOSTINO, 1998). Esta patologia, de etiologia não bem definida, é curável, cirurgicamente, em até 30 % dos casos. No entanto, mais de 70 % ainda irão necessitar de transplante hepático em alguma época da vida, em razão da fibrose hepática progressiva e da cirrose terminal. A atresia de vias biliares extra-hepática constitui mais de 50 % das indicações de transplante hepático na faixa etária infantil. Em adultos, a cirrose biliar pode ser primária ou causada por muitas condições patológicas, como a litíase biliar, neoplasias, iatrogenia e colangite esclerosante. Muitos pacientes, no mundo todo, aguardam em longas listas à espera de um doador de fígado, enquanto ocorre a piora progressiva da fibrose, piora da hipertensão portal e da insuficiência hepática. Grandes desafios impõem-se para bloquear a progressão da fibrose hepática, e assim tem sido estudado o potencial de hepatoproteção de muitas drogas.

Não encontramos, até o momento, relato na literatura, descrevendo a influência da vitamina A em modelo experimental de fibrose hepática por indução de colestase no rato.

Considerando-se o efeito de proteção hepática contra a fibrose hepática nos referidos modelos experimentais, o presente trabalho analisa a influência da vitamina A sobre o conteúdo de colágeno hepático durante a colestase por obstrução biliar, bem como alterações bioquímicas produzidas nesse modelo experimental.

Os modelos com CCL4, soro heterólogo e dimetilnitrosamino não simulam o processo de cirrose humana de forma tão adequada como a cirrose biliar induzida pela obstrução das vias biliares. Assim, foi concebido testar a ação da vitamina A em modelo de indução da fibrose hepática por colestase, pela obstrução do ducto biliar comum.



2. OBJETIVO

O objetivo é estudar a influência da vitamina A sobre a fibrose hepática induzida por obstrução biliar em ratos.



3. METODOLOGIA

3.1. ANIMAIS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

3.1.1. Caracterização da amostra:

Foram utilizados para este estudo 50 ratos machos, *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, peso inicial entre 100 e 180 g e com idade entre 43 e 47 dias, fornecidos pelo Núcleo de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas.

3.1.2. Ambiente de experimentação:

Todos os animais receberam os mesmos cuidados pré e pós-operatórios, ou seja, gaiolas coletivas abrigaram o 1.º, 2.º, 3.º, 4.º e 5.º grupos, nas mesmas condições ambientais, com ciclo dia-noite, temperatura e umidade do ambiente geral, sem regulação artificial. A alimentação constou de ração rotineira para roedores, NUVITAL® - NUVILAB CR-1, fabricada por Nuvital Nutrientes LTDA – Curitiba – PR.

Receberam água *ad libitum*, sem nenhum acesso nutricional suplementar além da vitamina A, determinada para os grupos específicos, conforme descrição abaixo, durante todo o experimento. Nas 12 horas pré-operatórias, para a laparotomia e para o sacrifício, os animais permaneceram em jejum absoluto.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em ambiente limpo, não asséptico, no Laboratório de Transplante Hepático do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

3.1.3. Delineamento experimental

3.1.3.1. Estudo Piloto

Objetivo: conhecer o efeito da vitamina A na dose a ser empregada, em ratos normais. Foram distribuídos, aleatoriamente, 10 ratos em 2 grupos:

Grupo vitamina A (VA): 6 ratos que receberam 50.000 IU de palmitato de retinil (Arovit; Roche. São Paulo, Brasil) por via subcutânea, 2 vezes por semana, por 7 semanas, e sacrificados.

Grupo controle normal (C): 4 ratos que foram sacrificados, sem se submeterem à laparotomia ou ao tratamento com vitamina A adicional.

Os dados estão apresentados em Apêndice.

3.1.3.2. Distribuição dos grupos:

Foram distribuídos, aleatoriamente, 40 ratos em 3 grupos:

Grupo obstrução biliar (OB): 12 ratos foram, inicialmente, submetidos à laparotomia e à obstrução do ducto biliar comum, e sacrificados 5 semanas após a cirurgia.

Grupo operação simulada (OS): 15 ratos foram submetidos à laparotomia e à dissecação limitada apenas do ducto hepático, sendo sacrificados 5 semanas após a cirurgia.

Grupo obstrução biliar + vitamina A (OV): 13 ratos, inicialmente, receberam 50.000 IU de palmitato de retinil (Arovit; Roche. São Paulo, Brasil) por via subcutânea, 2 vezes por semana, por 2 semanas, seguido de laparotomia e obstrução do ducto biliar comum, com mesma dose de vitamina A de manutenção, 2 vezes por semana, e sacrificados 5 semanas após a cirurgia.

3.2. ANESTESIA E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

3.2.1. Anestesia

Os animais foram submetidos à anestesia inalatória com éter dietílico em campânula fechada, sendo considerados anestesiados ao apresentarem flacidez de musculatura esquelética, ausência de reflexos de dor, respiração regular, boa perfusão capilar e oxigenação. O nível satisfatório de anestesia foi mantido mediante inalação contínua de éter dietílico, embebido em chumaço pequeno de algodão, localizado no interior de frasco de acrílico.

3.2.2. Procedimento cirúrgico:

O grupo OS foi submetido apenas à laparotomia com manipulação suave do ducto biliar, sem realizar obstrução, e os grupos OB e OV foram submetidos à obstrução de vias biliares extra-hepáticas, segundo JORGE, 2000:

- a) Imobilização do animal anestesiado em decúbito dorsal, sobre prancha cirúrgica apropriada, pela fixação de seus membros com esparadrapo;
- b) Tricotomia abdominal anterior e anti-sepsia com solução de iodo polivilpirrolidona 2 % (Indústria Brasileira – Rio de Janeiro, RJ);
- c) laparotomia mediana, com incisão de cerca de 1,5 cm de extensão, a partir do apêndice xifóide;
- d) Abordagem do hilo hepático, seguido de identificação e isolamento do ducto biliar, por dissecação, a partir de 1 cm acima da junção bileo-pancreática, até próximo à sua bifurcação;
- e) Isolamento do ducto biliar na emergência justa-pancreática, deixando-se, aproximadamente, 1 cm de ducto livre, reparado com fio de polipropileno n.º 4-0 (Figura 1);
- f) Exposição e perfuração do apêndice xifóide com marcador de orelha de rato, seguido de introdução de uma pinça hemostática de microcirurgia através do orifício e captura do fio de polipropileno n.º 4-0 e do ducto hepático;
- g) Exposição do ducto biliar através do orifício do apêndice xifóide, formando-se uma alça com o ducto;
- h) Introdução de cateter Levine siliconizado n.º 8, seccionado numa extensão de 1,5 cm, sob a alça de ducto biliar;
- i) Fixação das extremidades deste cateter à aponeurose abdominal com polipropileno 4-0;
- j) Laparorrafia, usando-se fio agulhado de polipropileno 4-0, com sutura contínua, deixando-se o ducto biliar sobre o cateter de Levine exposto sobre a musculatura (Figura 2), e fechamento da pele por sutura contínua com fio de algodão n.º 3-0;
- l) Demarcação do animal com perfurador de orelhas, para identificação.

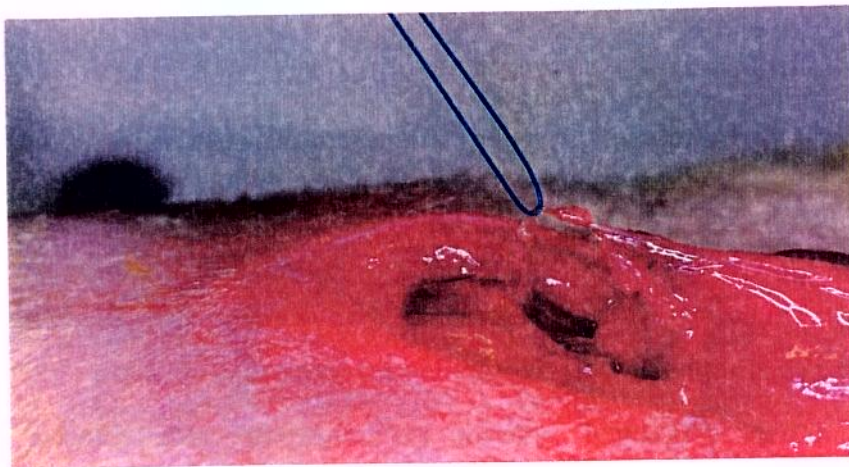


Figura 1: Ducto hepático dissecado.

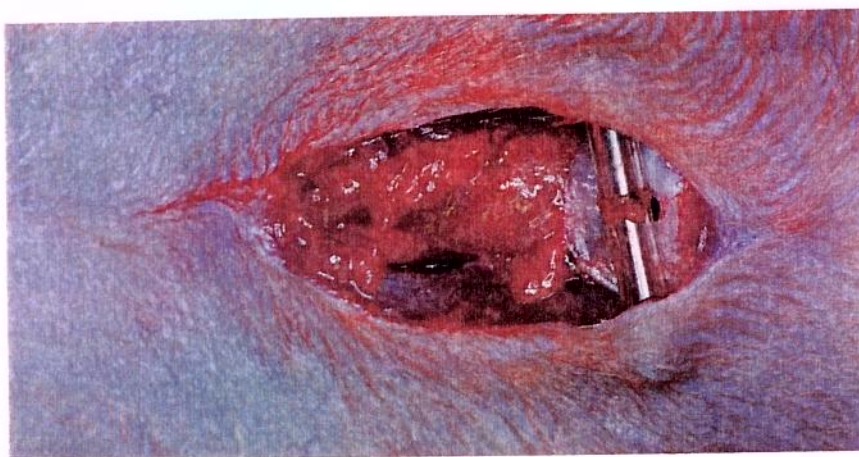


Figura 2: Ducto hepático fixo por interposição de cateter.

3.2.3. Cuidados pós-operatórios

Após o término do ato operatório, os animais foram recolocados em suas respectivas gaiolas, com alimentação padronizada e ingesta de água *ad libitum*.

3.3. SACRIFÍCIO E COLETA DE MATERIAL PARA ANÁLISES

Do grupo OB foram sacrificados 2 ratos no 33.º dia pós-operatório, 4, no 34.º PO, e 6, no 35.º PO.

Do grupo OS foram sacrificados 6 ratos no 30.º dia PO, 1, no 34.º PO, e 8, no 35.º PO. Todos os ratos do grupo OV (n = 13) foram sacrificados no 35.º PO. Os ratos foram submetidos à mesma técnica de anestesia, fixação e preparo descritos para a laparotomia, porém com incisão ampla, arqueada, seguido de abordagem e dissecação da artéria aorta abdominal e punção direta da mesma com GELCO, e colheita de cerca de 6,0 ml de sangue, enviados para dosagens bioquímicas, e sacrificando-os por exsanguinação. O fígado foi removido e retirou-se um fragmento de 200 a 500 mg, do bordo esquerdo do lobo mediano para análise quantitativa do colágeno, e, imediatamente, armazenado em nitrogênio líquido a -80 graus. Foi retirado parte do lobo lateral esquerdo e colocado em formol, seguido de inclusão em parafina, para quantificação estereológica do colágeno.

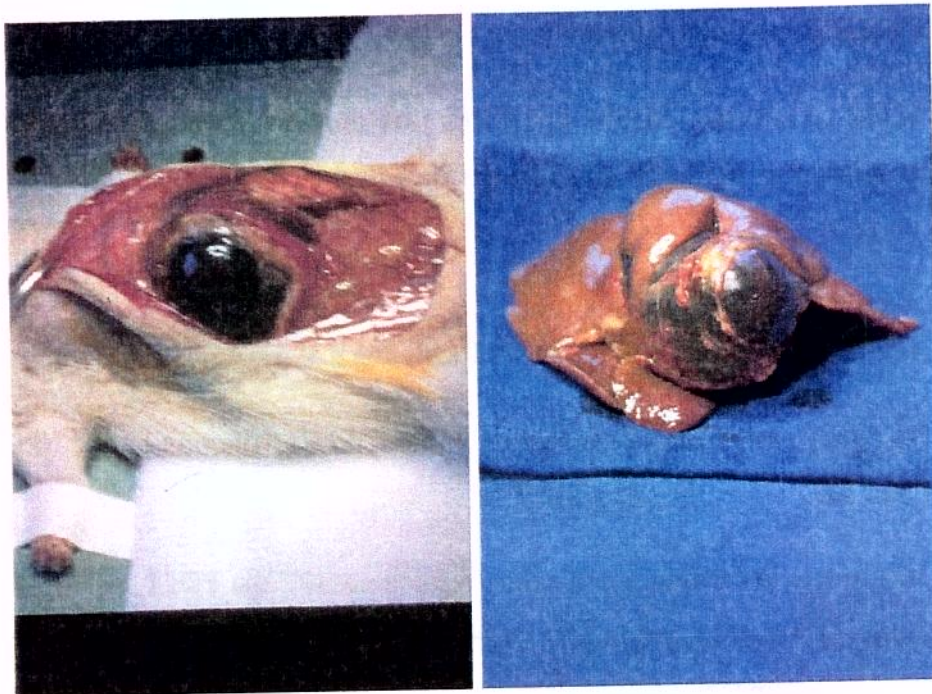


Figura 3: Aspecto do fígado, 5 semanas após obstrução biliar.

3.4. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO SANGUE (Local: Laboratório de Bioquímica do Departamento de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas – UNICAMP).

