

**CRISTIANE FRANCO PENTEADO**

---

**ESTUDO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS *IN VITRO*  
EM COELHOS HEPATOPATAS**

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Cristiane Franco Penteado.*

*Campinas, 26 de abril de 2001.*

*José P. Júnior*  
**Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior**  
*- Orientador -*

**Orientador: Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior**

i  
UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**CRISTIANE FRANCO PENTEADO**

---

**ESTUDO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS *IN VITRO*  
EM COELHOS HEPATOPATAS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

**Orientador: Dr. José Pedrazzoli Júnior**



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

Penteado, Cristiane Franco

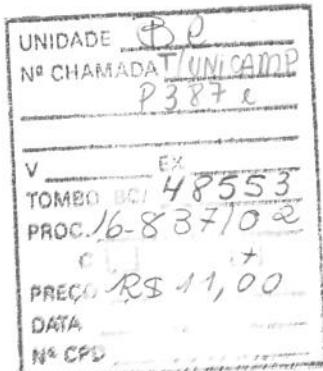
P388e  
P387e

Estudo da migração de neutrófilos in vitro em coelhos hepatopatas /  
Cristiane Franco Penteado. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : José Pedrazzoli Júnior

Tese ( Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas.

1. Neutrófilos. 2. Cirrose Hepática. 3. Migração. I. José  
Pedrazzoli Júnior. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas. IV. Título.



CM00166713-9

BIB ID 237894



**UNICAMP**

---

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

---

---

### Orientador:

**Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior**

---

---

### Membros:

**Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior**

---

A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. Pedrazzoli Júnior".

**Prof. Dr. Alex Vianey Callado França**

---

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Alex Vianey Callado França".

**Profa. Dra. Albetiza Lôbo Araújo**

---

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Albetiza Lôbo Araújo".

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data: 26/04/01**

---

***É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar.***

***É melhor tentar ainda em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.***

***Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.***

***Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver.***

***Martin Luther King***

## **DEDICATÓRIA**

---

**Aos meus pais, Toninho e Landa, que com  
amor e paciência participaram e continuam  
participando de todas as fases de minha vida;**

**Ao meu irmão Carlos, pela  
solidariedade e carinho em todos os momentos;**

**Ao meu namorado Everton pelo companheirismo e amor.**

## **AGRADECIMENTOS**

---

Ao Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior, pela acolhida, orientação, ensinamentos, paciência, amizade e confiança que me incentivou e tornou este trabalho possível.

À Profa. Dra. Heloísa Helena de Araújo Ferreira pelos ensinamentos, orientação, amizade e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

A todos os amigos da UNIFAG (Miro, Dra. Silvana, Dr. Sérgio, Maristela, Fernanda, Sérgio, Adriano, Breda, Mônica e Yara), que me incentivaram durante este trabalho.

À Andresa, Tânia e Juliana, pelo imprescindível apoio técnico na realização dos experimentos.

A todos os funcionários do biotério da USF e do laboratório de análises clínicas da USF, pelo apoio e acolhimento.

A todos os funcionários do laboratório de Patologia Clínica da USF, em especial a Profa. Helenice e ao Prof. Carlos, responsáveis pelas análises histológicas.

À minha prima Carla, pela amizade e paciência durante a realização deste trabalho.

A todos os coelhos utilizados neste trabalho.

A toda minha família e a todos os meus amigos pela amizade e apoio constantes em todos os momentos de minha vida.

À FAPESP pelo auxílio financeiro e a acessoria pelos comentários pertinentes.

Ao IPPEX USF pelo apoio financeiro para o Projeto de Pesquisa.

## **SUMÁRIO**

---

### **LISTA DE ABREVIATURAS**

### **LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

### **RESUMO**

### **SUMMARY**

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
<b>3.1 Procedência das drogas .....</b>	<b>40</b>
<b>3.2 Animais .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3 Tratamento com o tetracloreto de carbono (CCL<sub>4</sub>) .....</b>	<b>41</b>
<b>3.3.1 Dosagens séricas das enzimas ALT e AST .....</b>	<b>42</b>
<b>3.4 Contagem dos leucócitos .....</b>	<b>42</b>
<b>3.5 Quimiotaxia <i>in vitro</i> de neutrófilos .....</b>	<b>43</b>
<b>3.5.1 Obtenção de neutrófilos .....</b>	<b>43</b>
<b>3.5.2 Ensaio de quimiotaxia <i>in vitro</i> .....</b>	<b>44</b>
<b>3.6 Fixação e processamento do fígado para microscopia de luz .....</b>	<b>44</b>
<b>3.7 Análise estatística .....</b>	<b>45</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	
<b>4.1 Efeito do tratamento com o fenobarbital sobre o nível sérico das enzimas, o número total e diferencial dos leucócitos e sobre a resposta quimiotática dos neutrófilos, obtidos do sangue periférico .....</b>	<b>46</b>

<b>4.2 Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre os níveis séricos das enzimas ALT e AST .....</b>	<b>48</b>
<b>4.3 Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> por 16 semanas sobre o número total e diferencial dos leucócitos e sobre a resposta quimiotática dos neutrófilos obtidos do sangue periférico dos animais, uma semana após a administração do CCL<sub>4</sub> .....</b>	<b>50</b>
<b>    4.3.1 Análise total e diferencial dos leucócitos .....</b>	<b>50</b>
<b>    4.3.2 Quimiotaxia <i>in vitro</i> dos neutrófilos .....</b>	<b>52</b>
<b>    4.3.3 Análise histológica dos fígados dos coelhos tratados com o CCL<sub>4</sub> .....</b>	<b>54</b>
<b>4.4 Efeitos da administração do CCL<sub>4</sub>, nos animais sacrificados em diferentes períodos de tratamento: 24 horas após a administração da última dose da droga .....</b>	<b>56</b>
<b>4.5 Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre os níveis séricos das enzimas ALT e AST .....</b>	<b>56</b>
<b>4.6 Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre o número total e diferencial dos leucócitos e sobre a resposta quimiotática dos neutrófilos obtidos do sangue periférico dos animais, 24 horas após a administração do CCL<sub>4</sub> .....</b>	<b>58</b>
<b>    4.6.1 Análise total e diferencial dos leucócitos .....</b>	<b>58</b>
<b>    4.6.2 Quimiotaxia <i>in vitro</i> dos neutrófilos .....</b>	<b>60</b>
<b>    4.6.3 Análise histológica dos fígados dos coelhos tratados durante diferentes períodos .....</b>	<b>62</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>76</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>77</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
C3	Fragmento 3 do sistema complemento
C5a	Fragmento 5a do sistema complemento
CCL <sub>3</sub>	Triclorometil radical
CCL <sub>4</sub>	Tetracloreto de carbono
EDTA	Ácido etilenodiamunotetraacético
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
γ-GT	Gama glutamil transpeptidase
HE	Hematoxilina-eosina
HSC	Células hepáticas estreladas
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-12	Interleucina 12
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LT	Leucócitos totais
MEM	Meio mínimo essencial de Eagle
MN	Mononucleares
NE	Neutrófilos
NO	Óxido nítrico
PMN	Polimorfonucleares
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
USF	Universidade São Francisco

## **LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

---

**Tabela 1** - Efeito da administração do fenobarbital sobre a quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos, o número de leucócitos totais (LT), neutrófilos (NE) e mononucleares (MN), e sobre os níveis séricos das enzimas ALT e AST, obtidos do sangue periférico dos coelhos.

47

**Figura 1** - Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre os níveis séricos das enzimas ALT (A) e AST (B).

49

**Tabela 2** - Efeito da administração do CCL<sub>4</sub> sobre o número de leucócitos totais (LT), neutrófilos (NE) e mononucleares (MN) obtidos do sangue periférico dos animais tratados e controles.

51

**Figura 2** - Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre a quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos ao fMLP durante 16 semanas.

53

**Tabela 3** - Efeito do CCL<sub>4</sub> sobre o fígado dos coelhos sacrificados 1 semana após a última administração da droga.

55

**Figura 3** - Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre os níveis séricos das enzimas ALT (A) e AST (B), obtidas do sangue dos coelhos sacrificados em diferentes períodos (2, 4, 6 e 8 semanas).

57

**Figura 4** - Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre os números de leucócitos totais, neutrófilos (NE) e mononucleares (MN), obtidos do sangue dos animais sacrificados em diferentes períodos (2, 4, 6 e 8 semanas).

59

**Figura 5** - Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre a quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos, obtidos dos coelhos sacrificados em diferentes períodos (2, 4, 6 e 8 semanas).

61

**Tabela 4** - Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre o fígado, nos coelhos sacrificados após 2 semanas de administração da droga.

64

**Tabela 5** - Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre o fígado, nos coelhos sacrificados após 4 semanas de administração da droga.

65

**Tabela 6** - Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre o fígado, nos coelhos sacrificados após 6 semanas de administração da droga.

66

**Tabela 7** - Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre o fígado, nos coelhos sacrificados após 8 semanas de administração da droga.

67

**Figura 6** – Corte histológico do fígado do coelho controle.

68

**Figura 7** – Cortes histológicos de fígados dos animais tratados com CCL<sub>4</sub>.

69

**Figura 8** – Cortes histológicos de fígados retirados dos coelhos tratados com o CCL<sub>4</sub>.

70

## RESUMO

---

A doença hepática crônica apresenta diversas causas, sendo caracterizada por diferentes graus de inflamação e necrose hepatocelular. A hepatite crônica pode ocorrer devido a vírus, reações autoimunes, drogas ou toxinas. Utilizando-se o modelo experimental de hepatopatia em coelhos induzido por CCL<sub>4</sub>, o objetivo deste estudo foi investigar uma possível relação entre alguns parâmetros relacionados ao processo inflamatório (quimiotaxia de neutrófilos e análise total e diferencial dos leucócitos) e a lesão hepática. A extensão do dano hepático produzido pelo CCL<sub>4</sub> foi investigada através da análise histológica dos fígados.

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com CCL<sub>4</sub> induziu lesão hepática nos coelhos, conforme demonstrada pela análise histológica e pela elevação dos níveis séricos das enzimas ALT e AST. A análise histológica indicou a presença de hepatite após a 2<sup>a</sup> semana e de cirrose na 6<sup>a</sup> ou 8<sup>a</sup> semana de tratamento com CCL<sub>4</sub>. A resposta quimiotática *in vitro* dos neutrófilos verificada uma semana após a administração da droga, mostrou aumento entre a 2<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semana de tratamento. Quando verificada 24 h após a droga, a quimiotaxia apresentou elevação a partir da 2<sup>a</sup> até a 8<sup>a</sup> semana de tratamento. Neste mesmo período observou-se também aumento no número dos neutrófilos do sangue periférico.

Levando-se em conta a verificação da presença de neutrófilos no fígado dos animais com cirrose, estes resultados 24 horas após a droga, sugerem que o aumento da migração *in vitro* dos neutrófilos e a elevação do número dos polimorfonucleares do sangue periférico podem estar relacionados à ativação e ao recrutamento destas células inflamatórias para o fígado, onde desempenham importante função no desenvolvimento do dano hepático.

## SUMMARY

---

The aim of this study was to investigate neutrophil chemotaxis during the induction of liver cirrhosis in rabbits.

The study had three experimental arms: Group A (n=16) served as controls and received only normal rabbit chow. All animals were sacrificed at 16 weeks. Group B (n=19) was sacrificed 48 h after the chemotaxis assay, which was performed 24 h after CCL<sub>4</sub> administration, at weeks 2, 4, 6 and 8. Group C (n=8) was followed by 16 weeks. The chemotaxis assay was performed 1 week after CCL<sub>4</sub> administration. All animals were sacrificed at 16 weeks.

The rabbits were treated with intragastric administration of CCL<sub>4</sub> once weekly starting 14 days after addition of Phenobarbital to the drinking water (50mg/day). The CCL<sub>4</sub> dose was adjusted weekly in order to obtain serum ALT and AST levels between 400 and 800 IU/l.

Our results showed that increased ALT and AST levels were found in all of CCL<sub>4</sub>-treated rabbits compared to the controls. In liver from animals sacrificed in 2, 4, 6 and 8 weeks of CCL<sub>4</sub> treatment, hepatitis and fibrosis were already found at week two, and liver cirrhosis at week 6 and 8. Sixteen-week CCL<sub>4</sub> treatment resulted in liver cirrhosis in 7 animals (87.5%). All animals with liver cirrhosis had an inflammatory infiltrate with neutrophils.