A avaliação bioquímica do sangue foi realizada através de dosagens da fosfatase alcalina, bilirrubinas totais e frações direta e indireta, gama glutamil transferase, hematócrito, proteínas totais e frações α 1-globulina, α 2-globulina, β -globulina, γ -globulina e albumina, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase.

3.4.1. Fosfatase alcalina

Foi determinada através de equipamento automatizado (Mega – Merck) a 37°C, utilizando calibrador, controles normal e patológico e reagentes fornecidos pelo fabricante (Merck), no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Patologia Clínica da UNICAMP, expressa em U/L (BERGMEYER, 1972).

3.4.2. Bilirrubinas total , direta e indireta

Foi determinada através de equipamento automatizado (Mega – Merck) a 37°C, utilizando calibrador, controles normal e patológico e reagentes fornecidos pelo fabricante (Merck), no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Patologia Clínica da UNICAMP, expressa em MG/DL (WEIGL, BACH, KRIEG,1975).

3.4.3. Gamaglutamil transferase (GGT)

Foi determinada pelo método cinético, com E-2250 Espectrofotômetro CELM, no Setor de Cirurgia Experimental e Técnica Cirúrgica da F.M.R.P.-U.S.P., expressa em U/L (FUKE et al., 1976).

3.4.4. Proteína total e frações α 1-globulina, α 2-globulina, β -globulina, γ -globulina e albumina

Foram determinadas conforme descrito por GORNALL, BARDAWILL, DAVID, 1949, com utilização de cuba e fonte CELM para eletroforese e agarose, e densitômetro DS – 35 CELM, no Setor de Cirurgia Experimental e Técnica Cirúrgica da F.M.R.P.-U.S.P., expressas em G/DL.

3.4.5. Hematócrito

Foi determinado no Laboratório Experimental da Unidade de Fígado e Transplante Hepático do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, expresso em MM/1 Hora.

3.4.6. Aspartato aminotransferase (AST)

Foi determinada através de equipamento automatizado (Mega – Merck) a 37°C, utilizando calibrador, controles normal e patológico e reagentes fornecidos pelo fabricante (Merck), no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Patologia Clínica da UNICAMP, expressa em U / L (BERGMEYER, 1972).

3.4.7. Alanina Aminotransferase (ALT)

Foi determinada através de equipamento automatizado (Mega – Merck) a 37°C, utilizando calibrador, controles normal e patológico e reagentes fornecidos pelo fabricante (Merck), no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Patologia Clínica da UNICAMP, expressa em U / L (BERGMEYER, 1972).

3.5. QUANTIFICAÇÃO ESTEREOLÓGICA DO COLÁGENO. (Local: Laboratório de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp).

3.5.1. Coloração pelo picrossirius (Sirius Red F3BA)

Para histomorfometria, cada amostra de tecido hepático foi incluída em parafina de onde se obtiveram cortes histológicos, com espessura padronizada de 6 micra e corados pelo picrossírius, de acordo com JUNQUEIRA, BIGNOLAS, BRENTANI, 1979.

3.5.2. Histomorfometria.

A avaliação quantitativa das fibras colágenas foi feita através do método da volumetria por pontos (WEIBEL, KISTLER, SCHERLE, 1966) usando o sistema de análise de imagens KS 400 (Kontron Eletronics, Germany).

Com objetiva de 10X e luz polarizada foram captadas imagens de espaços porta e parênquima adjacente, que foram superpostas com uma área teste medindo $8 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ e $160 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, e subdividida por um retículo em 20 pontos. Cada ponto correspondeu a $4 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ e $8 \times 10^6 \mu\text{m}^3$. O número de pontos de impacto com fibras colágenas correspondeu à sua densidade volumétrica:

$$V_v = \text{n.º de pontos} \cdot \frac{8 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3}{160 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3}$$

que, por maior facilidade, foi expressa em percentual, em relação ao volume da área teste.

Pelo método de frequências acumuladas (CHALKLEY, 1943) estabeleceu-se que 300 pontos por animal, examinados em 15 áreas testes, distribuídas por 3 a 5 cortes não seriados de cada fígado, seriam suficientes para análise.

3.6. DOSAGEM DE HIDROXIPROLINA HEPÁTICA (Local: Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da FCM de Ribeirão Preto – USP).

O processo de extração e dosagem da hidroxiprolina tecidual foi realizado segundo STEGEMANN & STALDER (1967) modificada por MEDUGORAC (1980) e utilizado por SOARES (1987), SOUZA (1989) e SILVA (1998).

3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.

Os dados foram tabulados e apresentados sob forma de média \pm EPM. As comparações foram feitas, utilizando Análise de Variância (ANOVA). Nos casos em que o valor de P foi menor que 5% ($p < 0,05$), aplicou-se o teste de múltiplas comparações de Tukey.



4. RESULTADOS

4.1. HIDROXIPROLINA

Os resultados das médias e EPM das dosagens de hidroxiprolina tecidual hepática de cada grupo estão expressos na Tabela 1. As médias (+ EPM) estão representadas, em forma de gráfico, na figura 4.

Os dados da Tabela 1 e da Figura 4 mostram que o grupo submetido à obstrução biliar e tratado com vitamina A (OV) apresentou níveis de hidroxiprolina menores ($p < 0,001$) que o grupo obstruído não tratado (OB). Os 2 grupos submetidos à obstrução biliar (OB e OV) apresentaram níveis de hidroxiprolina maiores que o grupo OS (OB X OS: $p < 0,001$; OV X OS: $p < 0,001$).

Tabela 1: Valores de hidroxiprolina e colágeno

	OB (12)	OV (13)	OS (15)	Valor de <i>P</i>		
				OB/OV	OB/OS	OV/OS
HIDROXIPROLINA						
(μg / 100 mg tecido hepático seco)	330,25 \pm 28,23	209,38 \pm 14,47	84,47 \pm 2,10	P<0,001	P<0,001	P<0,001
COLÁGENO (%)	12,86 \pm 0,86	8,72 \pm 1,26	2,72 \pm 0,27	P<0,01	P<0,001	P<0,001

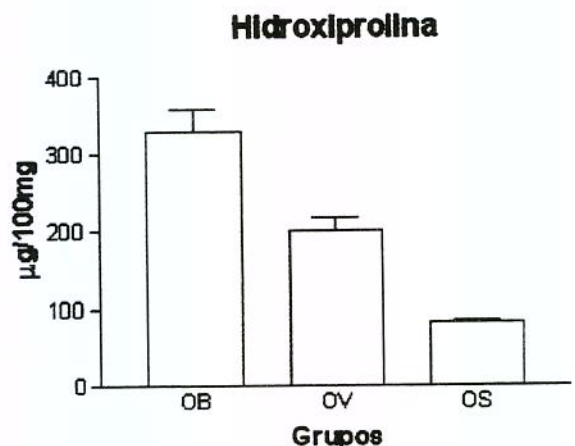


Figura 4: Representação gráfica dos níveis bioquímicos de hidroxirolina (µg de hidrox./100mg de tecido hepático seco) nos fragmentos hepáticos dos ratos (MÉDIA + EPM). OB = grupo obstrução biliar; OV = grupo obstrução biliar + vitamina A; OS = grupo operação simulada.

4.2. QUANTIFICAÇÃO ESTEREOLÓGICA DO COLÁGENO

Os resultados do colágeno quantificado estereologicamente de cada animal, assim como as médias e EPM de cada grupo, estão expressos na Tabela 1. As médias (+ EPM) estão representadas, em forma de gráfico, na figura 5.

Os dados da Tabela 1 e da Figura 5 mostram que o grupo submetido à obstrução biliar e tratado com vitamina A (OV) apresentou percentuais de colágeno menores ($p < 0,01$) que o grupo obstruído não tratado (OB). Os 2 grupos submetidos à obstrução biliar (OB e OV) apresentaram percentuais de colágeno maiores que o grupo OS (OB X OS: $p < 0,001$; OV X OS : $p < 0,001$).

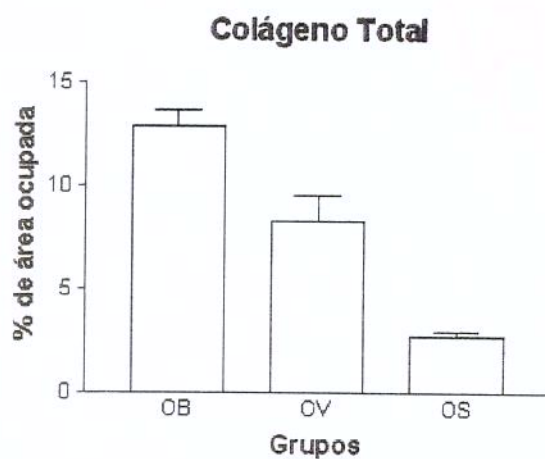


Figura 5: Representação gráfica da volumetria estereológica do colágeno hepático, expresso em percentuais de área ocupada, nos fragmentos hepáticos dos ratos (média + EPM). OB = grupo obstrução biliar, OV = grupo obstrução biliar + vitamina A, OS = grupo operação simulada.

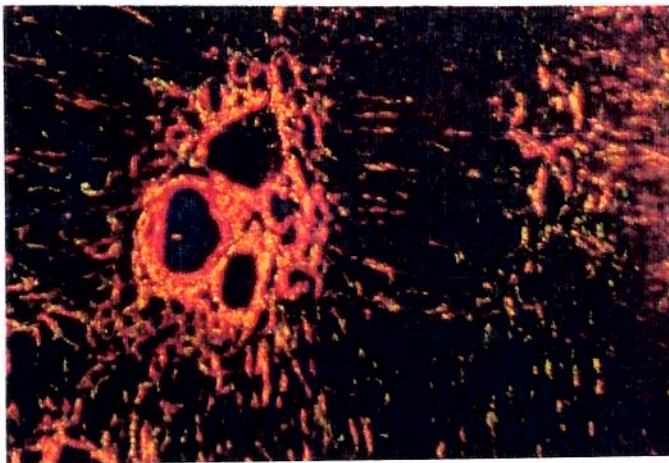


Figura 6: Aspecto microscópico do fígado, em um animal do grupo OB. Nota-se acentuada fibrose periportal e parenquimatosa. Aumento: 10 X. Coloração: Picrossírius. Utilizada polarização.

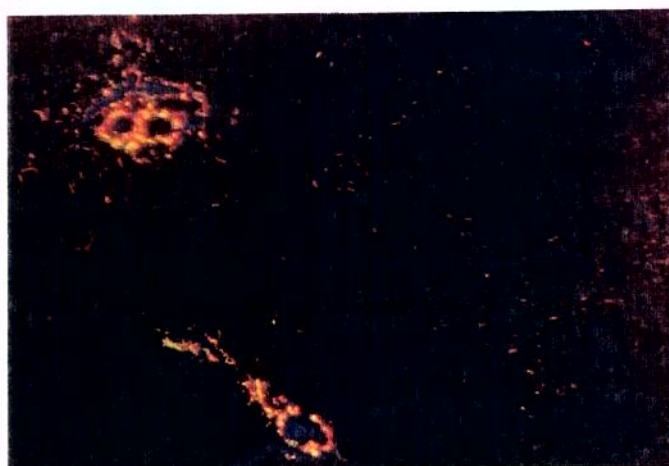


Figura 7: Aspecto microscópico do fígado, em um animal do grupo OV. Nota-se moderada fibrose periportal. Aumento: 10X. Coloração: Picrossírius. Utilizada polarização.

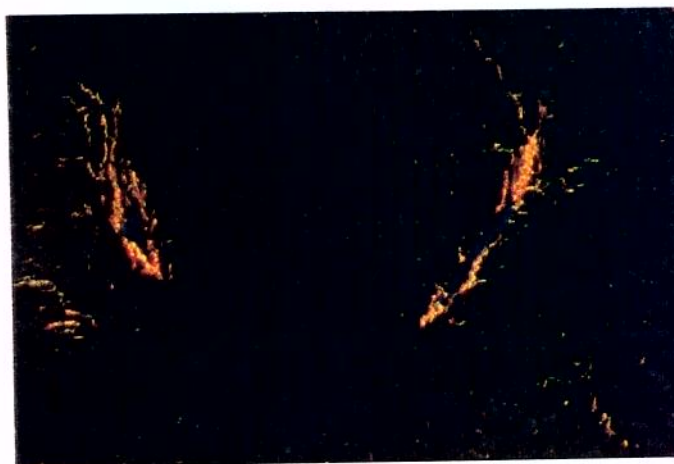


Figura 8: Aspecto microscópico do fígado, em um animal do grupo OS. Nota-se ausência de fibrose tecidual, com mínima demarcação de colágeno periportal e ao redor da veia centro-lobular. Aumento: 10 X. Coloração: Picrossírius. Utilizada polarização.