Treatment with CCL<sub>4</sub> did not interfere with total leukocyte count in blood from animals sacrificed in different periods, but a significant increase in polymorphonuclear cells between weeks 2 to 8 and a significant reduction in mononuclear leukocytes at week 4 were observed when compared with control animals. Neutrophil chemotaxis was also significantly increased from week 2 through week 8 compared with the control group.

Animals that received CCL<sub>4</sub> for 16 weeks present a significantly increased total leukocyte and polymorphonuclear number at week 10 when compared to controls. The mononuclear cell number was unchanged during the study period. A significant increase in neutrophil chemotaxis was observed from week 2 through week 6.

The presence of neutrophils in the liver of all animals with cirrhosis associated with an increase in polymorphonuclear cell chemotaxis during CCL<sub>4</sub> administration in our experiment supports the view that this cell line has an important role in the development of toxic liver damage.

## 1 - INTRODUÇÃO

---

A doença hepática crônica apresenta diversas causas, sendo caracterizada por diferentes graus de inflamação e necrose hepatocelular. A hepatite crônica pode ocorrer devido a vírus, reações autoimunes, drogas ou toxinas (Desmet et al., 1994).

O vírus da hepatite B pode provocar hepatite aguda ou crônica, não se conhecendo a causa de alguns pacientes desenvolverem hepatite crônica e a maioria dos pacientes desenvolver processo agudo com posterior clareamento do vírus. Não há evidência de que a hepatite pelo vírus A possa evoluir para hepatite crônica (Bianchi et al., 1977). O vírus da hepatite C causa doença hepática crônica, levando a sérias consequências incluindo cirrose e carcinoma hepatocelular (Vergani et al., 1993; Jamal et al., 1999). Nos Estados Unidos o vírus da hepatite C é uma das grandes causas do desenvolvimento de doença hepática crônica (Everson et al., 1999). Elevação do nível sérico da enzima alanina aminotransferase (ALT), pode sugerir inflamação hepatocelular e necrose, e determinadas vezes pode ser considerada como uma sugestão de hepatite crônica pelo vírus C (Jamal et al., 1999). A ALT é uma enzima citosólica do hepatócito, e um aumento sérico desta enzima reflete um aumento de permeabilidade da membrana plasmática, que por sua vez, está associada com a morte celular (Muriel, 1998). Sorbi et al. (1999), propõem um modelo para diferenciar a esteatohepatite não alcoólica da doença hepática alcoólica utilizando a proporção aspartato aminotransferase (AST)/ALT.

O recrutamento das células inflamatórias é o primeiro evento após a injúria de algum tecido, neutralizando os agentes agressivos e removendo tecidos necrosados, em seguida há a proliferação e a migração de células semelhantes a miofibroblastos, que penetram na lesão e secretam a matriz extracelular (Marra, 1999) composta por três grandes grupos de macromoléculas, sendo elas os colágenos, os proteoglicanos e

o complexo de glicoproteínas assim como a fibronectina (Yamauchi et al., 1994). Em uma terceira fase, a matriz extracelular é remodelada e há a regeneração das células parenquimatosas, reconstituindo a arquitetura normal do tecido. Em casos de dano prolongado ou crônico, estas três fases ocorrem simultaneamente resultando em inflamação crônica com cicatrização e disfunção orgânica. O fígado pode ser considerado um modelo clássico desta cicatrização (Olaso & Friedman, 1998; Marra, 1999). Após a hepatite aguda o fígado pode retornar à sua arquitetura e função normais, uma vez que haja oclareamento do vírus ou a descontinuação da agressão. Em contraste, na hepatite crônica viral ou durante o abuso crônico do etanol, a presença concomitante de inflamação e deposição de matriz extracelular associadas com regeneração anormal, induzem a fibrose e cirrose. A participação das células hepáticas estreladas (HSC, também conhecidas como células de Ito ou lipócitos) na cicatrização, foi reconhecida quando foram identificadas como responsáveis pela maior parte da produção de matriz extracelular na injúria hepática (Marra, 1999).

A cirrose é um processo hepático difuso caracterizado pela transformação da arquitetura normal em nódulos estruturalmente anormais. São três os mecanismos principais que se associam na formação da cirrose: morte de células, fibrose e regeneração. O processo inicia-se comumente, após ter ocorrido morte de células, de maneira constante e persistente, durante longo período. Desse modo, é necessário que o agente causal atue durante longo tempo para produzir cirrose (Conn, 1993). A cirrose hepática é uma das formas de apresentação da doença hepática produzida pelo alcoolismo, cujas repercussões no sistema imunológico são importantes para o entendimento da fisiopatologia da doença e o prognóstico dos pacientes. As alterações produzidas pelo etanol no sistema imune são várias e incluem entre outras, a neutropenia, diminuição da quimiotaxia de leucócitos e queda da imunidade celular (Calamita & Burini, 1995).

A diferença entre cirrose e fibrose relaciona-se com a presença de nódulos de regeneração encontrados na primeira, enquanto que na fibrose hepática, estes elementos não estão presentes (Mincis, 1979). Fibrose e cirrose são os últimos graus da doença hepática crônica (Jiang et al., 1992; Rojkind & Dunn, 1993).

A fibrose é uma característica de muitas doenças hepáticas (Buschmann & Ryoo, 1989). Considerada como excesso de tecido conjuntivo do fígado, a fibrose geralmente faz parte do processo de reparação, mas admite-se também que a fibrogênese possa iniciar-se diretamente sem a intervenção do processo de necrose (Rojkind & Dunn, 1993). A fibrose hepática ou a deposição de matriz extracelular era vista como uma característica estática da doença hepática crônica que inevitavelmente evoluiria para cirrose ou falência hepática. Atualmente a fibrose pode ser considerada como uma resposta programada à injúria, dinâmica e reversível. Esta nova visão foi alcançada graças aos avanços na biologia celular e molecular e pelo desenvolvimento de métodos para isolar e caracterizar as células hepáticas (Olaso & Friedman, 1998).

A susceptibilidade às infecções bacterianas é uma complicação de algumas doenças hepáticas, podendo estar relacionada com deficiências nas funções imunológicas ou mediadas por células (Campbell et al., 1981; Rajkovic et al., 1984). Diferentes anormalidades do sistema imune têm sido descritas em pacientes com doenças hepáticas crônicas (Mincis & Lanzoni, 1997). As células inflamatórias como alguns leucócitos, também estão envolvidas no desenvolvimento de um grande número de doenças hepáticas, incluindo hepatite alcoólica, cirrose, hepatites virais e cirrose biliar primária (Jaeschke, 1997).

Os polimorfonucleares (PMN), particularmente os neutrófilos, estão envolvidos na síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), encontrada com alta incidência na cirrose (Rosenblom et al., 1995). Os neutrófilos são encontrados no fígado em várias condições patológicas, incluindo hepatite alcoólica, endotoxemia, choque hemorrágico e heptatectomia (Jaeschke & Smith, 1997). Desempenham função importante na defesa contra todos os tipos de agentes infecciosos, fagocitando e matando os organismos patogênicos, pela liberação de substâncias citotóxicas como radicais livres e enzimas proteolíticas que podem ser prejudiciais aos tecidos (Smith, 1994; Rosenblom et al., 1995; Sugawara et al., 1995; Jaeschke et al., 1996). Os neutrófilos parecem estar envolvidos na gênese do dano hepatocelular (Jaeschke et al., 1996). O acúmulo de neutrófilos durante a inflamação aguda depende de uma cascata de interações entre os mesmos e, células endoteliais, outros leucócitos, matriz

extracelular, e células parenquimatosas (Jaeschke & Smith, 1997). Estas interações acontecem devido às moléculas de adesão que são classificadas em 3 diferentes famílias: selectinas, integrinas e a superfamília das imunoglobulinas (Jaeschke, 1997). A migração dos neutrófilos inicia-se com sua aderência a superfície das células endoteliais de vênulas pós-capilares da microcirculação local. A adesão de leucócitos na parede do endotélio vascular envolve processos específicos entre moléculas de adesão presentes nos leucócitos e nas superfícies das células endoteliais (Osborn, 1990; Mackay & Imhof, 1993). Após a aderência, os neutrófilos sofrem mudanças de forma e migram para o espaço extracelular, através das junções entre as células endoteliais. A seguir, migram até o sítio lesado, obedecendo a um gradiente químico de mediadores conhecidos como fatores quimiotáticos, que incluem substâncias como a interleucina-1 (IL-1), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-8 (IL-8) e o fragmento 5a do sistema complemento (C5a) (Harkness, 1981; Rossi & Hellewell, 1994). Outros fatores, como o peptídeo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), são capazes de agir diretamente nos neutrófilos ativando seus mecanismos de locomoção e aderência, induzindo assim a quimiotaxia (Wilkinson, 1984). A necrose dos hepatócitos com infiltração de células polimorfonucleares é uma característica da hepatite alcoólica (MacSween et al., 1981; Takahashi et al., 1987). Uma diminuição da quimiotaxia de neutrófilos, observada em pacientes com hepatite alcoólica, pode estar relacionada à predisposição destes indivíduos às infecções bacterianas (Van Epps et al., 1975; Rajkovic et al., 1984). Apesar dos mecanismos não serem totalmente conhecidos, este fenômeno pode ser decorrente de uma deficiência nos mecanismos relacionados à locomoção celular, ou consequência da inibição do C5a, considerado um importante agente quimiotáxico para os neutrófilos (Robbins et al., 1987). Esta condição poderia, então, resultar em uma redução da capacidade de montar uma resposta inflamatória necessária para a defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos.

No fígado, são produzidos principalmente pelas células de Kupffer, citocinas como o TNF- $\alpha$ , a IL-1 e a interleucina-6 (IL-6) (Khoruts et al., 1991). Várias citocinas participam da fibrogênese, aumentando a síntese da matriz proteica. Assim, elas agem

como moléculas sinalizantes e são potentes mediadoras de uma larga cadeia de efeitos biológicos, exercendo múltiplas atividades (Llorente et al., 1996). O papel potencial das citocinas na patogênese das doenças hepáticas não está totalmente determinado. Pacientes com hepatite possuem várias anormalidades imunológicas, que podem ser relacionadas com a produção de citocinas. Níveis plasmáticos aumentados de TNF- $\alpha$  e interferon gama (IFN- $\gamma$ ), foram detectados em pacientes com hepatite aguda pelo vírus B e níveis aumentados de interleucina-4 (IL-4) e IL-6 foram detectados em pacientes com hepatite crônica do tipo autoimune (Al-Wabel et al., 1993). A administração intravenosa de TNF- $\alpha$  ou IL-1 em animais de laboratório, induz a elevação dos níveis circulantes de IL-8, entretanto, não foi detectado aumento de TNF- $\alpha$  ou IL-1 após a administração intravenosa de IL-8 (Matsukawa et al., 1997; Miyamoto et al., 1997). O alcoolismo ativo está associado com níveis elevados de interleucina-12 (IL-12) circulante, tanto nos pacientes alcoólicos crônicos sem doença hepática, quanto nos pacientes com cirrose alcoólica. Em contraste, níveis séricos normais foram detectados nos pacientes cirróticos, com menos de 1 ano da retirada do álcool (Laso et al., 1998). Na hepatite alcoólica, os níveis elevados de citocinas correlacionaram-se com os índices de mortalidade, assim como, a elevação dos níveis séricos de bilirrubina (Sheron et al., 1991; Khoruts et al., 1991; Bird, 1994). A IL-8 é conhecida como um fator quimiotático não só para os neutrófilos, mas também para as células T, sendo uma potente mediadora na resposta inflamatória à infecção e à injúria (Masumoto et al., 1998). Fortes evidências sugerem uma relação entre os níveis aumentados de IL-8, neutrofilia e infiltrado hepático de polimorfonucleares, freqüentemente observados na hepatite alcoólica (Hill et al., 1993; Sheron et al., 1993).