4.3. ANÁLISE BIOQUÍMICA DO SANGUE

Tabela 2: Valores das dosagens bioquímicas do sangue

	OB	OV	OS	Valor de P		
				OB/OV	OB/OS	OV/OS
ALT (U / L)	78,45 ± 8,91	130,72 ± 18,89	42,75± 2,90	P<0,05	P<0,05	P<0,001
AST (U / L)	375,82 ± 43,69	567,36 ± 71,62	165,67± 18,02	P<0,05	P<0,01	P<0,001
FA (U / L)	1035,09 ± 113,68	887,64 ± 73,08	333,08 ± 27,56	ns*	p<0,001	P<0,001
BT (mg / dl)	10,52 ± 0,66	10,06 ± 0,32	0,21 ± 0,01	ns*	p<0,001	P<0,001
BD (mg / dl)	7,05 ± 0,47	6,94 ± 0,20	0,04 ± 0,01	ns*	p<0,001	P<0,001
BI (mg / dl)	3,46 ± 0,22	3,13 ± 0,14	0,17 ± 0,01	ns*	p<0,001	P<0,001
GGT (U / L)	45,09 ± 5,05	54,18 ± 8,50	8,36 ± 1,06	ns*	p<0,001	P<0,001
PT (mg %)	6,98 ± 0,09	7,0 ± 0,13	6,22 ± 0,14	ns*	p<0,001	P<0,001
ALB (mg %)	2,48 ± 0,18	2,65 ± 0,10	3,23 ± 0,11	ns*	p<0,001	P<0,01
α 1mg%)	1,02 ± 0,06	1,18 ± 0,07	0,89 ± 0,05	ns*	ns*	P<0,01
α 2 mg %)	0,56 ± 0,05	0,66 ± 0,15	0,31 ± 0,03	ns*	ns*	P<0,05
β (mg %)	1,87 ± 0,05	1,62 ± 0,10	1,06 ± 0,05	p<0,05	p<0,001	P<0,001
γ (mg %)	1,04 ± 0,13	0,86 ± 0,07	0,69 ± 0,05	ns*	p<0,05	ns*
HTC (mm /h)	45,08 ± 1,91	45,36 ± 0,80	44,86 ± 1,01	ns*	ns*	ns*

*ns = estatisticamente não significativo (p>0,05).

As médias e EPM de fosfatase alcalina, bilirrubinas total, direta e indireta, gamaglutamil transferase, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, proteínas totais e frações e hematócrito dos grupos OB, OV e OS estão expressos na Tabela 2.

Os dados da Tabela 2 mostram que os grupos OV e OB não tiveram diferenças significativas entre si com relação aos níveis séricos de fosfatase alcalina, bilirrubinas totais, direta e indireta e GGT. Mostram também que ambos os grupos submetidos à

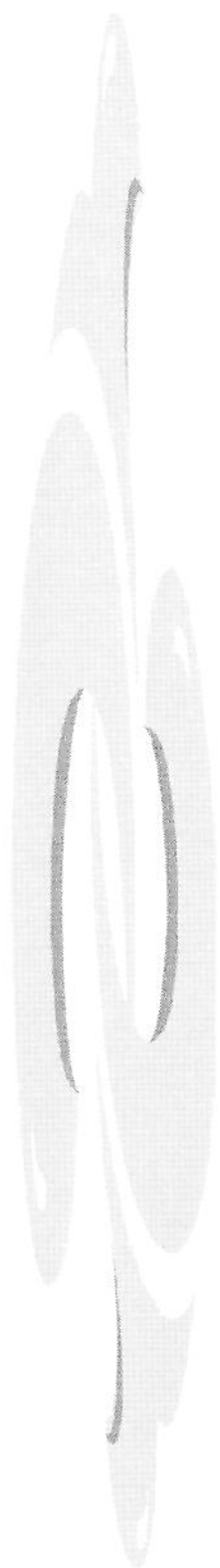
obstrução biliar (OB e OV) apresentaram níveis significativamente elevados de fosfatase alcalina (OB X OS: $p < 0,001$; OV X OS: $p < 0,001$), de bilirrubinas totais (OB X OS: $p < 0,001$; OV X OS: $p < 0,001$) principalmente devido à fração direta (OB X OS: $p < 0,001$; OV X OS: $p < 0,001$), e de GGT (OB X OS: $p < 0,001$; OV X OS: $p < 0,001$), em relação ao grupo OS em relação ao grupo OS, indicando colestase. Houve diferença significativa quanto à fração indireta das bilirrubinas entre os grupos OB e OV quando comparados com o grupo OS (OB X OS: $p < 0,001$; OV X OS: $p < 0,001$).

Os dados também mostram que o grupo OV apresentou níveis mais elevados de AST ($p < 0,05$) e ALT ($p < 0,05$) em relação ao grupo OB. Os grupos obstruídos OB e OV apresentaram valores maiores de transaminases que o grupo OS (para os valores de AST, OB X OS: $p < 0,01$; OV X OS: $p < 0,001$; e para os valores de ALT (OB X OS: $p < 0,05$; OV X OS: $p < 0,001$). Quanto aos níveis de hematócrito, não houve diferenças significativas entre os grupos OB, OV e OS ($p > 0,05$).

Entre os grupos OB e OV, não houve diferença estatística entre os níveis de proteínas totais, albuminas, α -1, α -2 e γ . O grupo OB apresentou níveis mais elevados da fração β ($p < 0,05$) do que o grupo OV.

Entre os grupos OB e OS, o primeiro apresentou níveis significativamente maiores de proteínas totais ($p < 0,001$), β ($p < 0,001$) e γ ($p < 0,05$); significativamente menores de albumina ($p < 0,001$), sem diferenças significativas quanto a α -1 e α -2.

Entre os grupos OV e OS, o primeiro apresentou níveis significativamente maiores de proteínas totais ($p < 0,001$), α -1 ($p < 0,01$), α -2 ($p < 0,05$) e β ($p < 0,001$), significativamente menores de albumina ($p < 0,01$), e sem diferença significativa quanto a γ .



5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com este modelo experimental mostram que ocorreu uma significativa redução da fibrose hepática com o emprego de retinil-palmitato antes e durante a obstrução biliar. Considerando-se as medianas dos grupos estudados, o grupo obstruído sem vitamina A adicional apresentou aumento do colágeno total, em relação ao grupo operação simulada, de 3,9 vezes, estimado pela dosagem de hidroxiprolina, ou de 4,8 vezes, pela volumetria estereológica, enquanto que o grupo obstruído tratado com vitamina A apresentou aumento de 2,5 vezes (hidroxiprolina) ou de 2,8 vezes (volumetria estereológica), em relação ao grupo operação simulada, com o modelo de obstrução biliar empregado. Esse efeito de supressão ou retardo da fibrose hepática pelo uso de vitamina A está em concordância com os trabalhos da literatura em que foram empregados modelos com CCL4, dimetilnitrosamino ou soro heterólogo de porco (SENOO & WAKE, 1985; CHEHTER *et al.*, 1988; DAVIS *et al.*, 1990; OKUNO *et al.*, 1990, PARISE *et al.*, 1992; YAMANE *et al.*, 1993; SEIFERT *et al.*, 1995, MIZOBUCHI *et al.*, 1998).

O colágeno total foi estimado, bioquimicamente, após processo de extração e dosagem da hidroxiprolina tecidual, segundo STEGEMANN & STALDER (1967), utilizada para dosagens humorais, modificada por MEDUGORAC (1980), adaptando-a para a dosagem tissular. Este processo foi utilizado também por SOARES (1987) para dosar a hidroxiprolina (colágeno) em miocárdio, por SOUZA (1989), em anastomoses de intestino delgado e SILVA (1998), em cicatriz de pele de laparotomia de rato. A hidroxiprolina dos organismos animais está confinada quase exclusivamente às proteínas estruturais do tecido conjuntivo, colágeno e elastina. Em razão desta distribuição restrita, a hidroxiprolina tem sido amplamente utilizada como indicador da presença e do metabolismo de colágeno (WOESSNER, 1961). A determinação de hidroxiprolina pode proporcionar valores não totalmente exatos para a quantificação do colágeno neoformado, devido à presença de outras proteínas que contêm este aminoácido (como a elastina) e de outros fenótipos de colágeno com diferentes conteúdos de hidroxiprolina. Apesar disso, é justificável postular que o aumento na concentração do referido aminoácido, encontrada no tecido hepático, corresponda a alterações quantitativas no conteúdo de colágeno, as quais são, provavelmente, secundárias à hiperprodução do mesmo.

O colágeno presente nos cortes histológicos foi da mesma forma avaliado, por meio de coloração com Picrossírius (Sirius-red F3BA) e quantificação estereológica sob luz polarizada. O Picrossírius é um forte corante aniônico que impregna o colágeno, reagindo, via seus grupos ácidos sulfônicos, com os grupos básicos presentes na molécula de colágeno. Essas moléculas corantes são alongadas e ficam unidas à fibra colágena de tal forma que seus longos eixos são paralelos, resultando em uma birrefringência aumentada. Esta característica é responsável por imagens extremamente claras que permitem uma acurada observação do colágeno em vários tecidos (JUNQUEIRA *et al.*, 1979). A quantificação do colágeno tecidual correlaciona-se bem com medidas bioquímicas do colágeno hepático no rato e no homem (FRENCH *et al.*, 1988).

Possíveis mecanismos de ação antifibrogênica da vitamina A, no fígado com colestase são:

- a) Inibição da transativação da célula de Ito por repleção celular;
- b) Ação antioxidante;
- c) Redução da inflamação hepática;
- d) Inibição da TGF β ;
- e) Ação em receptores nucleares.

A inibição da transativação da célula de Ito poderia ser explicada pela repleção de seu citoplasma pela vitamina A esterificada, sua forma de estoque. Uma vez repleta, permaneceria quiescente, inativa, sem proliferar e sem produzir proteínas. SHIRATORI *et al.*, 1987, compararam as células de Ito, isoladas, de ratos tratados com tetracloreto de carbono, com palmitato de retinil, e de ratos normais. As primeiras apresentaram pequeno número de gotas citoplasmáticas de gordura com retículo endoplasmático rugoso aumentado, síntese de colágeno elevada, e tiveram sua população aumentada. Já as tratadas com vitamina A apresentaram grandes gotas de gordura no citoplasma e escasso retículo endoplasmático rugoso, com supressão da produção do colágeno e proliferação celular reduzida. DAVIS & VUCIC, 1988, demonstraram que a proliferação de células estreladas

hepáticas de rato é efetivamente inibida, *in vitro*, adicionando-se 10^{-5} M retinol ao meio. MARGIS & BOROJEVIC, 1989, administraram retinol a células de tecido conjuntivo derivadas de lesões fibróticas hepáticas por esquistossomose de ratos e obtiveram a conversão das mesmas em fenótipo de células de Ito quiescentes, contendo gotas de gordura. SENOO & WAKE, 1985, observaram que, nos ratos que receberam palmitato de retinil e foram submetidos ao CCL4, as células de Ito permaneciam repletas de gotas de gordura, em seu fenótipo quiescente, associado à diminuição ou à ausência da fibrose. Portanto, estes experimentos sugerem a possibilidade de que, prevenindo-se a perda da vitamina A citoplasmática ou recompondo seus níveis celulares através da sua administração exógena em doses mais altas, estaria sendo evitada a sua degranulação e transativação. No entanto, esta é apenas parte de um processo, com envolvimento de vários mecanismos ainda pouco elucidados.

SENOO & WAKE, 1985, acima citados, não encontraram relação do grau de hepatotoxicidade com o momento de administração da vitamina A, concluindo que esta reduziu a fibrose hepática, quando administrada antes ou após o CCL4 ou soro heterólogo. Porém esta droga não protegeu o fígado contra a ação tóxica do CCL4. Por outro lado, SEIFERT *et al.*, 1989, demonstraram que o palmitato de retinil dado antes ou durante a administração de tetracloreto de carbono piorou a sua hepatotoxicidade, provocando uma mortalidade superior a 50% dos animais. No entanto, quando o palmitato de retinil foi dado após o tetracloreto de carbono, nenhum animal morreu e a fibrose foi menos severa em relação aos ratos que receberam somente tetracloreto de carbono. SEIFERT *et al.*, 1994, verificaram que a deficiência de vitamina A potencializou a fibrose hepática induzida pelo tetracloreto de carbono, sem que houvesse alteração no grau de hepatotoxicidade, secundário a essa deficiência. Sugeriram assim que “os retinóides modulam a síntese e a deposição do colágeno independentemente do grau de necrose hepatocelular induzida pelo tetracloreto de carbono”. Os mesmos autores (SEIFERT *et al.*, 1995), utilizaram β -caroteno, por via oral, em modelo experimental, com CCL4, obtendo efeito antifibrogênico, quando administrado concomitante ao CCL4, tendo evitado a perda hepática de retinóides sem apresentar a toxicidade hepática ou sistêmica da vitamina A, encontrada em trabalho anterior. Revendo esses trabalhos, KNOOK, BOSMA, SEIFERT, 1995, ponderam que um elevado nível de vitamina A, no fígado, suprime a fibrogênese

experimental, em função de sua alta concentração nas células de Ito. No entanto, estes níveis elevados podem potencializar a hepatotoxicidade de agentes como o CCL4, ou através de interações metabólicas ou afetando as células de Kupffer. Sugerem também que o dano hepatocelular reduzido, observado nos ratos tratados com CCL4 e que receberam β -caroteno pode ser resultado da remoção de radicais livres reativos. Por evitar a perda de retinóides a longo prazo, o β -caroteno parece ter um papel terapêutico promissor na prevenção da fibrose hepática. Contrariamente a isto, LEO & LIEBER, 1999, advertem que, ao menos no grupo de pacientes etilistas, a suplementação de β -caroteno demonstrou hepatotoxicidade.

Como verificado por MIZOBUCHI *et al.*, 1998, em modelos experimentais com dimetilnitrosamino e soro heterólogo, a vitamina A poderia agir também de forma antioxidante. Uma vez que o estresse oxidativo com a liberação de radicais livres de oxigênio, malondialdeído e a peroxidação lipídica levam os hepatócitos a estimular de forma parácrina a proliferação das células de Ito (LEE *et al.*, 1995), o retinil-palmitato suprimiu a fibrose hepática, restaurou os níveis de retinil-palmitato hepático, evitou o aumento dos níveis hepáticos de colágeno e de malondialdeído (um produto da peroxidação lipídica) e evitou o aumento do número de células de Ito. Assim, inibiu a peroxidação lipídica da mitocôndria hepática demonstrando atividade radical de limpeza, varrendo os radicais livres.

Ponto chave da transativação da célula de Ito é o envolvimento de várias cininas, sendo que a TGF β é a mais importante nesse processo (DAVIS *et al.*, 1990). Apesar das evidências benéficas da utilização dos retinóides em vários modelos experimentais, efeitos divergentes foram obtidos com o emprego do ácido retinóico na produção da TGF β e do colágeno. DAVIS *et al.*, 1990, demonstraram que, *in vitro*, a proliferação das células de Ito pode ser reduzida pela adição de ácido retinóico ao meio, com redução da produção da TGF β , e menor produção de colágeno intersticial. Quando administrada a ratos, em condições basais, levou a acentuada redução do RNAm do colágeno hepático tipo I. Ao contrário destas observações, KODA *et al.*, 1996, encontraram evidências de que o ácido retinóico não apenas estimula as células estreladas a produzir colágeno, mas também suprime a função dos hepatócitos, reduzindo a produção de

albumina pelos mesmos, através da indução da formação de TGF β . Sugeriram que o TGF β , gerado pelas células estreladas, facilita o desenvolvimento da cirrose hepática pela indução da produção dos componentes fibróticos e também piora a função das células parenquimatosas adjacentes. OKUNO *et al.* (1997), demonstraram que o ácido retinóico leva à produção e induz a ativação do TGF β latente nas células de Ito já ativadas, no 7.º dia de cultura, com estímulo da síntese de colágeno e suprimindo a produção de collagenase. No mesmo experimento, ao ser administrado o retinóide acíclico (análogo do ácido retinóico) em ratos com indução de fibrose hepática por soro heterólogo demonstrou-se exacerbação da mesma. Os mesmos pesquisadores obtiveram resultados opostos a estes (OKUNO *et al.*, 1990), ao empregarem o retinóide acíclico, em modelo experimental, com tetracloreto de carbono, obtendo redução da fibrose hepática. Estes autores propõem que o emprego destes retinóides produzem efeitos diferentes, de acordo com o modelo experimental empregado, e com ação bifásica do ácido retinóico na célula de Ito *in vitro*. O modelo com CCL4 produz reação inflamatória intensa, e por isso é beneficiado pelo uso do retinóide acíclico o qual reduziria essa resposta. Ao contrário, a administração desse retinóide no modelo com soro heterólogo, que produz fibrose praticamente sem inflamação, levaria à ativação do TGF β latente e piora da fibrose. BLOMHOFF (1997) sugere que mecanismos multifatoriais em nível de expressão dos receptores nucleares do ácido retinóico que envolvem liberação e bloqueio de fatores transcricionais de TGF β ainda pouco elucidados, podem estar envolvidos. A expressão desses receptores poderiam variar conforme a fase da ativação das células de Ito. Existem 2 sub-famílias (RAR e RXR) compondo um total de 6 receptores nucleares para os retinóides, conhecidos até o momento, aos quais os metabólitos ativos da vitamina A se ligam e produzem uma diversidade de complexas respostas. OKUNO *et al.*, 1999, verificaram que o ácido retinóico transativou o RAR α e provocou a síntese de pró-colágeno e TGF β nas células hepáticas estreladas, em ratos com modelo experimental de soro heterólogo. Os níveis de ácido retinóico estavam aumentados tanto nas células hepáticas estreladas *in vitro* quanto no fígado fibrótico, acompanhando a expressão aumentada de RAR α e β , ativador de plasminogênio, TGF β e pró-colágeno *in vivo*.

Portanto, há uma discrepância no papel da vitamina A, em relação ao processo de fibrose hepática. Parece depender do modelo experimental utilizado, da dose e do momento de sua administração, do tipo de análogo e da etiologia da agressão que leva à fibrose.

Verifica-se, no presente experimento, que o tratamento com palmitato de retinil dos ratos submetidos à obstrução biliar reduziu a ocorrência de fibrose hepática, embora esse grupo tenha apresentado níveis mais elevados de transaminases, refletindo, possivelmente, maior grau de hepatotoxicidade. Estes dados estão de acordo com a idéia de que os retinóides modulam a síntese e a deposição de colágeno, de modo independente do grau de necrose hepatocelular. Embora o grupo OV tenha apresentado níveis significativamente mais elevados de transaminases, em relação ao grupo OB, não foram encontradas diferenças, nestes parâmetros, no estudo piloto, envolvendo animais sem obstrução biliar. A colestase crônica extra-hepática apresenta níveis normais ou elevações discretas de transaminases (ALT e AST), e altos níveis de fosfatase alcalina e gama-GT (O'CONNOR, 1985, DE RITIS & COLTORTI, 1972, SOUZA *et al.*, 1990). ALT e AST são sensíveis indicadores de lesão celular hepática e úteis para detecção de doenças hepáticas agudas. Na colestase extra-hepática, por mecanismos ainda não bem elucidados, ocorre elevação dos níveis séricos de ALT, a partir de 30 minutos e de AST, após 120 minutos da obstrução biliar, na ausência de necrose hepatocelular (SOUZA *et al.*, 1990). Isto pode estar relacionado à estase biliar produzida pela obstrução, que leva à dilatação dos canalículos biliares e resulta em alterações estruturais das "tight junctions", em áreas em íntimo contato com os hepatócitos. Estas áreas que, normalmente, são impermeáveis tornar-se-iam então permeáveis na colestase. PATWARDHAN, SMITH, FARMELANT, 1987, referem elevações de transaminases já nas primeiras 72 horas, após obstrução do ducto biliar. KOYAMA *et al.*, 1975, relatam elevações de transaminases mais acentuadamente na primeira semana, mantendo discreta elevação nas 5 semanas subsequentes. Verificaram também, na avaliação histológica, que ocorreu discreto grau de hiperplasia de ductos biliares periportais, com fibrose, mas sem colestase e degeneração ou necrose de hepatócitos. À medida que se prolongou a obstrução biliar, houve redução na população de hepatócitos e intensificação da hiperplasia biliar, com aumento gradual do infiltrado celular e fibrose periductal; em 6 semanas, essas alterações tornaram-se ainda

mais marcantes, com a característica pseudolobulação da cirrose biliar presente em alguns animais. No presente experimento, a elevação de transaminases poderia ser atribuída a um maior grau de necrose hepato-celular, resultante da conjunção entre a agressão causada pela colestase com a administração de altas doses de vitamina A, mas que não demonstrou hepatotoxicidade nos ratos do grupo VA do estudo piloto. Por outro lado, poderia ser especulada a hipótese da existência de um maior número de hepatócitos sobreviventes no grupo OV que no grupo OB, relacionada à ação antioxidativa da vitamina A. Assim, embora viáveis, estariam produzindo níveis mais elevados de transaminases por estarem em maior número, submetidos à colestase. A toxicidade da vitamina A pode ser avaliada através de dosagens séricas de AST e ALT, e de acordo com MALLIA *et al.*, 1975, por critérios clínicos (perda de peso, queda de pêlos, irritabilidade, agressividade, redução do apetite, sangramento nasal ocasional e fraqueza ou paralisia parcial dos membros). Não foram avaliados, sistematicamente, esses sinais clínicos acima descritos nos grupos estudados, por se basearem em critérios subjetivos, pela dificuldade na avaliação, e pela possível confusão em se estabelecer se seriam decorrentes da colestase ou da administração da vitamina A.

Comparando-se os dois grupos obstruídos, a vitamina A não alterou o perfil bioquímico de FA, GGT e bilirrubinas. Com relação às proteínas séricas, excetuando-se a fração β o uso da vitamina A não alterou o perfil eletroforético. Os animais obstruídos apresentaram diminuição da fração albumina, o que está de acordo com a literatura (KRÄHENBÜHL *et al.*, 1995), sem ocorrer influência da vitamina A sobre este parâmetro.

O modelo de lesão hepática com CCL4 é amplamente utilizado para o estudo dos mecanismos de ativação das células de Ito, deposição da matriz extra-celular e de drogas anti-fibrogênicas (TSUKAMOTO, MATSUOKA, FRENCH, 1990), entre elas a vitamina A (SENOO & WAKE, 1985; CHEHTER *et al.*, 1988; DAVIS *et al.*, 1990; PARISE *et al.*, 1992; YAMANE *et al.*, 1993). Embora o método de produção experimental de cirrose com múltiplas doses de CCL4, pelas mais diversas vias, seja o método mais utilizado, está longe de ser o modelo ideal que simule a cirrose em humanos (TAMAYO, 1983; KONTOURAS, BILLING, SCHEUER, 1984). As características bioquímicas e morfológicas obtidas lançam dúvidas quanto à adequação do modelo em simular a doença

humana, em virtude da variabilidade de respostas dos animais ao tetracloreto de carbono (TAMAYO, 1983; KONTOURAS *et al.*, 1984). Assim, alguns animais mostram mínima ou nenhuma alteração fibrótica, e outros a desenvolvem completamente, com tempo necessário para produzir cirrose muito prolongado (12 – 15 semanas, segundo TSUKAMOTO *et al.*, 1990), e alta mortalidade. A Dimetilnitrosamina, utilizada por MIZOBUCHI *et al.*, 1998, é um agente carcinogênico, quando administrada em baixas doses e de forma crônica, mas, em altas doses, provoca necrose hepática e subsequente fibrose, semelhante ao uso de tetracloreto de carbono (TSUKAMOTO *et al.*, 1990). O emprego de soro heterólogo (porco) em ratos, também utilizado por SENOO & WAKE, 1985, e MIZOBUCHI *et al.*, 1998, induz a uma fibrose hepática praticamente sem lesão de parênquima, sendo útil quando se quer estudar o mecanismo fibrogênico na ausência ou mínimo grau de hepatotoxicidade (BHUNCHET & WAKE, 1992). Segundo MILANI *et al.*, 1990, a fibrose biliar secundária à obstrução do ducto biliar no rato é morfologicamente caracterizada pelo aumento progressivo dos tratos portais, causada por acentuada proliferação de ductos biliares e deposição maciça de colágeno nos tratos portais e áreas periportais associados com sinais inflamatórios e necrose pouco intensos. A irritação química e a compressão mecânica devidas à colestase são as maiores desencadeantes da fibrose, a qual se inicia na zona I e progride para a zona III do lóbulo. Portanto, a ligadura biliar experimental do rato proporciona um modelo adequado para o estudo da cirrose e fibrose biliar secundárias, levando a um aumento de colágeno de cerca de 6 vezes em 4 semanas (KOYAMA *et al.*, 1975). Segundo KONTOURAS *et al.*, 1984, os ratos submetidos à obstrução biliar desenvolveram cirrose no período de 1 mês ou mais, e as alterações morfológicas são comparáveis àquelas observadas em seres humanos. Segundo TSUKAMOTO *et al.*, 1990, o acúmulo de bile nas vias biliares extra-hepáticas distensíveis associado com uma ligadura muito distal do ducto biliar comum pode ocorrer. Assim, a colestase poderia não ser semelhante ou uniforme em todos os animais, uma vez que o nível da obstrução poderia variar de um animal para outro, poupando o parênquima hepático ou partes dele na evolução da lesão. Assim, nos animais estudados, não se encontraram valores percentuais individuais de colágeno que refletissem de forma uniforme e paralela os valores individuais de hidroxiprolina, provavelmente pelas diferenças de comprometimento entre as diversas regiões do fígado, no mesmo animal. Sobre a influência das idades, MEDEIROS,

FREITAS, ANDRADE, 1988, estudando a histologia hepática de ratos jovens e adultos submetidos à obstrução biliar, observaram que os primeiros apresentaram maior tendência à compartimentação nodular dos hepatócitos (cirrose biliar secundária), e os últimos a uma maior proliferação ductal, com invasão do parênquima, que acharam comparáveis à proliferação neoplásica. ZIMMERMANN *et al.*, 1994, compararam ratos jovens e ratos mais velhos após 4 semanas de obstrução biliar, concluindo que a susceptibilidade às sequelas da colestase crônica dependem do estágio de desenvolvimento dos ratos. Não obtiveram diferenças significativas quanto aos níveis de ALT, mas a análise estereológica do tecido conjuntivo mostrou volumes de $7,7 \pm 2,4 \%$, média \pm DP (7 vezes maior que o *sham*) nos ratos de 7 semanas e $18,7 \pm 4,8 \%$ (23 vezes maior que o *sham*) nos ratos de 22 semanas. Assim, sugerem que a caracterização dos grupos, nos experimentos com obstrução biliar, façam-se com o critério de idade bem definido.