Outro fator solúvel envolvido na doença hepática é o óxido nítrico (NO), cuja produção pode ser benéfica ou prejudicial (Taylor et al., 1998). Os resultados de Muriel (1998), sugerem que o NO endógeno protege o fígado contra o dano induzido pela intoxicação crônica causada pelo tetracloreto de carbono ( $CCL_4$ ), provavelmente, diminuindo a toxicidade dos radicais livres, além de modular o metabolismo hepático de carboidratos e reduzir a produção de colágeno. Evidências indiretas têm sugerido que a síntese e liberação de NO está aumentada na cirrose, e que esta substância pode ter

uma função na patogênese da vasodilatação periférica observada nesta condição (Laffi et al., 1995).

Outros componentes da resposta imune, também considerados mediadores solúveis da resposta inflamatória, apresentam-se com níveis modificados nas hepatopatias. As imunoglobulinas A, G e M (IgA, IgG e IgM) encontram-se elevadas. A elevação sérica de IgG é a alteração mais comum das imunoglobulinas, especialmente nas cirroses que se desenvolveram a partir da hepatite e nas cirroses criptogênicas. Níveis elevados de IgM são detectados na cirrose biliar primária e, em menor extensão, na hepatite e cirrose viral, enquanto que aumento nas concentrações de IgA é observado na cirrose alcoólica. O fragmento 3 do sistema complemento (C3) encontra-se diminuído na cirrose, normal na hepatite crônica e aumentado na cirrose biliar primária compensada. Os baixos valores dos níveis deste componente na cirrose alcoólica, com ou sem hepatite, refletem síntese hepática reduzida. Redução transitória é encontrada no grau inicial da hepatite B aguda (Sherlock & Dooley, 1997). Recentemente, elevados níveis séricos de citocinas e alteração na função dos neutrófilos polimorfonucleares têm sido descritos em pacientes com cirrose (Shimizu et al., 1999).

Vários estudos relacionados com a doença hepática têm sido realizados tanto em humanos quanto em modelos experimentais (Bosma et al., 1988).

Um modelo experimental seguro para obter cirrose, foi descrito por Proctor & Chatamra (1982). Neste modelo, a administração concomitante do fenobarbital e CCL<sub>4</sub> (via intragástrica) em ratos, melhorou a eficiência da indução da lesão hepática, observando-se alta freqüência de cirrose e baixo índice de mortalidade. A eficácia deste modelo foi baseada na observação de que a estimulação do fenobarbital dependente da hidroxilação microssomal do sistema enzimático, citocromo P-450, no fígado, realça a hepatotoxicidade do CCL<sub>4</sub> (McLean et al., 1969).

Muitos autores concordam que a administração de CCL<sub>4</sub> em diferentes doses, e por diferentes vias, causam cirrose hepática (Torres et al., 1988). Do ponto de vista clínico, a administração oral não é uma forma usual de exposição humana ao CCL<sub>4</sub>, exceto nos casos de suicídio. A via inalatória é o modelo que melhor ilustra a exposição

humana aos compostos halogênicos, como o tricloroetileno (Ugazio et al., 1995). Entretanto, em modelos utilizando animais, muitos pesquisadores têm obtido sucesso na produção de cirrose hepática através da administração oral de CCL<sub>4</sub> (Nielsen et al., 1991; Lesage et al., 1999). Outras vias de administração são a intragástrica (Rozga et al., 1991), a via intraperitoneal (Miao et al., 1990; Jiang et al., 1992; Louis et al., 1998; Horn et al., 2000), a via intramuscular (Ozeki et al., 1985), a via subcutânea (Bosma et al., 1988) e a via inalatória (Mackinnon et al., 1995; Ugazio et al., 1995).

O CCL<sub>4</sub> é um potente agente tóxico, capaz de produzir vários tipos de lesões hepáticas e tem sido utilizado em centenas de experimentos para explorar os diversos aspectos da doença, usando diferentes espécies animais como ratos, camundongos, coelhos, babuímos (Torres et al., 1988; Ugazio et al., 1995).

No início do século passado era utilizado como anti-helmíntico (Zimmerman & Lewis, 1995). Sua utilização também é feita em muitos compostos de limpeza, extintores de incêndio e como solvente, todavia o CCL<sub>4</sub> vem sendo substituído por outras substâncias devido a sua toxicidade (Zimmerman, 1993).

A toxicidade do CCL<sub>4</sub> requer a sua ativação enzimática, realizada pelas enzimas do citocromo P-450, resultando no metabólito triclorometil radical (CCL<sub>3</sub>) (McLean et al., 1969; Tsukamoto et al., 1990; Wang et al., 1997b).

O radical livre (CCL<sub>3</sub>) pode, então, ligar-se covalentemente a diferentes estruturas moleculares, principalmente aos lipídeos das membranas do retículo endoplasmático. Por sua vez, os radicais livres atacam os ácidos graxos no processo de peroxidação (Torres et al., 1988; Moddy et al., 1990).

Nos hepatócitos lesionados a síntese proteica é deficiente, refletindo em uma diminuída síntese das lipoproteínas hepáticas. Este processo leva a um acúmulo de lipídeos neutros no fígado, com consequente infiltração lipídica (Torres et al., 1988).

Algumas substâncias como o fenobarbital, acetona e etanol, potencializam o efeito hepatotóxico do CCL<sub>4</sub> (McLean et al., 1969; Tsukamoto et al., 1990; Rozga et al., 1991; Snyder, 2000).

Diferenças entre machos e fêmeas à sensibilidade hepática ao CCL<sub>4</sub> são conhecidas e atribuídas aos diferentes efeitos dos hormônios sexuais ao sistema

microssomal (Smejkalova et al., 1985). Diabetes experimentais e hipertireoidismo aumentam a vulnerabilidade ao CCl<sub>4</sub>, enquanto que o hipotireoidismo diminui (Zimmerman, 1993).

As principais manifestações clínicas da intoxicação por CCl<sub>4</sub> em humanos, resultam da combinação dos efeitos tóxicos sistêmicos (incluindo neurológico e gastrointestinal), injúria hepática e renal. Os efeitos tóxicos gerais são mais aparentes após horas de exposição. Eles incluem, dor de cabeça, vertigem e confusão. Náusea, vômito, diarréia e dor abdominal ocorrem nas primeiras horas. Ícterica e hepatomegalia, assim como azotemia, geralmente acompanhada de hipertensão são freqüentes.

Como características laboratoriais após a exposição ao CCl<sub>4</sub>, podemos incluir neutrofilia, anemia hemolítica e azotemia (Zimmerman, 1993). Valores séricos das enzimas aminotransferases (ALT e AST) podem alcançar valores muito elevados (Akahori et al., 1983; Zimmerman, 1993; Wang et al., 1997a).

A toxicidade aguda provocada pelo CCl<sub>4</sub> pode desaparecer 7 dias após a administração da última dose (Nielsen et al., 1991).

Diante do exposto e considerando que o estudo da doença hepática crônica é de grande interesse, pois é responsável por altos índices de morbidade e mortalidade em muitos países (Mincis, 1979), que a cirrose hepática é responsável por 26.000 mortes entre americanos adultos anualmente (Maher, 1998) e considerando ainda que os neutrófilos contribuem para o progresso das doenças hepáticas, sendo que a ativação e o recrutamento destas células inflamatórias para o fígado é uma etapa crítica na patogênese da doença hepática (Jaeschke, 1997) e que eles estão presentes no fígado em várias condições patológicas, neste trabalho avaliamos a quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos, o número total e os diferentes tipos de leucócitos do sangue periférico dos coelhos hepatopatas.

## **2 – OBJETIVOS**

---

Estudar em coelhos com hepatopatia induzida por CCL<sub>4</sub> alguns parâmetros da resposta inflamatória e relacioná-los com o grau da lesão hepática. Foram verificados os parâmetros:

- 1) quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos do sangue periférico, induzida por fMLP;
- 2) número total e diferencial dos leucócitos do sangue periférico.

### **3 - MATERIAIS E MÉTODOS**

---

#### **3.1 – PROCEDÊNCIA DAS DROGAS**

Bicarbonato de sódio, Dextran, HEPES, N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), Histopaque 1.077 e meio mínimo essencial de Eagle (MEM), foram obtidos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA). Tetracloreto de carbono (CCL<sub>4</sub>) e May-Grünwald-Giemsa da Merck S. A. Indústrias Químicas (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Cloreto de sódio e formaldeído da Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (São Paulo, SP, Brasil). Cloridrato de lidocaína (Xylocaína® solução injetável 2%) da Astra Quím. Farm. Ltda (São Paulo, SP, Brasil). Diff-Quick (Diff-Quick® Stain Set) da Baxter Healthcare Corporation (Miami, FL, EUA). Fenobarbital (Gardenal® comprimidos de 100 mg) da Rhodia (São Paulo, SP, Brasil). Panótico da New Prov (Pinhais, PR, Brasil). Tiopental sódico (Thionembutal®) da Abbott Laboratórios do Brasil Ltda (São Paulo, SP, Brasil).

#### **3.2 - ANIMAIS**

Foram utilizados 45 coelhos New Zealand, machos, pesando  $2,9 \pm 0,03$  Kg, com idade de 100 dias, sendo 16 controles, 27 tratados com CCL<sub>4</sub> e fenobarbital e 2 animais que não completaram o período de estudo. A causa da morte é desconhecida. Os animais foram mantidos no Biotério da Universidade São Francisco (USF) em

gaiolas individuais, com fotoperíodo de doze a quatorze horas e recebendo *ad libitum* água e ração da marca Purina, linha natural para coelhos.

Os animais foram divididos em dois grupos:

- 1- Coelhos sacrificados na 16<sup>a</sup> semana de tratamento (n=8)
- 2- Coelhos sacrificados na 2<sup>a</sup> (n=4), 4<sup>a</sup> (n=4), 6<sup>a</sup> (n=5) e na 8<sup>a</sup> semana de tratamento com o CCL<sub>4</sub> (n=6).

### **3.3- TRATAMENTO COM O TETRACLORETO DE CARBONO (CCL<sub>4</sub>)**

O modelo experimental de hepatopatia em coelhos induzido pela administração concomitante de fenobarbital e CCL<sub>4</sub>, foi realizado conforme descrito previamente por Brandão et al. (2000).

Após o período de adaptação de sete dias, os animais receberam 50 mg de fenobarbital por dia, via oral. Quatorze dias após o início do tratamento com o fenobarbital, o CCl<sub>4</sub> (solução diluída em óleo de milho a 10%) foi administrado semanalmente, via intraesofágica, com dose inicial de 20 µg. As doses subsequentes de CCL<sub>4</sub> foram ajustadas de acordo com os resultados das dosagens enzimáticas de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), visando-se manter seus níveis séricos entre 400 e 800 IU/l. O valor basal da ALT foi de 69,8 ± 7,8 e o da enzima AST 32,6 ± 3,8.

Os animais tratados com CCL<sub>4</sub> e não tratados (controles) foram avaliados com relação aos seguintes parâmetros:

- nível sérico das enzimas ALT e AST;
- contagem total e diferencial dos leucócitos do sangue periférico;
- quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos isolados do sangue periférico;
- análise histológica do fígado dos animais.

### **3.3.1 - Dosagens séricas das enzimas ALT e AST**

Amostras de sangue dos animais foram coletadas da artéria central da orelha, em tubo seco, antes do início e vinte e quatro horas após cada administração de CCL<sub>4</sub>. As dosagens de ALT e AST foram realizadas no analisador automático, marca Cobas, modelo Mira plus da Roche (Suiça).

### **3.4 – CONTAGEM DOS LEUCÓCITOS**

Para se verificar o número total e diferencial dos leucócitos do sangue periférico nos diferentes graus de desenvolvimento da lesão hepática nos coelhos, o sangue foi coletado da artéria central da orelha, em tubo contendo anticoagulante EDTA (ácido Etilenodiamunotetraacético) nos seguintes períodos:

- antes do início de qualquer tratamento (dia 0);
- a cada duas semanas após o início do tratamento com o CCL<sub>4</sub>, uma semana após a administração do CCL<sub>4</sub> (durante 16 semanas), na primeira etapa do projeto e vinte e quatro horas após a administração da droga (durante 2, 4, 6 e 8 semanas).

As contagens dos leucócitos totais foram realizadas no contador automático de células Cell-Dyn® 3000, da Abbott (EUA), enquanto as contagens diferenciais dos leucócitos foram determinadas em esfregaços de sangue corados com Panótico.