A dose total de 70×10^4 UI de palmitato de retinil aqui empregada, pré e pós-obstrução, foi relativamente elevada em relação às utilizadas na maioria dos trabalhos citados em que se utilizou palmitato de retinil por via subcutânea: SENOO & WAKE, 1985, utilizaram 20×10^4 prévio ou 35×10^4 UI durante a administração de CCL₄, em ratos Wistar com peso inicial de 100 a 120 gramas; SEIFERT *et al.*, 1989, utilizaram 10^5 UI de retinil-palmitato por 100 g de peso corporal, 2 vezes por semana por 4 semanas, prévio, concomitante ou após o CCL₄; CHEHTER *et al.*, 1988, utilizaram 20×10^4 , em ratos Wistar com peso inicial de 49 - 71 gramas, antes da administração de CCL₄; PARISE *et al.*, 1992, utilizaram 20×10^4 em ratos Wistar com peso inicial de 50 - 70 gramas, antes da administração de tetracloreto de carbono; MIZOBUCHI *et al.*, 1998, utilizaram doses totais de 2, 10 ou 20×10^4 UI em ratos Wistar com peso inicial de 200 gramas, em grupos antes ou após a administração de soro heterólogo (porco) ou dimetilnitrosamina. Uma vez que a colestase leva à diminuição do estoque hepático de vitamina A pela má absorção e interferência em seu metabolismo (ANDREWS *et al.*, 1981, AMEDEE-MANESME *et al.*, 1987 e 1988, KAUFMAN *et al.*, 1987, FUKUI *et al.*, 1993), e dada à possibilidade dos animais utilizados apresentarem baixos níveis iniciais de vitamina A estocada, optamos pelo emprego pré e pós-obstrução para assegurar níveis hepáticos elevados da vitamina A, durante todo o experimento. Por outro lado, a dose aqui utilizada pode ter sido excessiva, com as conseqüências de maior hepatotoxicidade refletida nos níveis mais elevados de

transaminases. Salienta-se porém que, apesar dessa possível hepatotoxicidade, já discutida acima, a vitamina A protegeu o fígado contra o surgimento de fibrose.

Segundo AMÉDÉE-MANESME *et al.*, 1988, recém-nascidos apresentam uma quantidade pequena de vitamina A armazenada no fígado, comparando-se com os adultos, e crianças com colestase crônica encontram-se em estado nutricional precário em razão da baixa capacidade de formar estoques, mesmo que a vitamina A esteja presente na dieta, uma vez que o problema é absorptivo. Apesar do acentuado dano histológico verificado na atresia de vias biliares, a capacidade de estocar vitamina A não está afetada, melhorando com a administração parenteral. Porém, deve-se ter o cuidado de evitar os efeitos tóxicos da hipervitaminose A, monitorizando-se a concentração sérica da mesma. FLOREANI *et al.*, 2000, demonstraram que pacientes adultos com colangite esclerosante primária e cirrose biliar primária apresentam reduzidos níveis plasmáticos de antioxidantes, como retinol, α -tocoferol e carotenóides, em relação à população geral. Encontraram também uma correlação negativa entre o total de carotenóides, e as enzimas fosfatase alcalina e gamaglutamil transferase, nos pacientes com cirrose biliar primária. Concluem que, nos pacientes colestatícos, os níveis de antioxidantes plasmáticos são baixos mesmo em estágios precoces da doença, por provável má absorção de vitaminas lipossolúveis e outros mecanismos pela deficiência da função hepática e ressaltam a necessidade de uma suplementação dietética cuidadosa. PRATICO *et al.*, 1998, demonstraram que a peroxidação lipídica está aumentada em pacientes com cirrose e sugerem que o estresse oxidativo poderia contribuir para a deterioração na doença hepática. WATSON *et al.*, 1999, em estudo-piloto, administraram compostos vitamínicos antioxidativos a pacientes com cirrose biliar primária e observaram redução de sintomas como fadiga e prurido, sugerindo repetir o experimento com duplo-cego e grupo-controle.

As células armazenadoras de gordura, semelhantes às células hepáticas estreladas (de Ito), existem também em posições perivasculares em outros tecidos, particularmente nos pulmões. Da mesma forma que em suas equivalentes hepáticas, a elas são atribuídas propriedades de proliferação e fibrose pulmonar em resposta a estímulos patológicos. Foi demonstrado que a administração de vitamina A a prematuros de baixo peso protege contra o surgimento de displasia broncopulmonar e aumenta a sobrevida dos mesmos (ROSSI, VAZ, RAMOS, 1998; DARLOW & GRAHAM, 1999).

A informação de que a administração da vitamina A inibe a fibrose hepática, originada por colestase, induz à elaboração de novos experimentos nessa linha, empregando esquemas diferentes daquele aqui utilizado, com doses menores, iniciadas após a obstrução biliar, simulando a patologia humana, monitorando-se a vitamina A sérica e tecidual hepática, bem como o estudo da curva das transaminases ao longo do experimento. Há necessidade também de ser realizado estudo histológico da ativação e proliferação das células de Ito, bem como se estudar a influência da TGF β e outras citocinas pró-fibrogênicas, o papel dos radicais livres, influência da colangite, e análise da regeneração hepática, nesse modelo experimental, visando, posteriormente, a utilização em benefício do ser humano.

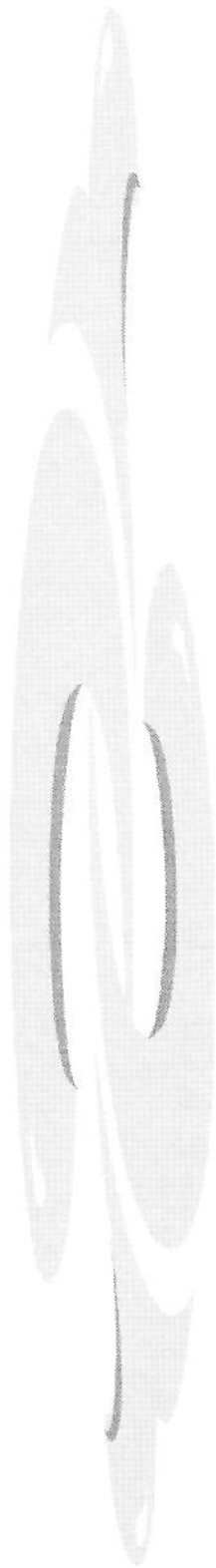
Os resultados deste trabalho demonstram efeito antifibrogênico da vitamina A, em vigência de obstrução biliar extra-hepática e, embora havendo também elevação de aminotransferases, a ação antifibrogênica da mesma, neste modelo experimental, foi confirmada. Assim, conclui-se que, por ser um modelo que melhor reflete a doença humana, mais estudos devem ser elaborados para uma maior compreensão de seus mecanismos de ação, e também para se estabelecer dose, forma de administração, emprego de seus análogos ou combinação de drogas, a fim de se eliminar a hepatotoxicidade e de prevalecer o efeito hepatoprotetor.



6. CONCLUSÕES

Nas condições utilizadas nesta investigação experimental, os resultados obtidos permitem concluir que:

- a) A administração da vitamina A resultou em diminuição da intensidade da fibrose hepática em ratos jovens, submetidos à obstrução biliar.
- b) A administração da vitamina A, associada à obstrução biliar, esteve relacionada a um aumento dos níveis de aminotransferases.
- c) A administração da vitamina A, associada à obstrução biliar, não levou a alterações significativas dos níveis de fosfatase alcalina, gamaglutamil transferase, bilirrubinas, hematócrito, proteínas totais e frações α_1 , α_2 , γ e albumina.



7. SUMMARY

Hepatic cirrhosis is one of the main causes of death in the world and is due to diverse factors like alcoholism, chronic hepatitis, biliary obstruction, hemosiderosis and other rare diseases. The most important cause of this disease in children is biliary atresia, which is responsible for more than 50% of the liver transplants performed in this age group. Although chronic administration of vitamin A has resulted in clinical toxicity in experimental models with rats, it has proved to be a protective factor against cirrhosis induced by carbon tetrachloride, dimethylnitrosamine, and heterologous serum. Depriving these animals of vitamin A worsened hepatic fibrosis. In order to verify if vitamin A really interfered in the hepatic fibrotic process resulting from cholestasis, this vitamin was administered to rats that had undergone biliary obstruction and then compared with rats that had undergone the same surgical process but without any additional vitamin A. The purpose of this study was to estimate hepatic fibrosis in rats, that had undergone biliary obstruction and had received additional vitamin A, based on the stereological quantification of collagen and the biochemistry of the hydroxyproline liver tissue.

The study used 40 rats divided into 3 groups: Biliary Obstruction Group (OB) - underwent common biliary duct obstruction; Biliary Obstruction + Vitamin A Group (OV) - underwent common biliary obstruction and received vitamin A subcutaneously during the pre and postoperative periods; Simulated Obstruction Group - *Sham* (OS) - underwent laparotomy and discreet manipulation of the biliary ducts. During 5 postoperative weeks, liver fragments were biochemically analyzed for hepatic and histological hydroxyproline indices of total collagen, and also for biochemical serum doses of alkaline phosphatase, bilirubins, GGT, transaminases and protein electrophoresis. The cholestatic rats that were given vitamin A showed lower indices of hydroxyproline ($\mu\text{g} / 100 \text{ mg}$ of dry hepatic tissue) and volumetric collagen (%) than the controls. The respective mean \pm SEM for the OB Group were 330.25 ± 28.23 and 12.86 ± 0.86 ; for the OV Group: 209.38 ± 14.47 ($p < 0,001$), and 8.72 ± 1.26 ($p < 0,01$). There was no difference between the serum levels of alkaline phosphatase, bilirubins and gammaglutamil transferase in the obstructed animals that received vitamin A and those that did not ($p < 0.05$). The serum levels of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase were higher in the obstructed rats that received vitamin A than in the obstructed controls that did not receive vitamin A ($p < 0,05$, and $p < 0,05$, respectively).

These results led to the conclusion that vitamin A significantly reduced the hepatic fibrosis induced in rats by biliary obstruction.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, D. J. - Junções celulares, adesão celular e a matriz extracelular. In: _____ - **Biologia Molecular da Célula** [Molecular Biology of the Cell] Traduzido por Amauri Braga Simonetti, Aoi Masuda, Augusto Schrank, Luis Carlos Jabur Casiri, Gertrudes Corção, Giancarlo Pasquali, Henrique Bunselmeyer Ferreira, Jaqueline Josi Samá Rodrigues, Magda Cirne Lima, Marilene Vainstein, Rosane Santos Machado, Sandra Estrazulas Farias, Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesky, Virgínia Minghelli Schmitt, Ana Paula Ravazzolo. 3 ed., Porto Alegre, Artes Médicas, 1997. p. 971-99.
- AMÉDÉE-MANESME, O.; MOUREY, M.S.; HANCK, A.; THERASSE, J. - Vitamin A relative dose response test: validation by intravenous injection in children with liver disease. **Am J Clin Nutr**, 46:286-9, 1987.
- AMÉDÉE-MANESME, O.; MOUREY, M.S.; THERASSE, J.; COUTURIER, M.; ALVAREZ, F.; HANCK, A.; BERNARD, O. - Short- and long-term vitamin A treatment in children with cholestasis. **Am J Clin Nutr**, 47:690-3, 1988.
- ANDREWS, W.S.; PAU, C.M.L.; CHASE, P.H.; FOLEY, C.L.; LILLY, J.R. - Fat soluble vitamin deficiency in biliary atresia. **J Pediatr Surg**, 16 (3): 284-90, 1981.
- ARTHUR, M.J.P. - Matrix degradation in liver: a role in injury and repair. **Hepatology**, 26 (4): 1069 – 71, 1997. [Editorial]
- BARBOSA JUNIOR, A.A.; PFEIFER, U.; ANDRADE, Z.A. - Role of fat-storing cells in schistosomal hepatic fibrosis of mice. **Virchows Archiv B Cell Pathol Incl Mol Pathol**, 64(2):91-6, 1993.
- BARONI, G.S.; D'AMBROSIO, L.; FERRETTI, G.; CASINI, A.; DI SARIO, A.; SALZANO, R.; RIDOLFI, F.; SACCOMANNO, S.; JEZEQUEL, A.M.; BENEDETTI, A. - Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. **Hepatology**, 27 (3) 720-26, 1998.

- BATRES, R.O. & OLSON, J.A. - Relative amount and ester composition of vitamin A in rat hepatocytes as a function of the method of cell preparation and of total liver stores. **Journal of Nutrition**, **117**:77-82, 1987.
- BERGMEYER, H.U. - Standardization of Enzymes Assays. **Clin Chem**, **18**: 1305 -11, 1972.
- BHUNCHET, E. & WAKE, K. - Role of Mesenchymal cell populations in porcine serum-induced rat liver fibrosis. **Hepatology**, **16** (6):1452-73, 1992.
- BISSEL, D.M.; FRIEDMAN, S.L.; MAHER, J.J.; ROLL, F.J. - Connective tissue biology and hepatic fibrosis: report of a conference. **Hepatology**, **11** (3):488-98, 1990.
- BLANER, S.W. & OLSON, F.A. - Retinol and Retinoic acid metabolism. In: SPORN, M.B.; ROBERTS, A.B.; GOODMAN, D.S. - **The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine**. 2 ed. New York, Raven Press, 1994. p.229-56.
- BLOMHOFF, R. & WAKE, K. - Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. **FASEB J**, **5**(3):271-7, 1991.
- BLOMHOFF, R. - Retinoids may increase fibrotic potential of TGF- β : crosstalk between two multi-functional effectors. **Hepatology**, **26** (4): 1067-68, 1997. [Editorial]
- BORGES, E.L.; BRAGA, A.A.; PETROIANU, A. - Influence of obstructive jaundice on jejunal absorption of glucose, electrolytes, and vitamin A in rats. **Dig. Dis. Sci.**, **43** (10): 2196-00, 1998.
- BOSMA, A.; SEIFERT, W.F.; WILSON, J.H.P.; ROHOLL, P.J.M.; BROUWER, A.; KNOOK, D.L. - Chronic administration of ethanol with high vitamin A supplementation in a liquid diet to rats does not cause liver fibrosis: 1. Morphological observations. **J. Hepatol.**, **13**:240-8, 1991.
- BRITON, R.S. & BACON, B.R. - Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. **Hepatogastroenterology**, **41**: 343-8, 1994.

- CASTRO E SILVA JR., O.; MAZZETO, M.S.A.; SOUZA, M.E.J.; PICINATO, M.A.N.C.; SANKARANKUTTY, A.K. - Obstrução biliar extra-hepática. In: CASTRO E SILVA JR, O.C.; ZUCOLOTO, S.; BEER JR., A., - **Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia**. São Paulo. Robe Editorial, 1998. p.191-200.
- CASU, A.; CANEPA, M.; NANNI, G. - Le cellule stellate perisinusoidali o cellule di Ito ed il loro ruolo nella fibrosi epatica (Perisinusoidal stellate cells or Ito cells and their role in hepatic fibrosis). **Pathologica**, **86** (5) : 467-99, 1994.
- CHALKLEY, H.W. - Method for the quantitative morphologic analysis of tissue. **J Nat Can Inst**, **4**: 47-53, 1943.
- CHEHTER, L.; MOR, M.M.B.L.; SILVA, M.R.R.; BARBOSA, V.P.; VILELA, M.P.; PARISE, E.R. - Alteração da fibrose hepática induzida pelo tetracloreto de carbono, pela administração prévia de vitamina A. **Rev Paul Med**, **106** (4): 185-89, 1988.
- CRAWFORD, J.M. - The liver and the biliary tract. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Pathologic Basis of Disease**. 5 ed, W B Saunders Company, 1994. p.831-94.
- DARLOW, B.A. & GRAHAM, P.J. - Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in very low birthweight infants (Cochrane Review). In: **The Cochrane Library**, Vol. 1, 2000. Oxford: Update Software. (Abstract)
- DAVIS, B.H.; KRAMER, R.T.; DAVIDSON, N.O. - Retinoic acid modulates rat Ito cell proliferation, collagen and TGF- β production. **J Clin Invest**, **86**:2062-70, 1990.
- DAVIS, B.H.; PRATI, B.M.; MADRI, J.A. - Retinol and extracellular collagen matrices modulate hepatic Ito cell collagen phenotype and cellular retinol binding protein levels. **J Biol Chem**, **262**:10280-6, 1987.
- DAVIS, B.H. & VUCIC, A. - The effect of Retinol on Ito cell proliferation in vitro. **Hepatology**, **8** (4): 788-93. 1988.

- DE LEEUW, A.M.; MCCARTHY, S.P.; GEERTS, A.; KNOOK, D.L. -Purified rat liver fat-storing cells in culture divide and contain collagen. **Hepatology**, 4 (3): 392-03, 1984.
- DE RITIS, F. & COLTORTI, M. -Serum-transaminase activities in liver disease. **Lancet**, 1: 685-87, 1972.
- FLOREANI, A.; BARAGIOTTA, A.; MARTINES, D.; NACCARATO, R.; DODORICO, A. -Plasma antioxidant levels in chronic cholestatic liver diseases. **Aliment Pharmacol Ther**, 14: 3, 353-8, 2000.
- FRENCH, W.S.; MIYAMOTO, K.; WONG, K.; JUI, L.; BRIERE, L. -Role of the Ito cell in liver parenchymal fibrosis in rats fed alcohol and a high fat-low protein diet. **Am J Pathol**, 132 (1): 73-85, 1988.
- FRIEDMAN, S.L. -Stellate Cell Activation in alcoholic fibrosis – an overview. **Alcohol Clin Exp Res**, 23 (5): 904-10, 1999.
- FUKE, H.; YAGI, H.; TAKEGOSHI, C.; KONDO, T. -A sensitive automated colorimetric method for the determination of serum gamma-glutamyl transpeptidase. **Clin Chim Acta**, 69: 43 –51, 1976.
- FUKUI, Y.; OKADA, A.; KAWAHARA, H.; IMURA, K.; KAMATA, S.; KIMURA, S.; HARADA, T. -Vitamin A status in biliary atresia: intestinal absorption and liver storage of retinol. **J Pediatr Surg**, 28 (11): 1502-4, 1993.
- GEERTS, A.; VRIJSEN, R.; RAUTERBERG, J.; BURT, A.; SCHELLINCK, P.; WISSE, E. - In vitro differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. **J hepatol**, 9: 59-68, 1989.
- GEERTS, A.; LAZOU, J.M.; DE BLESER, P.; WISSE, E. -Tissue distribution, quantitation and proliferation kinetics of fat-storing cells in carbon tetrachloride-injured rat liver. **Hepatology**, 13 (6):1193-02, 1991.

- GOODMAN, D.W.S. - Vitamin A and Retinoids in health and disease – **N Engl J Med**, **310** (16): 1023-31, 1984.
- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. - Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J Biol Chem**, **1977**: 751-66, 1949.
- HAUTEKEETE, M.L. & GEERTS, A. - The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. **Virchows Arch**, **430** (3):195-07, 1997.
- HENDRICKS, H.F.J.; BROUWER, A.; KNOOK, D.L. -The role of Hepatic fat-storing (Stellate) cells in retinoid metabolism. **Hepatology** **7** (6): 1368-71, 1987.
- HORSMANS, Y.; RAHIER, J.; GEUBEL, A.P. - Hepatic injury and vitamin A ingestion. **Am J Med**, **98** (4): 424. 1995. [Letter]
- IMAMINE, T.; OKUNO, M.; MORIWAKI, H.; SHIDOJI, Y.; MUTO, Y.; SEISHIMA, M.; NOMA, A.; KOJIMA, S. - Impaired synthesis of retinol-binding protein and transthyretin in rat liver with bile duct obstruction. **Dig Dis Sci**, **41** (5) : 1038-42, 1996.
- JACQUES, E.A.; BUSCHMANN, R.J.; LAYDEN, T.J. -The histopathologic progression of vitamin A - Induced hepatic injury. **Gastroenterology**, **76**: 599-02, 1979.
- JORGE, G.L. **Novo modelo experimental de obstrução biliar em ratos Wistar**. Campinas, 2000. (Tese - Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP).
- JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R.-Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**, **11** (4): 447-55, 1979.
- KAUFMAN, S.S.; MURRAY, N.D.; WOOD, R.P.; SHAW JR., B.W.; VANDERHOOF, J.A.-Nutritional support for the infant with extrahepatic biliary atresia. **J Pediatr**, **110** (5): 679-86, 1987.

- KAWADA, N. The hepatic perisinusoidal stellate cell. - **Histol Histopathol**, **12**:1069-80, 1997.
- KNOOK, K.L.; BOSMA, A.; SEIFERT, W.F. - Role of vitamin A in liver fibrosis. **J Gastroenterol hepatol**, **10 (Suppl 1)** : s47-9,1995.
- KODA, H.; OKUNO, M.; IMAI, S.; MORIWAKI, H.; MUTO, Y.; KAWADA, N.; KOJIMA, S. - Retinoic acid-stimulated liver stellate cells suppress the production of albumin from parenchymal cells via TGF- β . **Biochem Biophys Res Commun**, **221** (3): 565-69, 1996.
- KONTOURAS, J.; BILLING, B.H.; SCHEUER, P.J. - Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. **Br J Exp Path**, **65**: 305-311, 1984.
- KOYAMA, K.; MUTO, I.; YAMAUCHI, H.; TAKAGI, Y.; ANEZAKI, T.; SATO, T. - Biochemical study of fibrosis in the rat liver in biliary obstruction. **Tohoku J Exp Med**, **116**: 161-72, 1975.
- KRÄHENBÜHL, S.; MARTI, U.; GRANT, I.; GARLICK, P.J.; BALLMER, P.E. - Characterization of mechanisms causing hypoalbuminemia in rats with long-term bile duct ligation. **J Hepatol**, **23**: 79-86, 1995.
- LEE, K.S.; BUCK, M.; HOUGLUM, K.; CHOJKIER. - Activation of hepatic stellate cells by TGF- α and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. **J Clin Invest**, **96**: 2461-68, 1995.
- LEO, M.A.; ARAI, M.; SATO, M.; LIEBER, C.S. - Hepatotoxicity of vitamin A and ethanol in the rat. **Gastroenterology**, **82**: 194-205, 1982.
- LEO, M.A. & LIEBER, C.S. - Alcohol, vitamin A, and beta-carotene: adverse interactions, including hepatotoxicity and carcinogenicity. **Am J Clin Nutr**, **69**: 6, 1071-85, 1999.
- LEO, M.A. & LIEBER, C.S. - Hepatic fibrosis after long-term administration of ethanol and moderate vitamin A supplementation in the rat. **Hepatology**, **3**: 1-11, 1983.

- LEO, M.A. & LIEBER, C.S. - Hypervitaminosis A: a liver's lovers lament. **Hepatology**, **8** (2):412-7, 1988.
- LEO, M.A.; SATO, M.; LIEBER, C.S. - Effect of hepatic vitamin A depletion on the liver in humans and rats. **Gastroenterology**, **84**: 562-72, 1983.
- MALLIA, A.K.; SMITH, J.E.; GOODMAN, E.W.S. - Metabolism of Retinol Binding Protein And Vitamin A During Hypervitaminosis A In The Rat. **J Lipid Res**, **16** : 180-88, 1975.
- MAK, K.M. & LIEBER, C.S. -Lipocytes and transitional cells in alcoholic liver disease: a morphometric study. **Hepatology**, **8** (5): 1027-33, 1988.
- MAK, K.M.; LEO, M.A.; LIEBER, C.S. -Alcoholic liver injury in baboons: transformation of lipocytes to transitional cells. **Gastroenterology**, **87**:188-200, 1984.
- MARGIS, R. & BOROJEVIC, R. -Retinoid-mediated induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line. **Biochim Biophys Acta**, **1011**: 1-5, 1989.
- MAVIER, P. & MALLAT, A. - Perspectives in the treatment of liver fibrosis. **J Hepatol**, **22** (Suppl. 2): 111-15, 1995.
- MEDEIROS, M.V.M.J.; FREITAS, L.A.R.; ANDRADE, Z.A. - Differences in hepatic pathology resulting from bile duct obstruction in young and old rats. **Braz J Med Biol Res**, **21**: 75-83, 1988.
- MEDUGORAC, I. -Collagen content in different areas of normal and hypertrophied rat myocardium. **Cardiovasc Res**, **14** (9): 551-4, 1980.
- METZ, J.; AOKI, A.; MERLO, M.; FORSSMANN, W.G. -Morphological alterations and functional changes of interhepatocellular junctions induced by bile duct ligation. **Cell Tiss Res**, **182**: 299-310, 1977.

- MILANI, S.; HERBST, H.; SCHUPPAN, D.; KIM, K.Y.; RIECKEN, E.O.; STEIN, H. - Procollagen expression by nonparenchymal rat liver cells in experimental biliary fibrosis. **Gastroenterology**, **98**: 175-184, 1990.
- MIZOBUCHI, Y.; SHIMIZU, I.; YASUDA, M.; HORI, H.; SHONO, M.; ITO, S. - Retinyl palmitate reduces hepatic fibrosis in rats induced by dimethylnitrosamine or pig serum. **J Hepatol**, **29**: 933-43, 1998.
- O'CONNOR, M.J. - Mechanical biliary obstruction. **An Surg**, **51**: 245-51, 1985. [Review]
- OHTANI, O. - Three-dimensional organization of the collagen fibrillar framework of the human and rat livers. **Arch Histol Cytol**, **51**: 473-88, 1988.
- OKUNO, M.; MORIWAKI, H.; IMAI, S.; MUTO, Y.; KAWADA, N.; SUZUKI, Y.; KOJIMA, S. - Retinoids exacerbate rat liver fibrosis by inducing the activation of latent TGF- β in liver stellate cells. **Hepatology**, **26**: 913-21, 1997.
- OKUNO, M.; MUTO, Y.; MORIWAKI, H.; KATO, M.; NOMA, A.; TAGAYA, O.; NOZAKI, Y. - Inhibitory effect of acyclic retinoid (polyprenic acid) on hepatic fibrosis in CCl₄-treated rats. **J Gastroenterol**, **25**: 223-29, 1990.
- OKUNO, M.; SATO, T.; KITAMOTO, T.; IMAI, S.; KAWADA, N.; SUZUKI, Y.; YOSHIMURA, H.; MORIWAKI, H.; ONUKI, K.; MASUSHIGE, S.; MUTO, Y.; FRIEDMAN, S.L.; KATO, S.; KOJIMA, S. - Increased 9,13-di-cis-retinoic acid in rat hepatic fibrosis: implication for a potential link between retinoid loss and TGF-beta mediated fibrogenesis in vivo. **J Hepatol**, **30**: 6,1073-80, 1999.
- PARISE, E.; CHEHTER, L.; NOGUEIRA, M.D.; LEITE-MOR, M.M.B.; TERSARIOL, I.L.S.; MICHELACCI, Y.M.; NADER, H.B. - Effects of vitamin A administration on collagen and sulfated glycosaminoglycans contents in the livers of rats treated with carbon tetrachloride. **J Lab Clin Med**, **119** (6) : 676-81, 1992.
- PAROLA, M.; PINZANI, M.; CASINI, A.; ALBANO, E.; POLI, G.; GENTILINI, A. - Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxy-nonanal treatment increases procollagen (I) gene expression in human liver fat-storing cells. **Biochem Biophys Res Commun**, **194**: 1044-50, 1993.