### **3.5 – QUIMIOTAXIA *IN VITRO* DE NEUTRÓFILOS**

#### **3.5.1 – Obtenção de neutrófilos**

Para a obtenção de neutrófilos do sangue periférico dos animais nos diferentes graus de desenvolvimento da lesão hepática, o sangue foi coletado da artéria central da orelha, em tubo contendo anticoagulante EDTA nos seguintes períodos:

- antes do início de qualquer tratamento (dia 0);
- a cada duas semanas após o início do tratamento com o CCL<sub>4</sub>, uma semana após a administração do CCL<sub>4</sub> (durante 16 semanas), na primeira etapa do projeto e vinte e quatro horas após a administração da droga (durante 2, 4, 6 e 8 semanas).

Após a coleta o sangue foi centrifugado a 110 g, por 10 minutos, a 20°C. O sobrenadante foi descartado, as células precipitadas foram ressuspensas em dextran 3% (volume/volume) e incubadas por 40 minutos a 25°C. A fase superior foi, então, coletada e centrifugada a 200 g por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, fez-se o choque hipotônico para a lise das hemáceas residuais.

As células resultantes foram ressuspensas em 3 ml de meio mínimo essencial de Eagle (MEM; pH 7.2) e pipetadas cuidadosamente sobre o gradiente de densidade histopaque 1.077, seguindo-se centrifugação a 176 g por 27 minutos. As células foram lavadas duas vezes com MEM e ressuspensas para a concentração final de  $3 \times 10^6$  células/ml.

A contagem total de células foi feita na câmara de Neubauer e a análise diferencial em microscópio óptico em esfregaço preparado na citocentrífuga da Bioresearch (São Paulo, SP, Brasil) e corado com May-Grünwald-Giemsa.

### **3.5.2 - Ensaio de quimiotaxia *in vitro***

Os ensaios de quimiotaxia *in vitro* foram realizados usando-se câmara de microquimiotaxia com 48 poços (Richards e McCullough, 1984). Aliquotas de 50 µl da suspensão de neutrófilos ( $3 \times 10^6$  células/ml) foram colocadas no compartimento superior da câmara e 27 µl do agente quimiotáxico colocados no compartimento inferior. Os dois compartimentos foram separados com filtro de policarbonato com poro de 3 µm (Nucleopore, Pleasanton, CA). A migração espontânea foi verificada substituindo-se o agente quimiotáxico pelo MEM. Após incubação por 1h em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, os filtros foram fixados, corados com Diff-Quick® e montados sobre lâmina de vidro. A migração dos neutrófilos foi determinada pelo número de células que migraram completamente através do filtro em 5 campos aleatórios, usando-se microscópio óptico com objetiva de imersão. Em cada experimento, os ensaios foram feitos em triplicata.

Como agente quimiotáxico utilizamos o fMLP na concentração de  $5 \times 10^{-8}$  M. Os resultados representam a migração ao fMLP subtraído da migração espontânea.

## **3.6 - FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO DO FÍGADO PARA MICROSCOPIA DE LUZ**

Ao final do tratamento concomitante do fenobarbital e CCl<sub>4</sub>, os animais foram sacrificados com uma overdose de tiopental. O fígado foi, então, retirado inteiro e fixado com formol 10% tamponado, por 10 minutos. Após este período foi cortada uma fatia de 10 mm na porção central de cada lobo (no sentido vertical em direção ao hilo). Estas porções foram colocadas novamente no formol 10% tamponado.

Após fixação as amostras foram incluídas em parafina passando pelos seguintes procedimentos: 1) desidratação da amostra; 2) clarificação da amostra e 3) impregnação da amostra.

Foram realizados cortes histológicos de 5 micrômetros corados pela hematoxilina-eosina e pelo tricrômico de Masson, para estabelecer o grau de fibrose, e a seguir foram examinados por microscopia óptica. As análises histológicas das lâminas foram feitas de acordo com Batts & Ludwing (1995), com modificações. As diferentes alterações hepáticas foram graduadas de 0 a (+++), sendo que 0=ausente, (+)=leve, (++)=moderado, (+++)=abundante.

### **3.7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados estão expressos como as médias  $\pm$  EPM. Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas utilizando-se o teste não pareado e não paramétrico de Mann-Whitney. Valores de  $p<0,05$  foram considerados significantes.

## **4 - RESULTADOS**

---

### **4.1 – EFEITO DO TRATAMENTO COM O FENOBARBITAL SOBRE O NÍVEL SÉRICO DAS ENZIMAS, O NÚMERO TOTAL E DIFERENCIAL DOS LEUCÓCITOS E SOBRE A RESPOSTA QUIMIOTÁTICA DOS NEUTRÓFILOS, OBTIDOS DO SANGUE PERIFÉRICO**

Os coelhos foram tratados com o fenobarbital durante 2 semanas, antes do início e durante o tratamento com o tetracloreto de carbono ( $CCL_4$ ).

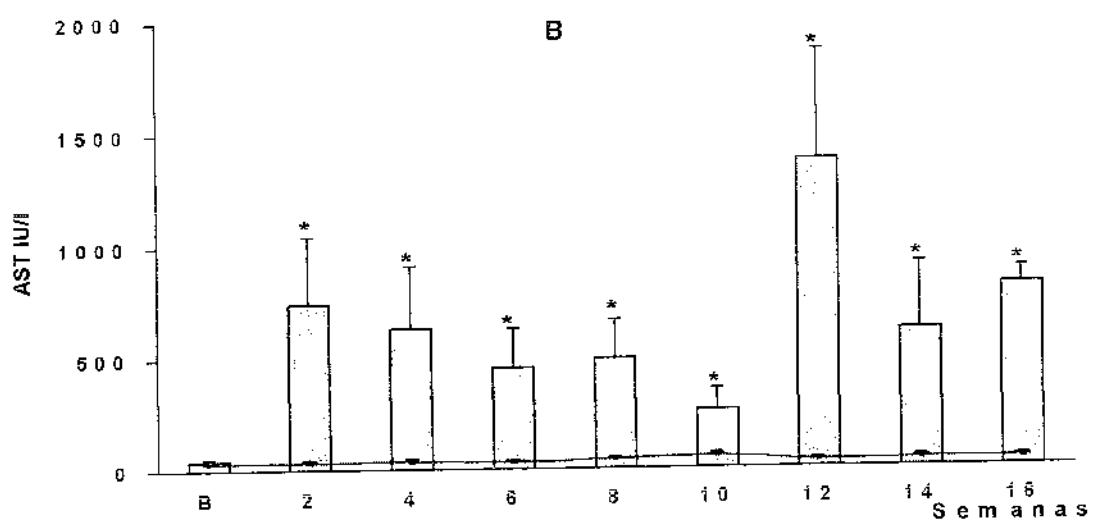
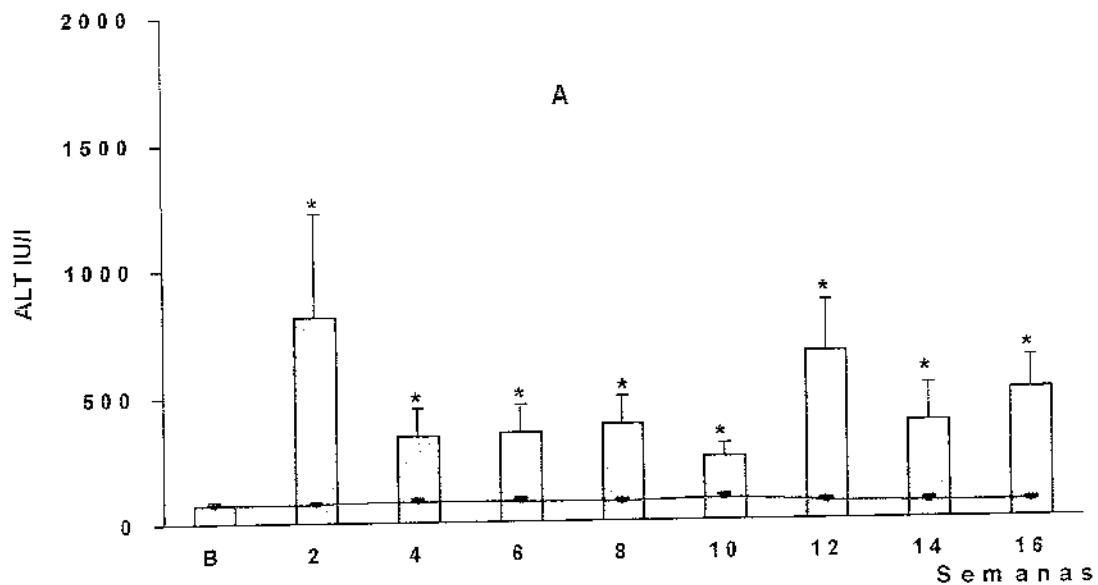
Os resultados referentes ao efeito do tratamento com o fenobarbital durante 2 semanas, demonstraram que não houve alterações significativas nos parâmetros que foram averiguados neste trabalho, quando comparados com os resultados basais, obtidos antes do tratamento com o fenobarbital (TABELA 1).

**TABELA 1 – Efeito da administração do fenobarbital sobre a quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos, o número de leucócitos totais (LT), neutrófilos (NE) e mononucleares (MN), e sobre os níveis séricos das enzimas ALT e AST, obtidos do sangue periférico dos coelhos.** Fenobarbital expressa os resultados dos animais tratados com fenobarbital por 2 semanas e basal representa os resultados basais destes animais. Os resultados expressam a média ± EPM dos coelhos (n=14).

	<b>Basal</b>	<b>Fenobarbital</b>
<b>Quimiotaxia (Células/campo)</b>	$8,4 \pm 1,0$	$7,2 \pm 0,9$
<b>LT (<math>\times 10^3</math> cel/<math>\mu</math>l)</b>	$5,5 \pm 0,4$	$4,7 \pm 0,4$
<b>NE (<math>\times 10^3</math> cel/<math>\mu</math>l)</b>	$2,2 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,3$
<b>MN (<math>\times 10^3</math> cel/<math>\mu</math>l)</b>	$3,3 \pm 0,4$	$2,4 \pm 0,2$
<b>ALT (IU/l)</b>	$64,3 \pm 9,2$	$81,3 \pm 10,9$
<b>AST (IU/l)</b>	$41,7 \pm 8,9$	$40,0 \pm 4,9$

#### **4.2 - EFEITO DO TRATAMENTO COM O CCL<sub>4</sub> SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DAS ENZIMAS ALT E AST**

A determinação dos níveis séricos das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), dos coelhos sacrificados uma semana após a última administração de CCL<sub>4</sub>, foi realizada a partir do sangue periférico 24 horas após cada administração da droga, durante 16 semanas. Os resultados da verificação dos níveis séricos das enzimas, demonstraram que o tratamento com o CCL<sub>4</sub>, aumentou significativamente ( $p<0,05$ ) os níveis séricos de ALT (FIGURA 1A) e AST (FIGURA 1B), em todas as semanas de administração, quando comparados com a dosagem basal das enzimas obtidas antes de qualquer tratamento (B) e com os respectivos controles (não tratados). Nos coelhos controles, não foram observadas diferenças significativas das dosagens séricas destas enzimas, ao longo de 16 semanas (FIGURAS 1A e 1B).



**FIGURA 1 – Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre os níveis séricos das enzimas ALT (A) e AST (B).** Nos animais tratados com o CCL<sub>4</sub>, as coletas de sangue foram realizadas 24 horas após cada administração de CCL<sub>4</sub>, ao longo de 16 semanas. As barras expressam a média  $\pm$  EPM das enzimas obtidas do sangue dos coelhos tratados com a droga ( $n=8$ ). Os controles estão representados pela linha ( $n=16$ ). \* $p<0,05$  em relação ao nível basal das enzimas (B) e aos respectivos controles.

#### **4.3 – EFEITO DO TRATAMENTO COM O CCL<sub>4</sub> POR 16 SEMANAS SOBRE O NÚMERO TOTAL E DIFERENCIAL DOS LEUCÓCITOS E SOBRE A RESPOSTA QUIMIOTÁTICA DOS NEUTRÓFILOS OBTIDOS DO SANGUE PERIFÉRICO DOS ANIMAIS, UMA SEMANA APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO CCL<sub>4</sub>**

##### **4.3.1 - Análise total e diferencial dos leucócitos**

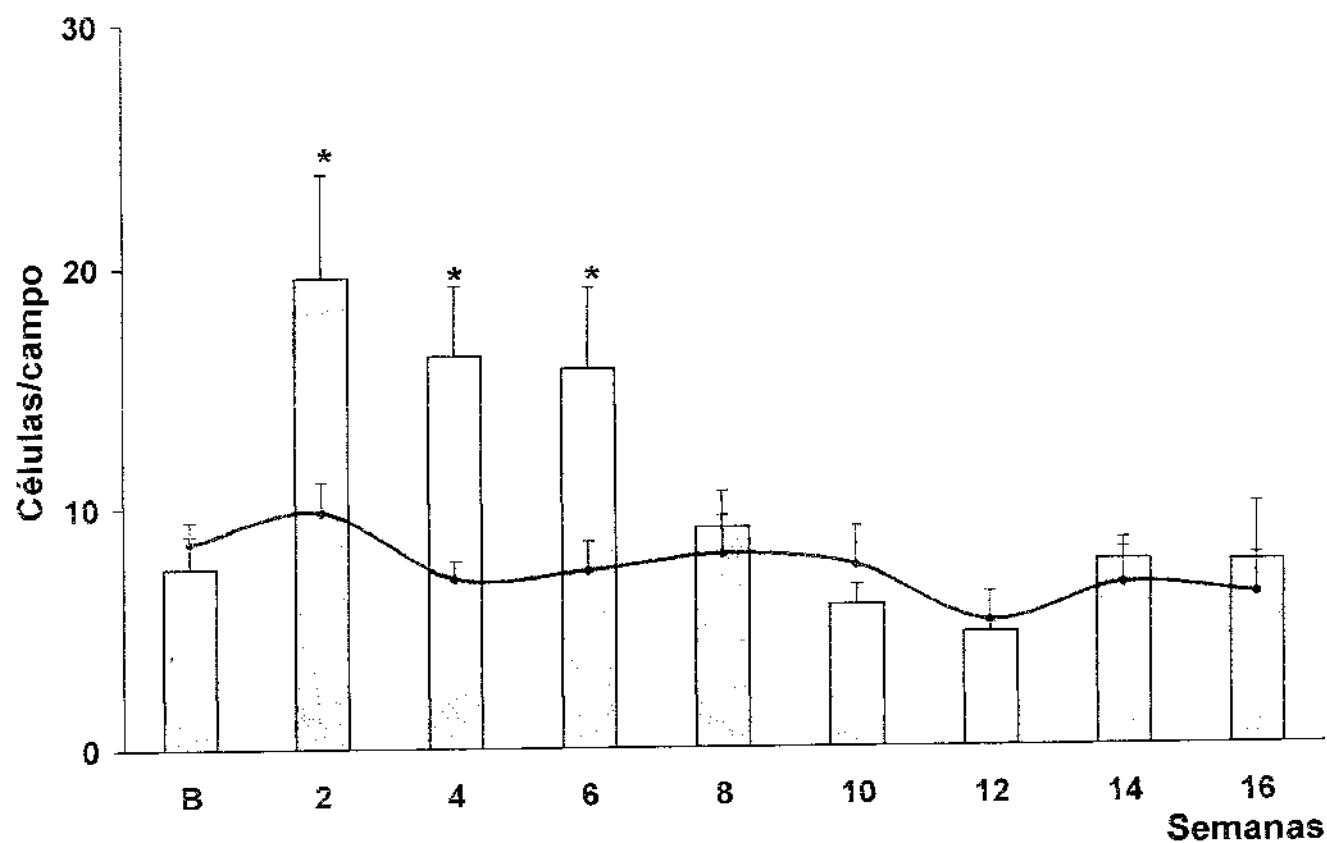
Com relação aos resultados da contagem total e diferencial dos leucócitos obtidos uma semana após a administração do CCL<sub>4</sub>, observou-se alteração significativa na 10<sup>a</sup> semana de tratamento com a droga, tanto na contagem dos leucócitos totais, quanto na contagem dos neutrófilos, que apresentaram aumentos significativos ( $p<0,05$ ), quando comparados com seus respectivos controles. Entre os grupos tratados e não tratados (controles), não foram observadas diferenças significativas na contagem dos mononucleares, ao longo de dezesseis semanas (TABELA 2). A contagem dos leucócitos totais e dos neutrófilos dos animais controles, não mostraram modificações significativas no período de dezesseis semanas (TABELA 2).

**TABELA 2 – Efeito da administração do CCL<sub>4</sub> sobre o número de leucócitos totais (LT), neutrófilos (NE) e mononucleares (MN) obtidos do sangue periférico dos animais tratados e controles.** Os números de LT, NE e MN foram avaliados 1 semana após a administração da droga. Os resultados representam a média ± EPM dos animais controles (n=16) e dos animais sacrificados após 16 semanas de tratamento com o CCL<sub>4</sub> (n=8). \*p<0,05 em relação aos respectivos grupos controles.

Semanas de tratamento	LT (x10 <sup>3</sup> cel/μl)		NE (x10 <sup>3</sup> cel/μl)		MN (x10 <sup>3</sup> cel/μl)	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
<b>B</b>	5,0±0,3	5,1±0,4	2,0±0,2	2,3±0,4	2,9±0,3	2,8±0,1
<b>2</b>	5,5±0,2	5,1±0,4	2,0±0,2	2,2±0,4	3,4±0,2	2,9±0,2
<b>4</b>	5,6±0,7	6,5±0,9	2,1±0,3	2,5±0,4	3,4±0,5	3,9±0,6
<b>6</b>	5,6±0,4	7,0±0,7	2,2±0,2	2,5±0,4	3,3±0,3	4,4±0,6
<b>8</b>	5,0±0,4	6,3±1,1	2,4±0,4	2,6±0,7	2,6±0,1	3,7±0,4
<b>10</b>	4,7±0,4	7,4±1,3*	1,7±0,1	3,3±0,8*	2,9±0,3	4,1±0,6
<b>12</b>	5,2±0,5	5,8±1,0	2,3±0,3	2,5±0,5	3,3±0,4	3,2±0,6
<b>14</b>	4,8±0,4	5,1±0,6	2,0±0,3	2,3±0,5	2,8±0,3	2,8±0,1
<b>16</b>	5,2±0,4	6,6±0,7	2,7±0,4	3,4±0,7	2,5±0,1	3,1±0,3

#### **4.3.2 - Quimiotaxia *in vitro* dos neutrófilos**

Aumentos significativos ( $p<0,05$ ) na resposta quimiotática *in vitro* dos neutrófilos ao fMLP ( $5 \times 10^{-8}$  M), 1 semana após a administração do CCL<sub>4</sub>, foram verificados entre a segunda e a sexta semana de tratamento, quando comparados com os respectivos controles e com a resposta quimiotática basal (B) (FIGURA 2). As quimiotaxias dos coelhos controles não apresentaram diferenças significativas (FIGURA 2).



**FIGURA 2 – Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre a migração *in vitro* de neutrófilos ao fMLP durante 16 semanas.** A quimiotaxia *in vitro* dos neutrófilos obtidos dos coelhos tratados, foi realizada uma semana após a administração do CCL<sub>4</sub>. Os resultados da quimiotaxia de neutrófilos dos coelhos tratados com a droga estão representados pelas barras ( $n=8$ ) e os resultados dos coelhos controles, estão representados pela linha ( $n=16$ ). As barras expressam a média  $\pm$  EPM dos animais.  
\* $p<0,05$  em relação à resposta quimiotática basal (B) e aos respectivos controles.

#### **4.3.3 - Análise histológica dos fígados dos coelhos tratados com o CCL<sub>4</sub>**

Nos dados ilustrados na TABELA 3, podemos observar os resultados das análises histológicas dos fígados dos coelhos, submetidos ao tratamento com o CCl<sub>4</sub> durante 16 semanas. Os animais foram sacrificados e os fígados retirados, uma semana após a última administração da droga. De oito animais, sete desenvolveram cirrose hepática (87,5%), com a presença de fibrose leve e definida, necrose, micro e macro esteatose, septos delgados e espessos que variaram de leve a abundante. Somente um animal desenvolveu hepatite moderada, distinguindo-se dos outros animais pela ausência de fibrose definida e septos espessos. Quanto ao infiltrado inflamatório, o fígado de todos os coelhos apresentaram neutrófilos e linfócitos, que variaram de leve a moderado. Não foram observados histiocitos e eosinófilos, e a presença dos plasmócitos variou de ausente a moderada.

**TABELA 3 – Efeito do CCL<sub>4</sub> sobre o fígado dos coelhos sacrificados 1 semana após a última administração da droga.** Os resultados representam a análise histológica dos fígados dos animais sacrificados após 16 semanas de tratamento com o CCL<sub>4</sub> (n=8). As diferentes lesões hepáticas foram graduadas de 0 a (+++) sendo que, 0=ausente, (+)=leve, (++)=moderado e (+++)=abundante.

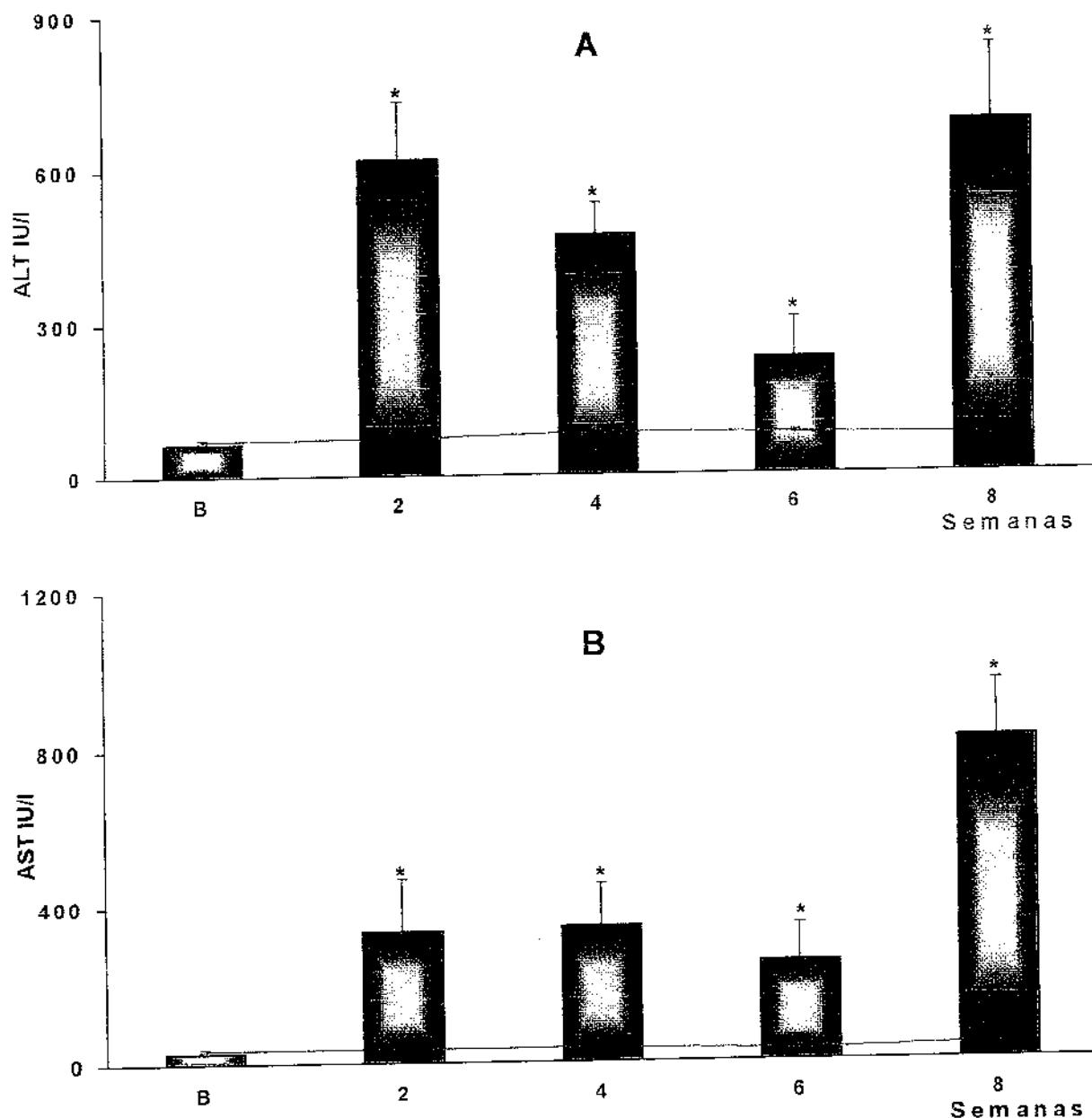
Esteatose	Necrose	Inflamação	Fibrose	Diagnóstico
Micro (+) Macro (++)	(++)	Neutrófilos (++) Linfócitos (+) Plasmócitos (+)	Leve (++) Definida (+++) Septos delgados (+) Septos espessos (+++)	Cirrose hepática
Micro (+) Macro (+++)	(+++)	Neutrófilos (++) Linfócitos (++) Plasmócitos (++)	Leve (+++) Definida (+++) Septos delgados (+) Septos espessos (++)	Cirrose hepática
Micro (+) Macro (+)	(+)	Neutrófilos (+) Linfócitos (++)	Leve (+) Definida (+) Septos delgados (+) Septos espessos (+)	Cirrose hepática
Micro (+) Macro (++)	(+)	Neutrófilos (+) Linfócitos (+) Plasmócitos (+)	Leve (+) Definida (+) Septos delgados (+) Septos espessos (+)	Cirrose hepática
Micro (+) Macro (++)	(++)	Neutrófilos (+) Linfócitos (+) Plasmócitos (+)	Leve (++) Definida (+) Septos delgados (+) Septos espessos (+)	Cirrose hepática
Micro (+) Macro (+++)	(++)	Neutrófilos (+) Linfócitos (+)	Leve (+) Definida (++) Septos delgados (+) Septos espessos (+)	Cirrose hepática
Micro (+) Macro (++)	(++)	Neutrófilos (+) Linfócitos (++) Plasmócitos (+)	Leve (+) Septos delgados (+)	Hepatite moderada
Micro (+) Macro (+++)	(+++)	Neutrófilos (++) Linfócitos (++) Plasmócitos (+)	Leve (+++) Definida (++) Septos delgados (+) Septos espessos (++)	Cirrose hepática