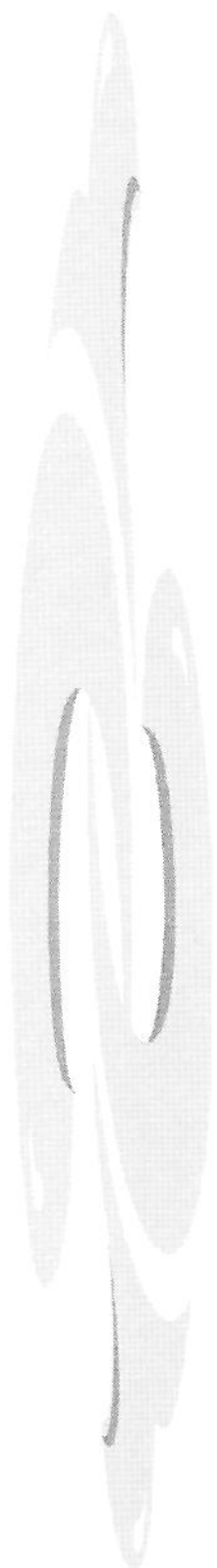
- PATWARDHAN, R.V.; SMITH, O.J.; FARMELANT, M.H. -Serum transaminase levels and cholescintigraphic abnormalities in acute biliary tract obstruction. **Arch Intern Med**, **147**:1249-53, 1987.
- PRATICO, D.; IULIANO, L.; BASILI, S.; FERRO, D.; CAMASTRA, C.; CORDOVA, C.; FITZGERALD, G.A.; VIOLI, F. -Enhanced lipid peroxidation in hepatic cirrhosis. **J Investig Med**, **46**: 2, 51-7, 1998.
- PUIGDEVALL, J.C. & D'AGOSTINO, D. - Atresia de vias biliares. In: MAKSOUD, J.G. - **Cirurgia Pediátrica**. Rio de Janeiro. Livraria e Editora Revinter Ltda, 1998. p.869-78.
- REIF, S.; TERRANOVA, V.P.; EL-BENDARY, M.; LEBENTHAL, E.; PETELL, J.K. - Modulation of extracellular matrix proteins in rat liver during development. **Hepatology**, **12** (3): 519-25, 1990.
- ROSSI, F.S.; VAZ, F.A.C.; RAMOS, J.L.A. -Displasia broncopulmonar e vitamina A: certezas e incertezas no manuseio do recém-nascido de muito baixo peso. **Pediatrics (São Paulo)**, **20** (1): 27-37, 1998.
- ROWE, M.I.; O'NEILL JR, J.A.; GROSFELD, J.L.; FONKALSRUD, E.W.; CORAN, A.G. -Biliary tresia. In: _____ - **ESSENTIALS OF PEDIATRIC SURGERY**. 1 ed. St. Louis, Mosby, 1995. p.625-30.
- RUSSEL, R.M.; BOYER, J.L.; BAGHERI, S.A. -Hepatic injury from chronic hypervitaminosis A resulting in portal hypertension and ascites. **N Engl J Med**, **291**: 435-40, 1974.
- SATO, M. & LIEBER, C.S. -Hepatic vitamin A depletion after chronic ethanol consumption in baboons and rats. **J Nutr**, **111**: 2015-23, 1981.
- SCHMITT-GRÄFF, A.; KRÜGER, S.; BOCHARD, F.; GABBIANI, G.; DENK, H. - Modulation of Alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. **Am J Pathol**, **138** (5):1233-42, 1991.

- SEIFERT, W.F.; BOSMA, A.; BROUWER, A.; HENDRIKS, H.F.J.; ROHOLL, P.J.M.; VAN LEEUWEN, R.E.W.; VAN THIEL DE RUITER, G.C.F.; SEIFERT-BOCK, I.; KNOOK, D.L. -Vitamin A deficiency potentiates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. **Hepatology**, **19**(1):193-201, 1994.
- SEIFERT, W.F.; BOSMA, A.; HENDRIKS, H.F.J.; BLANER, W.S.; VAN LEEUWEN, R.E.W.; VAN THIEL-DE RUITER, G.C.F.; WILSON, J.H.P.; KNOOK, D.L.; BROUWER, A. -Chronic administration of ethanol with high vitamin A supplementation in a liquid diet to rats does not cause liver fibrosis. 2. Biochemical observations. **J Hepatol**, **13**: 249-55, 1991.
- SEIFERT, W.F.; BOSMA, A.; HENDRIKS, H.F.J.; DE RUITER, G.C.F.; VAN LEEUWEN, R.E.W.; KNOOK, D.L.; BROUWER, A. -Dual Role Of Vitamin A In Experimentally Induced Liver Fibrosis. In: DECKER, K.; KNOOK, D.L.; WISSE, E. eds. Cells of the hepatic sinusoid. Rijswijk, The Netherlands: **Kupffer Cell Foundation**, **2**: 43-48, 1989.
- SEIFERT, W.F.; BOSMA, A.; HENDRIKS, H.F.; VAN LEEUWEN, R.E.; VAN THIEL DE RUITER, G.C.; SEIFERT-BOCK, I.; KNOOK, D.L.; BROUWER, A. -Beta-carotene (provitamin A) decreases the severity of Ccl4-induced hepatic inflammation and fibrosis in rats. **Liver**, **15** (1) : 1-8, 1995.
- SENOO, H. & WAKE, K. -Suppression of experimental hepatic fibrosis by administration of vitamin A. **Lab. invest.**, **52** (2) :182-94, 1985.
- SHIRATORI, Y.; ICHIDA, T.; GEERTS, A.; WISSE, E. -Modulation of collagen syntheses by fat-storing cells, isolated from ccl4- or vitamin A-treated rats. **Dig Dis Sci**, **32** (11): 1281-89, 1987.
- SILVA, P.M. - **Influência da hepatectomia sobre a síntese de colágeno cicatricial da pele abdominal e níveis séricos de vitaminas C e E. Estudo experimental em ratos.** Ribeirão Preto, 1998. (Tese - Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo).

- SLOTT, P.A.; LIU, M.H.; TAVOLONI, N. -Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology*, **99**:466-77, 1990.
- SOARES, E. G. **O coração na desnutrição protéico-calórica associada à infecção crônica experimental pelo *T. cruzi* : Estudo morfológico bioquímico e eletrocardiográfico.** Ribeirão Preto, 1987. (Tese –Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo).
- SOUZA, J. B. **Estudo da cicatrização em anastomoses no intestino delgado de coelhos tratados com diclofenaco sódico.** Ribeirão Preto, 1989. (Tese – Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo).
- SOUZA, M.E.J.; CASTRO-E-SILVA Jr., O.; PICINATO, M.A.N.C.; FRANCO, C.F.F.; MAZZETO, S.A.; CENEVIVA, R.; ROSELINO, J.E.S. -Serum transaminase levels in the acute phase of chronic extrahepatic cholestasis. *Braz J Med Biol Res*, **23** (10) :995-97, 1990.
- STEGEMANN, H. & STALDER, K. -Determination of hydroxiprolin. *Clin Chim Acta*, **18** (2) 267-73, 1967.
- TAMAYO, R.P. -Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCL4 na adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*, **3**: 112-20, 1983.
- TRAUNER, M.; MEIER, P.J.; BOYER, J.L. -Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med*, **339** (17): 1217-27, 1998.
- TSUKAMOTO, H. -Cytokine Regulation of Hepatic Stellate Cells in Liver Fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res*, **23** (5) 911- 16, 1999.
- TSUKAMOTO H, MATSUOKA M, FRENCH SW. -Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Seminars in liver disease*, **10** (1) : 56 – 64, 1990.

- TSUKAMOTO, H.; RIPPE, R.; NIEMELA, O.; LIN, M. -Roles of oxidative stress in activation of Kupffer and Ito cells in liver fibrogenesis. **J Gastroenterol Hepatol**, 10 (Suppl 1): S50-3, 1995.
- WAKE, K.-Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. **Int Rev Cytol**, 66:303-53, 1980.
- WATSON, J.P.; JONES, D.E.; JAMES, O.F.; CANN, P.A.; BRAMBLE, M.G. -Case report: oral antioxidant therapy for the treatment of primary biliary cirrhosis: a pilot study. **J Gastroenterol Hepatol**, 14: 1034-40, 1999.
- WEIBEL, E.R.; KISTLER, G.S.; SCHERLE, W.F. -Practical stereological methods for morphometric cytology. **J Cell Biol**, 30: 23-38, 1966.
- WEIGL, E.; BACH, H.; KRIEG, D. -Serumbilirubinwerte in der gesunden Bevölkerung. **MED KLIN**, 70 (15): 664-69, 1975.
- WEINER, F.R.; GIAMBRONE, M.A.; CZAJA, M.J.; SHAH, A.; ANNONI, G.; TAKAHASHI, S.; EGHBALI, M.; ZERN, M.A. -Ito-cell gene expression and collagen regulation. **Hepatology**, 11 (1): 111-117, 1990.
- WISSE, E.; BRAET, F.; LUO, D.; DE ZANGER, R.; JANS, D.; CRABBE, E.; VERMOESEN, A. - Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. **Toxicol Pathol**, 24(1):100-11, 1996.
- WISSE, E.; DE ZANGER, R.B.; CHARELS, K.; VAN DER SMISSEN, P.; MCCUSKEY, R.S. -The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. **Hepatology**, 5 (4): 683-92, 1985.
- WOESSNER, J.F. -The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. **Arch Biochem Biophys**, 93: 440-5, 1961.

- YAMANE, M.; TANAKA, Y.; MARUMO, F.; SATO, C. -Role of hepatic vitamin A and lipocyte distribution in experimental hepatic fibrosis. **Liver**, 13(5) : 282-7, 1993.
- YAMAOKA, K.; NOUCHI, T.; MARUMO, F.; SATO, C. -Alpha-smooth-muscle actin expression in normal and fibrotic human livers. **Dig Dis Sci**, 38 (8):1473-9, 1993.
- ZIMMERMANN, H.; BLASER, H.; ZIMMERMANN, A.; REICHEN, J. -Effect of development on the functional and histological changes induced by bile-duct ligation in the rat. **J Hepatol**, 20:231-39, 1994.



9. *ANEXOS*

Valores de hidroxiprolina tecidual hepática (expressos em $\mu\text{g} / 100 \text{ mg}$ de tecido hepático seco) e de colágeno hepático total (expressos em percentuais das áreas analisadas) individuais dos ratos com obstrução biliar (grupo OB), obstrução biliar + administração de vitamina A (grupo OV), e *sham* (grupo OS), de amostras do fígado colhidas por ocasião do sacrifício.

Rato	Grupo OB		Grupo OV		Grupo OS	
	Hidroxiprol	Colág total %	Hidroxiprol	Colág total %	hidroxiprol	Colág total %
1	308	10,65	173	7	78	3,35
2	265	13,35	248	12,35	69	3,35
3	300	10	220	6,65	80	4,35
4	445	17,35	250	8	73	4,35
5	195	14,35	204	20,65	85	1
6	147	17,35	147	7,35	81	3,65
7	314	11,65	302	11,65	98	3,35
8	490	15,65	224	4,35	90	2,35
9	353	12,65	281	11	81	2,35
10	393	12,65	164	4,35	89	1,65
11	376	11,35	157	4,65	97	2,35
12	377	7,35	216	10	88	3
13			136	5,35	81	2,65
14					85	1
15					92	2

Valores individuais das dosagens séricas da fosfatase alcalina (FA), bilirrubina total (BT), bilirrubina direta (BD), bilirrubina indireta (BI), gamaglutamil transferase (GGT), proteína total (PT), fração albumina (ALB), fração alfa-1 ($\alpha 1$), fração alfa-2 ($\alpha 2$), fração beta (β), fração gama (γ), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e hematócrito (HTC) dos ratos do grupo OB (obstrução biliar), colhidos na ocasião do sacrifício.

Rato	grupo	FA U / l	BT mg/dl	BD mg/dl	BI mg/dl	GGT U/l	PT g/dl	ALB g/dl	$\alpha 1$ g/dl	$\alpha 2$ g/dl	β g/dl	γ g/dl	AST U / l	ALT U / l	Htc mm/l h
1	OB	820	11,3	7,6	3,7	33	6,4	2,6	1,1	0,4	1,7	0,6	250	62	40
2	OB	1084	12	8	4	50	7,2	2,8	1,1	0,4	2,1	0,8	344	69	40
3	OB	815	10,6	7,4	3,2	50	7	2,4	1,2	0,4	1,9	1,1	284	41	45
4	OB	1420	10,2	6,5	3,7	37	6,6	1,9	1	0,5	2	1,2	396	58	38
5	OB	1372	6,2	4,2	2	75	7	2,9	1,2	0,6	1,8	0,6	541	127	40
6	OB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34
7	OB	587	12,6	8,6	4	46	7,4	3,9	0,8	0,3	1,8	0,6	568	112	50
8	OB	1003	12,6	8	4,6	28	6,7	2	0,7	0,7	1,9	1,4	205	69	52
9	OB	958	12,3	8,4	3,9	16	7,3	2,1	0,7	0,9	2,1	1,6	318	70	52
10	OB	1856	6,9	4,2	2,7	42	7	1,8	1,1	0,7	1,6	1,8	429	98	55
11	OB	764	11,5	8,1	3,4	53	7,1	2,5	1,1	0,6	1,9	0,9	195	43	47
12	OB	707	9,5	6,6	2,9	66	7,1	2,5	1,2	0,7	1,8	0,8	604	114	48

6 OB acidente na colheita de sangue,
material insuficiente

Valores individuais das dosagens séricas da fosfatase alcalina (FA), bilirrubina total (BT), bilirrubina direta (BD), bilirrubina indireta (BI), gamaglutamil transferase (GGT), proteína total (PT), fração albumina (ALB), fração alfa-1 ($\alpha 1$), fração alfa-2 ($\alpha 2$), fração beta (β), fração gama (γ), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e hematócrito (HTC) dos ratos do grupo OV (obstrução biliar + vitamina A), colhidos na ocasião do sacrifício.