#### **4.4 – EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO CCL<sub>4</sub> NOS ANIMAIS SACRIFICADOS EM DIFERENTES PERÍODOS DE TRATAMENTO: 24 HORAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DA ÚLTIMA DOSE DA DROGA**

Na segunda etapa deste trabalho, os ensaios de quimiotaxia *in vitro* e a análise total e diferencial dos leucócitos, também foram realizados vinte e quatro horas após a administração do CCL<sub>4</sub>. Para o acompanhamento da formação da lesão hepática (até o desenvolvimento de cirrose) os coelhos foram sacrificados 48 horas após a última administração da droga, nos períodos de duas, quatro, seis e oito semanas de tratamento.

#### **4.5 - EFEITO DO TRATAMENTO COM O CCL<sub>4</sub> SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DAS ENZIMAS ALT E AST**

Nas figuras 3A e 3B estão representados os resultados das dosagens séricas das enzimas, obtidas do sangue dos coelhos sacrificados em diferentes períodos. Estas dosagens foram realizadas 24 horas após a administração da droga. Os resultados demonstraram que o tratamento com o CCL<sub>4</sub>, aumentou significativamente ( $p<0,05$ ) os níveis séricos de ALT (FIGURA 3A) e AST (FIGURA 3B), em todas as semanas de tratamento, quando comparados com a dosagem enzimática basal destes animais (B) e com os respectivos controles (não tratados). Nos coelhos controles não foram observadas diferenças significativas entre as dosagens destas enzimas ao longo do período de 8 semanas (FIGURAS 3A e 3B).



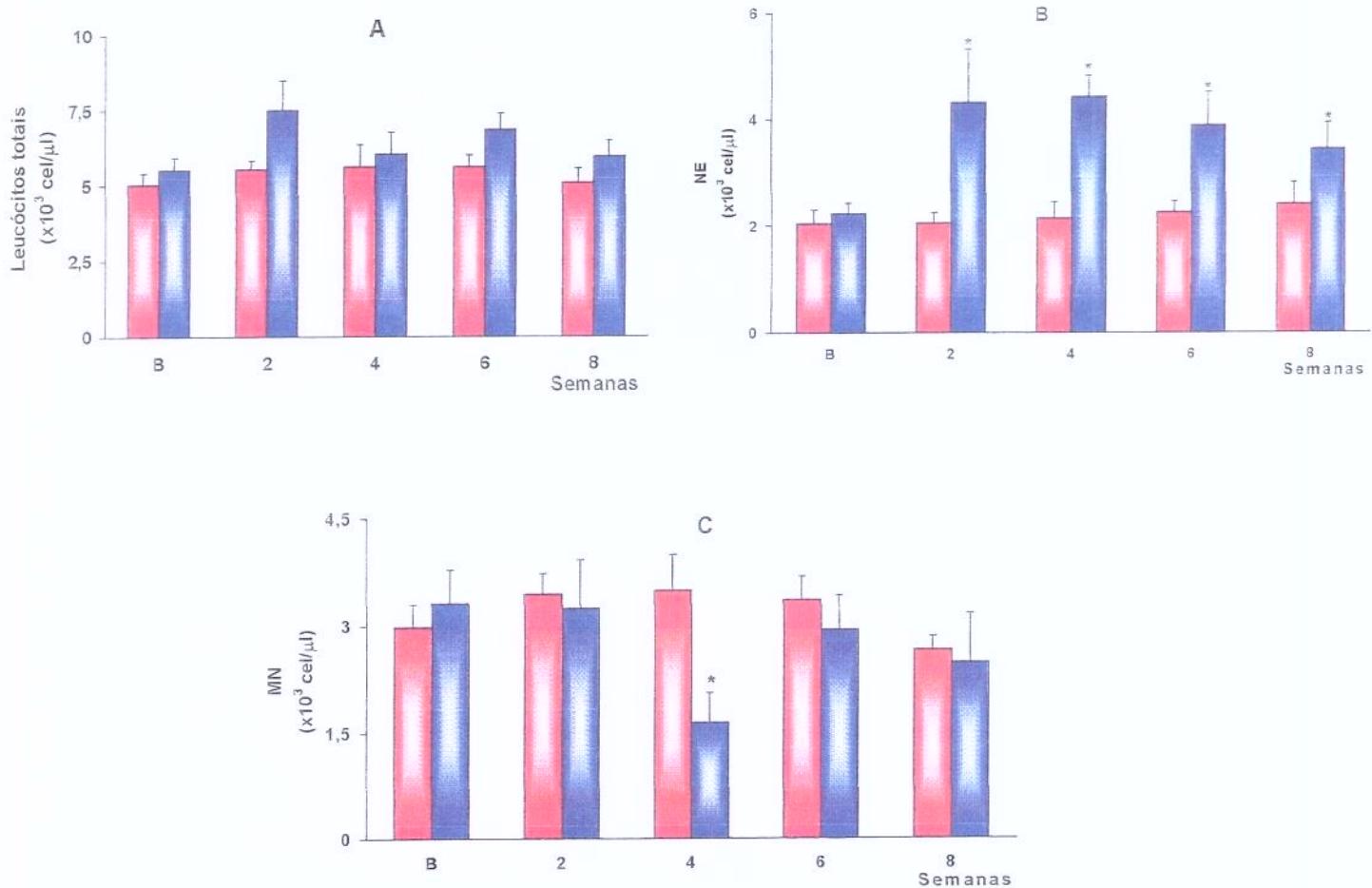
**FIGURA 3 – Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre os níveis séricos das enzimas ALT (A) e AST (B), obtidas do sangue dos coelhos sacrificados em diferentes períodos (2, 4, 6 e 8 semanas).** Nos animais tratados com CCL<sub>4</sub>, as coletas de sangue foram realizadas 24 horas após a administração da droga. As colunas representam a média ± EPM dos grupos sacrificados na 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semana após o início do tratamento com o CCL<sub>4</sub> ( $n= 4$  a 6 coelhos). A linha representa a média ± EPM dos controles ( $n=16$ ). B representa a média ± EPM dos resultados da dosagem basal de todos os animais tratados e não tratados com CCL<sub>4</sub>. \* $p<0.05$  em relação aos respectivos grupos controles e níveis basais.

## **4.6 – EFEITO DO TRATAMENTO COM O CCL<sub>4</sub> SOBRE O NÚMERO TOTAL E DIFERENCIAL DOS LEUCÓCITOS E SOBRE A RESPOSTA QUIMIOTÁTICA DOS NEUTRÓFILOS OBTIDOS DO SANGUE PERIFÉRICO DOS ANIMAIS, 24 HORAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO CCL<sub>4</sub>**

### **4.6.1 - Análise total e diferencial dos leucócitos**

A verificação da análise total e diferencial dos leucócitos do sangue periférico dos coelhos sacrificados em diferentes períodos foi realizada 24 horas após a administração do CCL<sub>4</sub>.

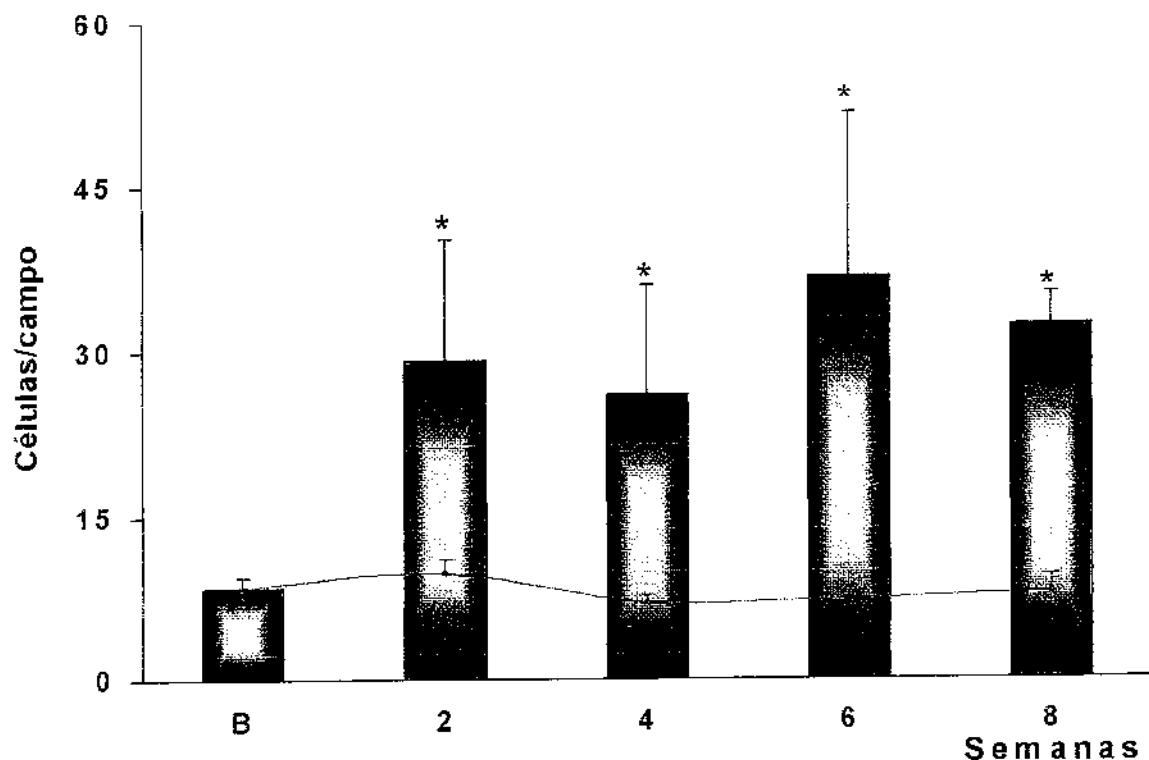
O tratamento com o CCL<sub>4</sub>, não afetou de maneira significativa o número de leucócitos totais (FIGURA 4A). A contagem dos neutrófilos apresentou aumentos significativos, entre a 2<sup>a</sup> e a 8<sup>a</sup> semana de tratamento com a droga ( $p<0,05$ ), quando comparados com seus respectivos controles e contagens basais (FIGURA 4B). O número de mononucleares mostrou diminuição significativa ( $p<0,05$ ) na 4<sup>a</sup> semana de tratamento com o CCL<sub>4</sub> quando comparado com seus respectivos controles (FIGURA 4C). A contagem dos leucócitos totais, neutrófilos e mononucleares do sangue periférico dos coelhos controles, não mostrou alteração significativa ao longo de 8 semanas (FIGURAS 4A, 4B e 4C).



**FIGURA 4 – Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre a contagem dos leucócitos totais, neutrófilos (NE) e mononucleares (MN), obtidos do sangue dos animais sacrificados em diferentes períodos (2, 4, 6 e 8 semanas).** Nos animais tratados com a droga, as coletas de sangue foram realizadas 24 horas após a administração do CCL<sub>4</sub>. As colunas azuis representam a média ± EPM dos grupos sacrificados na 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semana após o início do tratamento com o CCL<sub>4</sub> (n= 4 a 6 coelhos). As colunas vermelhas representam a média ± EPM dos controles (n=16). B representa a média ± EPM dos resultados da contagem basal de todos os animais tratados e não tratados com CCL<sub>4</sub>. \*p<0,05 em relação aos respectivos grupos controles e as contagens basais.

#### **4.6.2 - Quimiotaxia *in vitro* dos neutrófilos**

O efeito do CCL<sub>4</sub> sobre a quimiotaxia dos neutrófilos, foi verificado no sangue periférico obtido dos coelhos sacrificados em diferentes períodos. A administração do CCL<sub>4</sub> provocou elevação significativa da resposta quimiotática dos neutrófilos, observada entre a 2<sup>a</sup> e a 8<sup>a</sup> semana ( $p<0,05$ ), quando comparada com seus respectivos controles e com a resposta quimiotática basal (FIGURA 5). Os coelhos controles, não apresentaram alterações significativas ao longo do período de 8 semanas (FIGURA 5).



**FIGURA 5 – Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre a quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos, obtidos dos coelhos sacrificados em diferentes períodos (2, 4, 6 e 8 semanas).** Nos animais tratados com a droga, o sangue foi coletado 24 horas após a administração do CCL<sub>4</sub>. As colunas representam a média ± EPM dos grupos sacrificados na 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semana após o início do tratamento com o CCL<sub>4</sub> (n= 4 a 6 coelhos). A linha representa a média ± EPM dos resultados da resposta quimiotática basal dos animais tratados e não tratados com CCL<sub>4</sub>. \*p<0,05 em relação aos respectivos grupos controles e a resposta quimiotática basal.

#### **4.6.3 - Análise histológica dos fígados dos coelhos tratados durante diferentes períodos**

Nas tabelas de 4 a 7, observamos os resultados das análises histológicas dos fígados dos animais sacrificados em diferentes períodos de tratamento com o CCL<sub>4</sub>. O sacrifício destes coelhos para a retirada do fígado, foi realizado 48 horas após a última administração do CCL<sub>4</sub>.

A análise histológica dos fígados dos animais sacrificados após 2 semanas de tratamento com o CCL<sub>4</sub> (TABELA 4), mostrou que de quatro animais, um desenvolveu fibrose (leve e definida), necrose, macro esteatose e septos delgados de maneira leve. Podemos observar a ausência de septos espessos em todos os animais. Três animais desenvolveram micro esteatose que variou de leve a moderada. No infiltrado inflamatório não observamos plasmócitos. Ao contrário, os linfócitos foram verificados em todos os infiltrados inflamatórios, enquanto que a presença dos neutrófilos variou de ausente a moderada. Os histiócitos e eosinófilos foram observados em 1 infiltrado inflamatório de modo leve. Todos os coelhos desenvolveram hepatite que variou de leve (n=3) a moderada (n=1).

Na TABELA 5 verificamos os resultados das análises histológicas, dos coelhos submetidos a 4 semanas de tratamento com o CCL<sub>4</sub>. De quatro animais, três desenvolveram hepatite leve (75%) e um desenvolveu hepatite moderada (25%). Três coelhos desenvolveram fibrose leve, que variou de leve a moderada, dois coelhos desenvolveram necrose, que variou de leve a moderada, e não houve desenvolvimento de fibrose definida. Todos os animais apresentaram macro e micro esteatose. Em um coelho, houve a formação moderada de septos delgados e não houve formação de septos espessos. No infiltrado inflamatório, não foram observados plasmócitos. Os histiócitos foram observados no infiltrado inflamatório de três coelhos, os linfócitos em todos e os neutrófilos e eosinófilos em dois.

Nas análises histológicas dos fígados dos animais submetidos a 6 semanas de tratamento com o CCL<sub>4</sub> (TABELA 6), observamos que todos desenvolveram micro esteatose e macro esteatose, que variou de leve a abundante e fibrose leve, que variou

de leve a moderada. De cinco animais, quatro desenvolveram fibrose definida, que variou de leve a moderada. Dois animais desenvolveram necrose e um animal desenvolveu septos delgados e espessos. Quanto ao infiltrado inflamatório notamos a presença de neutrófilos e linfócitos na maioria dos infiltrados, ausência de plasmócitos, e os eosinófilos e histiócitos variaram de ausente a leve. O diagnóstico foi de cirrose para um coelho (20%), dois animais desenvolveram hepatite moderada (40%) e dois desenvolveram hepatite leve (40%).

As análises histológicas dos fígados dos coelhos sacrificados após 8 semanas de tratamento com o CCL<sub>4</sub> (TABELA 7), mostraram que todos os animais desenvolveram fibrose (leve e definida) e esteatose (micro e macro), apenas 1 animal não desenvolveu necrose e 2 animais não desenvolveram septos delgados e espessos, os outros animais desenvolveram necrose e septos (delgados e espessos) que variaram de leve a moderado. Foi verificada a presença de neutrófilos e linfócitos em todos os infiltrados, ausência de plasmócitos, presença dos histiócitos que variou de ausente a leve e a presença dos eosinófilos em um infiltrado. Dos seis animais, quatro desenvolveram cirrose hepática (66,6%) e dois animais desenvolveram hepatite moderada (33,4%).

Os resultados das análises histológicas dos coelhos controles, mostraram que todos os itens analisados foram considerados ausentes. Portanto, todos os coelhos controles apresentaram diagnóstico considerado normal.

**TABELA 4 – Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre o fígado, nos coelhos sacrificados após 2 semanas de administração da droga.** Os resultados representam a análise histológica dos fígados, retirados 48 horas após a administração da última dose de CCL<sub>4</sub>, dos animais tratados por 2 semanas (n=4). As diferentes lesões hepáticas foram graduadas de 0 a (+++) sendo que, 0=ausente, (+)=leve, (++)=moderado e (+++)=abundante.

Esteatose	Necrose	Inflamação	Fibrose	Diagnóstico
Macro (+)	(+)	Neutrófilos (++) Linfócitos (+)	Leve (+) Definida (+) Septos delgados (+)	Hepatite moderada
Micro ++)		Neutrófilos (+) Linfócitos (+)		Hepatite leve
Micro ++)		Linfócitos (+)		Hepatite leve
Micro (+)		Eosinófilos (+) Linfócitos (+) Histiocitos (+)		Hepatite leve

**TABELA 5 – Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre o fígado, nos coelhos sacrificados após 4 semanas de administração da droga.** Os resultados representam a análise histológica dos fígados, retirados 48 horas após a administração da última dose de CCL<sub>4</sub>, dos animais tratados por 4 semanas (n=4). As diferentes lesões hepáticas foram graduadas de 0 a (+++) sendo que, 0=ausente, (+)=leve, (++)=moderado e (+++)=abundante.

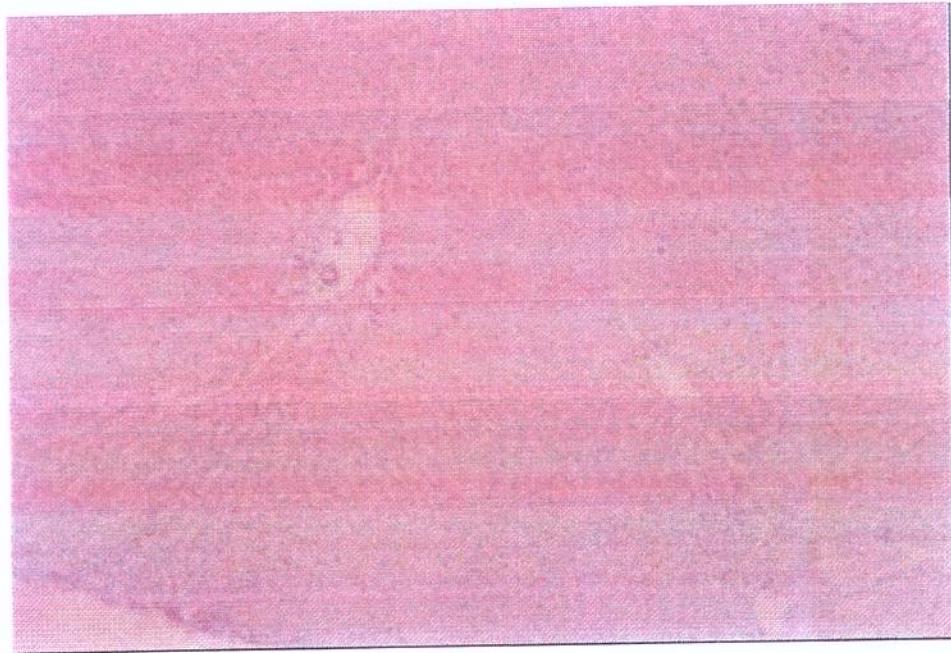
Esteatose	Necrose	Inflamação	Fibrose	Diagnóstico
Micro (+) Macro (+++)	(++)	Neutrófilos (++) Linfócitos (+)	Leve (++) Septos delgados (+++)	Hepatite moderada
Micro (+) Macro (+++)		Linfócitos (+) Histiócitos (+)		Hepatite leve
Micro (++) Macro (++)	(+)	Neutrófilos (++) Eosinófilos (+) Linfócitos (+) Histiócitos (+)	Leve (+)	Hepatite leve
Micro (+) Macro (++)		Eosinófilos (+) Linfócitos (+) Histiócitos (+)	Leve (+)	Hepatite leve

**TABELA 6 – Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre o fígado, nos coelhos sacrificados após 6 semanas de administração da droga.** Os resultados representam a análise histológica dos fígados, retirados 48 horas após a administração da última dose de CCL<sub>4</sub>, dos animais tratados por 6 semanas (n=5). As diferentes lesões hepáticas foram graduadas de 0 a (+++) sendo que, 0=ausente, (+)=leve, (++)=moderado e (+++)=abundante.