Rato	grupo	FA U / l	BT mg/dl	BD mg/dl	BI mg/dl	GGT U/l	PT g/dl	ALB g/dl	$\alpha 1$ g/dl	$\alpha 2$ g/dl	β g/dl	γ g/dl	AST U / l	ALT U / l	Htc mm/l h
1	OV	1020	9,5	7	2,5	79	7	3,1	1,1	0,7	1,4	0,7	931	192	50
2	OV	1067	11,2	7,4	3,8	48	7,2	2,9	1,6	0,4	1,6	0,7	582	193	48
3	OV	976	10,4	6,9	3,5	42	6,9	2,9	1	0,4	2	0,6	671	157	43
4	OV	597	11	7,4	3,6	66	7,1	2,7	1	0,6	2	0,8	463	78	47
5	OV	1461	8,7	6	2,7	41	7,9	3,1	1,1	0,5	2	1,1	947	210	46
6	OV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	OV	807	9,6	6,6	3	28	6,7	2,5	1,1	0,7	1,4	1	778	208	47
8	OV	849	10,7	7,6	3,1	49	6,9	2,4	0,9	0,6	1,9	1,1	460	112	41
9	OV	678	11,3	7,7	3,6	17	6,2	2,1	1,2	0,5	1,2	1,2	287	43	43
10	OV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	OV	794	8,7	6,2	2,5	103	6,7	2,6	1,1	0,4	1,6	0,9	441	82	43
12	OV	863	8,6	5,9	2,7	28	7,4	2,3	1,5	2,1	1,1	0,4	261	64	45
13	OV	652	11	7,6	3,4	95	7	2,6	1,4	0,4	1,6	0,9	420	99	46

6 OV acidente na colheita de sangue,
material insuficiente

10 OV acidente na colheita de sangue,
material insuficiente

Valores individuais das dosagens séricas da fosfatase alcalina (FA), bilirrubina total (BT), bilirrubina direta (BD), bilirrubina indireta (BI), gamaglutamil transferase (GGT), proteína total (PT), fração albumina (ALB), fração alfa-1 ($\alpha 1$), fração alfa-2 ($\alpha 2$), fração beta (β), fração gama (γ), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e hematócrito (HTC) dos ratos do grupo OS (*sham* – operação simulada), colhidos por ocasião do sacrifício.

Rato	grupo	FA U / l	BT mg/dl	BD mg/dl	BI mg/dl	GGT U/l	PT g/dl	ALB g/dl	$\alpha 1$ g/dl	$\alpha 2$ g/dl	β g/dl	γ g/dl	AST U / l	ALT U / l	Htc mm/l h
1	OS	421	0,2	0	0,2	8	5,3	2,8	0,7	0,2	1,1	0,5	129	60	39
2	OS	255	0,2	0	0,2	19	6,3	3,4	0,8	0,3	1	0,6	76	48	40
3	OS	-	-	-	-	10	6,7	3,7	0,9	0,5	1,1	0,5	-	-	46
4	OS	473	0,2	0	0,2	13	6,7	3,1	0,9	0,5	1,2	1	103	57	40
5	OS	-	-	-	-	10	6,8	3,3	0,8	0,4	1,4	0,9	-	-	41
6	OS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	OS	502	0,2	0	0,2	4	5,9	2,7	1	0,3	1,3	0,5	153	52	41
8	OS	268	0,2	0	0,2	9	5,3	2,8	0,7	0,2	1,1	0,5	144	37	47
9	OS	349	0,2	0,1	0,1	4	6,4	3,7	1	0,2	0,9	0,6	132	34	49
10	OS	349	0,2	0,1	0,1	6	6,4	3,4	0,9	0,3	0,9	0,8	242	39	48
11	OS	205	0,2	0	0,2	8	5,5	2,6	1	0,2	0,9	0,7	222	30	48
12	OS	338	0,2	0,1	0,1	6	6,5	4	0,6	0,2	0,9	0,8	156	32	47
13	OS	220	0,2	0,1	0,1	5	6,7	3,3	1	0,3	1,3	0,8	281	49	48
14	OS	269	0,3	0,1	0,2	8	6,1	3,1	1,3	0,2	0,9	0,5	226	37	45
15	OS	348	0,2	0	0,2	7	6,5	3,3	0,9	0,5	0,9	0,9	124	38	49

3 OS perda parcial / material insuficiente

5 OS perda parcial / material insuficiente

6 OS acidente na colheita de sangue, material insuficiente

Idades e pesos dos animais do grupo OB, nas ocasiões da laparotomia e do sacrifício. Sinais clínicos.

		laparotomia		Sacrifício		Sinais clínicos
rato	Grupo	Idade (dias)	Peso (gramas)	Idade (dias)	Peso (gramas)	icterícia, colúria
1	OB	43	130	77	226	
2	OB	43	140	77	239	
3	OB	43	123	77	230	
4	OB	43	145	77	180	
5	OB	44	100	77	215	
6	OB	44	109	77	230	
7	OB	47	124	82	233	
8	OB	47	114	82	163	
9	OB	47	116	82	166	
10	OB	47	110	82	125	
11	OB	47	115	82	189	
12	OB	47	116	82	204	
Média	OB	45,17	120,17	79,50	200	
EPM	OB	0,56	3,76	0,75	10,30	

Idades e pesos dos animais do grupo OV, nas ocasiões da laparotomia e do sacrifício. Sinais clínicos.

		1. ^a injeção*	laparotomia		Sacrifício		Sinais clínicos
Rato	Grupo	Idade (dias)	Idade (dias)	Peso (gramas)	Idade (dias)	Peso (gramas)	icterícia, colúria
1	OV	33	47	135	82	223	
2	OV	33	47	150	82	233	
3	OV	33	47	151	82	243	
4	OV	33	47	140	82	190	
5	OV	33	47	144	82	217	
6	OV	33	47	125	82	186	
7	OV	33	47	146	82	169	
8	OV	29	43	142	78	234	
9	OV	29	43	130	78	200	
10	OV	29	43	139	78	201	
11	OV	29	43	115	78	198	
12	OV	29	43	133	78	211	
13	OV	29	43	127	78	224	
Média	OV	31,15	45,15	136,64	80,15	209,92	
EPM	OV	0,58	0,58	2,94	0,58	5,99	

* - Idade à 1.^a injeção de vitamina A.

Idades e pesos dos animais do grupo OS, nas ocasiões da laparotomia e do sacrifício. Sinais clínicos.

Rato	Grupo	laparotomia		sacrifício		Sinais clínicos
		Idade (dias)	Peso (gramas)	Idade (dias)	Peso (gramas)	sem anormalidades
1	OS	47	150	77	260	
2	OS	47	133	77	260	
3	OS	47	175	77	255	
4	OS	47	175	77	270	
5	OS	47	180	77	273	
6	OS	47	175	77	250	
7	OS	43	113	77	230	
8	OS	43	122	78	254	
9	OS	43	113	78	240	
10	OS	43	124	78	239	
11	OS	43	110	78	230	
12	OS	43	108	78	258	
13	OS	43	129	78	269	
14	OS	43	117	78	235	
15	OS	43	101	78	205	
Média	OS	44,6	135	77,53	248,53	
EPM	OS	0,52	7,30	0,13	4,80	

ESTUDO PILOTO

Valores individuais, das médias e EPM de hidroxiprolina tecidual hepática (expressos em $\mu\text{g} / 100 \text{ mg}$ de tecido hepático seco) e de colágeno hepático total (expressos em percentuais das áreas analisadas) dos ratos submetidos à administração de vitamina A (grupo VA) e dos ratos do grupo-controle (grupo C) de amostras do fígado colhidas por ocasião do sacrifício.

Rato	Grupo VA		Grupo C	
	Hidroxiprol	Colág total %	Hidroxiprol	Colág total %
1	115	2,65	73	2
2	108	2,65	83	2,35
3	91	1	63	3,35
4	101	3,65	69	0,65
5	127	1,65		
6	124	2		
Média	111	2,27	72	2,09
EPM	5,63	0,38	4,20	0,56

ESTUDO PILOTO

Valores individuais, das médias e EPM das dosagens séricas da fosfatase alcalina (FA), bilirrubina total (BT), bilirrubina direta (BD), bilirrubina indireta (BI), gamaglutamil transferase (GGT), proteína total (PT), fração albumina (ALB), fração alfa-1 ($\alpha 1$) fração alfa-2 ($\alpha 2$) fração beta (β) fração gama (γ), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e hematócrito (HTC) dos ratos do grupo VA (vitamina A), colhidos na ocasião do sacrifício.

Rato	Grupo	FA U / l	BT mg/dl	BD mg/dl	BI mg/dl	GGT U/l	PT g/dl	ALB g/dl	$\alpha 1$ g/dl	$\alpha 2$ g/dl	β g/dl	γ g/dl	AST U / l	ALT U / l	Htc mm/l h
1	VA	454	0,2	0,1	0,1	9	5,9	3,1	0,6	0,4	1,1	0,7	150	35	51
2	VA	346	0,2	0,1	0,1	19	6,1	3,2	0,7	0,4	1,2	0,6	183	36	44
3	VA	284	0,2	0,1	0,1	16	6,4	3,1	1,1	0,4	1	0,9	193	34	53
4	VA	267	0,2	0,1	0,1	19	5,3	3,3	0,8	0,5	1	0,7	149	31	50
5	VA	284	0,2	0,1	0,1	6	5,6	2,8	0,8	0,3	0,8	0,8	128	27	53
6	VA	294	0,2	0,1	0,1	8	5,6	2,8	0,9	0,3	0,8	0,8	98	39	50
Média	VA	321,5	0,2	0,1	0,1	12,83	5,82	3,05	0,82	0,38	0,98	0,75	150,17	33,67	50,17
EPM	VA	28,69	0	0	0	2,39	0,16	0,08	0,83	0,03	0,07	0,04	14,29	1,71	1,35

ESTUDO PILOTO

Valores individuais, das médias e EPM das dosagens séricas da fosfatase alcalina (FA), bilirrubina total (BT), bilirrubina direta (BD), bilirrubina indireta (BI), gamaglutamil transferase (GGT), proteína total (PT), fração albumina (ALB), fração alfa-1 ($\alpha 1$) fração alfa-2 ($\alpha 2$) fração beta (β) fração gama (γ), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e hematócrito (HTC) dos ratos do grupo C (controle), colhidos na ocasião do sacrifício.

Rato	Grupo	FA U / l	BT mg/dl	BD mg/dl	BI mg/dl	GGT U/l	PT g/dl	ALB g/dl	$\alpha 1$ g/dl	$\alpha 2$ g/dl	β g/dl	γ g/dl	AST U / l	ALT U / l	Htc mm/l h
1	C	330	0,2	0,1	0,1	6	6,2	3,3	0,8	0,3	1,1	0,6	123	34	43
2	C	228	0,2	0	0,2	5	5,9	2,6	1,3	0,3	1	0,8	119	44	43
3	C	295	0,2	0	0,2	8	6,3	3,3	1,1	0,4	1	0,6	113	47	42
4	C	203	0,2	0	0,2	8	6	3,3	0,9	0,3	0,9	0,5	83	34	45
Média	C	264	0,2	0,03	0,18	6,75	6,1	3,13	1	0,32	1	0,63	109,5	39,75	42,5
EPM	C	29,35	0	0,03	0,03	0,75	0,09	0,18	0,11	0,03	0,04	0,06	9,07	3,38	0,29

ESTUDO PILOTO

Idades e pesos dos animais do grupo VA, nas ocasiões da 1.^a injeção de vitamina A e do sacrifício.
Comentários (evolução; intercorrências).

		1. ^a injeção*	sacrifício		Sinais clínicos
RATO	GRUPO	Idade (dias)	Idade (dias)	Peso (gramas)	Sem anormalidades
1	VA	27	75	259	
2	VA	27	75	242	
3	VA	27	75	253	
4	VA	27	75	237	
5	VA	27	75	261	
6	VA	27	75	245	
Média	VA	27	75	249,5	
EPM	VA	0	0	3,95	

* - Idade à 1.^a injeção de vitamina A.

ESTUDO PILOTO

Idades e pesos dos animais do grupo C, na ocasião do sacrifício. Sinais clínicos.

		sacrifício		Sinais clínicos
RATO	GRUPO	Idade (dias)	Peso (gramas)	sem anormalidades
1	C	82	236	
2	C	82	234	
3	C	82	249	
4	C	82	258	
Média	C	82	244,25	
EPM	C	0	5,66	