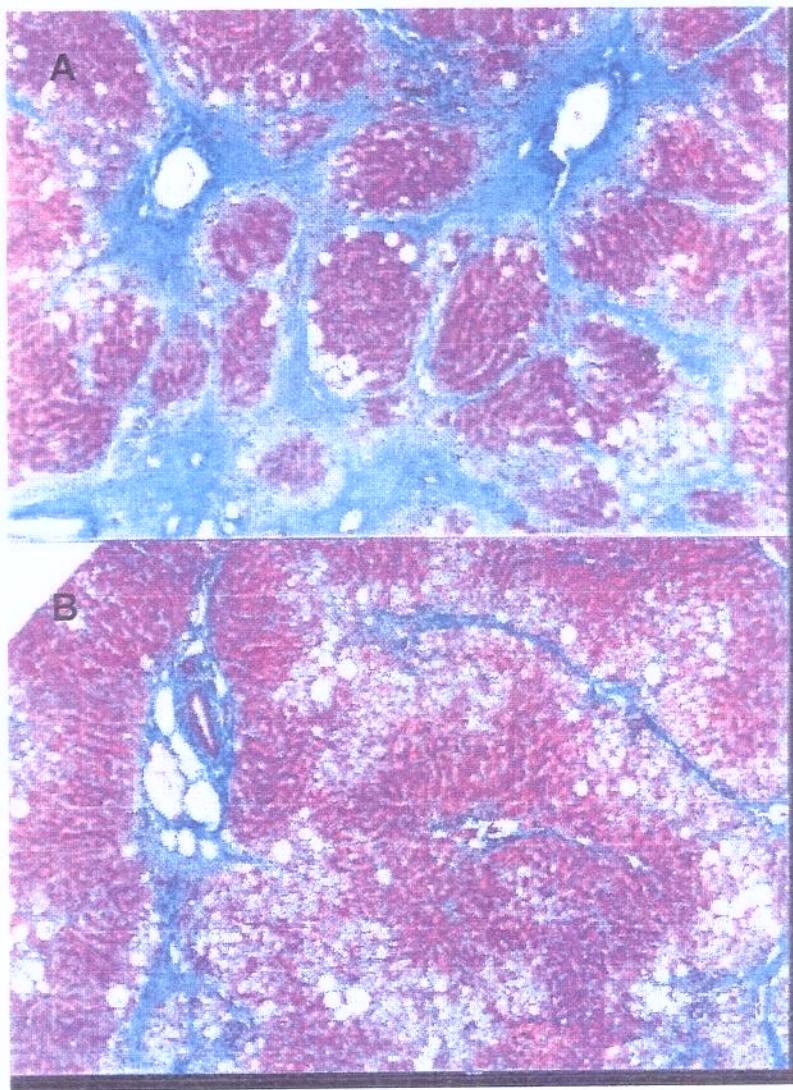
Esteatose	Necrose	Inflamação	Fibrose	Diagnóstico
Micro (+) Macro (+++)	(++)	Neutrófilos (++) Linfócitos (+)	Leve (++) Definida (+) Septos delgados (+) Septos espessos (++)	Cirrose hepática
Micro (+) Macro (+++)		Neutrófilos (+) Eosinófilos (+) Linfócitos (+) Histiocitos (+)	Leve (+) Definida (++)	Hepatite moderada
Micro (+) Macro (+++)	(+)	Linfócitos (+)	Leve (++) Definida (+)	Hepatite leve
Micro (+) Macro (+++)		Neutrófilos (+) Linfócitos (+)	Leve (++) Definida (++)	Hepatite moderada
Micro (+) Macro (++)		Neutrófilos (+) Linfócitos (++)	Leve (+)	Hepatite leve

**TABELA 7 – Efeito do tratamento com o CCL<sub>4</sub> sobre o fígado, nos coelhos sacrificados após 8 semanas de administração da droga.** Os resultados representam a análise histológica dos fígados, retirados 48 horas após a administração da última dose de CCL<sub>4</sub>, dos animais tratados por 8 semanas (n=6). As diferentes lesões hepáticas foram graduadas de 0 a (+++) sendo que, 0=ausente, (+)=leve, (++)=moderado e (+++)=abundante.

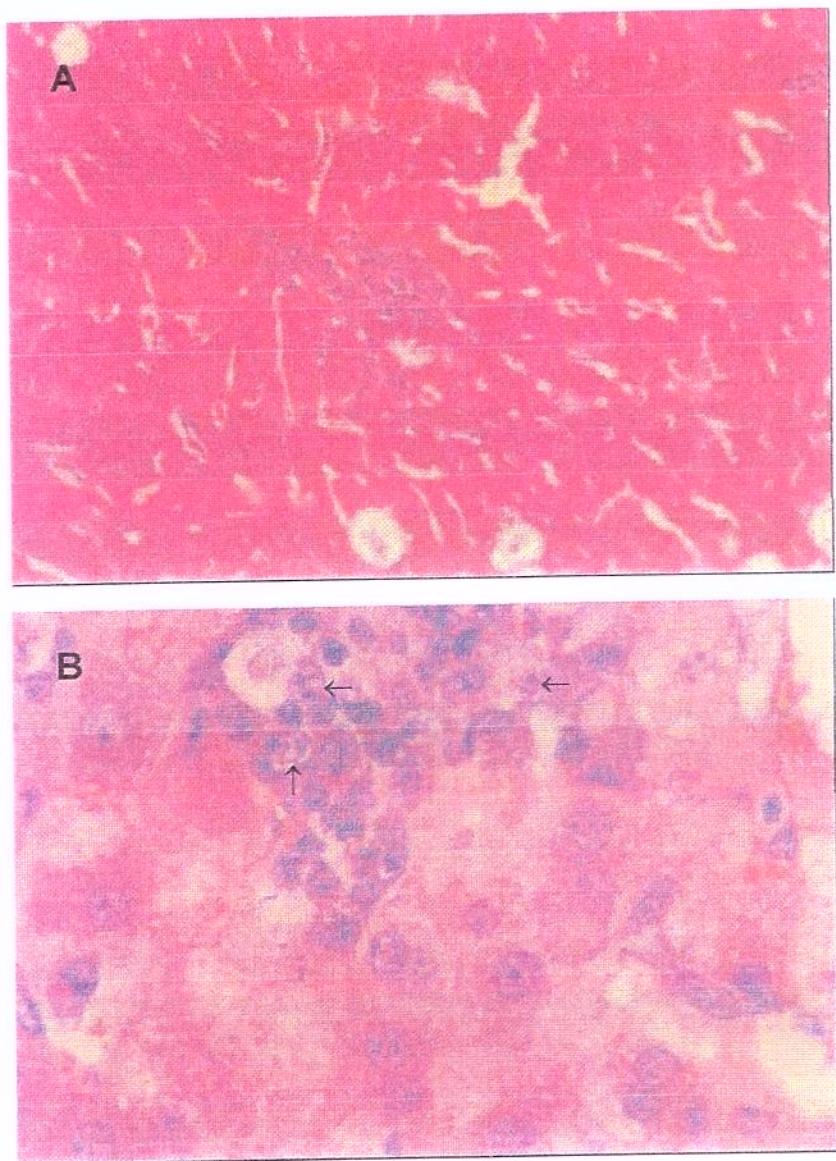
Esteatose	Necrose	Inflamação	Fibrose	Diagnóstico
Micro (+) Macro (++++)	(++)	Neutrófilos (++) Linfócitos (+)	Leve (++) Definida (+) Septos delgados (++) Septos espessos (+)	Cirrose hepática
Micro (+) Macro (++++)	(++)	Neutrófilos (++) Linfócitos (+)	Leve (++) Definida (+) Septos delgados (++) Septos espessos (+)	Cirrose hepática
Micro (+) Macro (++)	(++)	Neutrófilos (++) Linfócitos (+)	Leve (++) Definida (++) Septos delgados (++) Septos espessos (+)	Cirrose hepática
Micro (+) Macro (++)	(++)	Neutrófilos (++) Eosinófilos (+) Linfócitos (+)	Leve (++) Definida (+) Septos delgados (+) Septos espessos (++)	Cirrose hepática
Micro (+) Macro (++)	(+)	Neutrófilos (+) Linfócitos (++) Histiocitos (+)	Leve (++) Definida (+)	Hepatite moderada
Micro (+) Macro (++)		Neutrófilos (+) Linfócitos (+)	Leve (+) Definida (++)	Hepatite moderada



**FIGURA 6 – Corte histológico do fígado do coelho controle.** Coloração Hematoxilina-eosina (HE), 40X.



**FIGURA 7 – Cortes histológicos de fígados retirados dos animais tratados com CCL<sub>4</sub>. A - observamos quadro de cirrose já estabelecida. B - notamos quadro fibrótico de intensidade moderada. Tricrômico de Masson, 65X.**



**FIGURA 8 – Cortes histológicos de fígados retirados dos coelhos tratados com o CCL<sub>4</sub>. A – infiltrado inflamatório. Coloração HE, 100X. B – infiltrado inflamatório. Coloração HE, 400X. Notar a presença de neutrófilos (↑).**

## **5 – DISCUSSÃO**

---

Neste estudo, após duas semanas de tratamento apenas com o fenobarbital, iniciou-se o período de administração concomitante do CCL<sub>4</sub> e fenobarbital para o desenvolvimento de cirrose hepática, com posterior análise histológica, como o proposto previamente por Brandão et al. (2000). A administração concomitante do fenobarbital potencializou o efeito hepatotóxico do CCL<sub>4</sub>, estimulando o citocromo P-450 (Rao et al., 1997; Snyder, 2000).

Nossos resultados demonstraram que o tratamento somente com o fenobarbital durante duas semanas, não afetou de maneira significativa os níveis séricos das enzimas ALT e AST, o número total e diferencial dos leucócitos e a quimiotaxia *in vitro* dos neutrófilos, o que está de acordo com Brandão et al. (2000), que utilizando o mesmo modelo, descreveram que não foram observadas quaisquer alterações significativas nas dosagens séricas de ALT, AST, gama glutamil transpeptidase ( $\gamma$ -GT), bilirrubina total, proteína total e albumina após 18 semanas de tratamento com o fenobarbital. Rozga et al. (1991), utilizando ratos, descreveram que após 10 semanas de tratamento com o fenobarbital, os fígados estavam diminuídos, porém não foi encontrada nenhuma anormalidade nas análises feitas ao microscópio. Como o modelo experimental para o desenvolvimento de cirrose hepática, através da administração concomitante de CCL<sub>4</sub> e fenobarbital, já estava bem estabelecido (Proctor & Chatamra, 1982; Nielsen et al., 1991; Rozga et al., 1991; Brandão et al., 2000), decidimos não realizar um controle somente com a administração do fenobarbital durante 18 semanas.

Os resultados referentes aos níveis séricos das enzimas ALT e AST reforçam a eficácia deste modelo para o desenvolvimento de cirrose hepática, pois houve aumento significativo dos níveis séricos destas enzimas em todas as semanas de tratamento com a droga. De fato, Wang et al. (1997a) detectaram que os níveis de ALT e AST já se encontravam elevados 24 horas após cada administração de CCL<sub>4</sub>.

Estabelecido o modelo experimental, iniciamos, então, os estudos para verificarmos alguns parâmetros relacionados com a resposta inflamatória nos coelhos com lesão hepática. Inicialmente, o número total e diferencial dos leucócitos e o estudo da quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos foram efetuados uma semana após a administração do CCL<sub>4</sub>. Quanto à contagem dos leucócitos totais, observamos aumento significativo na 10<sup>a</sup> semana de tratamento, decorrente, principalmente, do aumento no número de neutrófilos. A contagem dos mononucleares não variou significativamente durante as 16 semanas de tratamento. Ao contrário, vinte e quatro horas após a administração da droga, apesar de não ter sido observada alteração significativa no número dos leucócitos totais, houve aumento na contagem dos neutrófilos no sangue periférico, em todas as semanas de tratamento, sendo que somente na quarta semana foi verificada uma diminuição significativa no número de mononucleares. Estes aumentos nas contagens dos neutrófilos obtidos em nossos resultados estariam de acordo com Sheron et al. (1993) que descreveram na hepatite alcoólica, com ausência de infecção bacteriana ou fungica, a contagem elevada dos neutrófilos do sangue periférico. Vários estudos têm demonstrado que os neutrófilos estão envolvidos em muitas doenças hepáticas, incluindo hepatite alcoólica, sepsis e após exposição a certos compostos químicos (Lawson et al., 2000). Estudos do número de leucócitos periféricos relacionados com hepatopatias foram descritos em pacientes por Campbell et al. (1981), que não encontraram nenhuma modificação na contagem de neutrófilos no sangue periférico de pacientes acometidos por diferentes tipos de doenças hepáticas.

Os resultados da quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos ao fMLP, realizada uma semana após a administração do CCL<sub>4</sub>, demonstraram aumentos da quimiotaxia *in vitro* entre a 2<sup>a</sup> e a 6<sup>a</sup> semana de tratamento.

Para verificar se a resposta quimiotática apresentava alguma relação com o tipo de lesão hepática em desenvolvimento, os animais foram sacrificados ao longo do tratamento com o CCL<sub>4</sub> (na 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas). Entretanto, mesmo nestes grupos de coelhos, cuja quimiotaxia foi estudada 24 horas após a administração do CCL<sub>4</sub>, foi verificado aumento desta resposta em todas as semanas de tratamento, ou seja, entre a 2<sup>a</sup> e a 8<sup>a</sup> semana. Campbell et al. (1981) demonstraram que, a locomoção de

neutrófilos *in vitro* ao plasma ativado com zimosan é diminuída em pacientes com cirrose alcoólica e cirrose cryptogênica. Este fenômeno foi atribuído à atividade de algum componente do plasma destes pacientes, pois não foi observada diminuição quando se utilizou plasma de doadores sadios, onde a locomoção foi considerada normal. Fiúza et al. (2000) utilizando pacientes cirróticos demonstraram que a migração de neutrófilos *in vivo* é significativamente diminuída em relação aos controles. Nossos resultados contradizem aos encontrados por estes pesquisadores, possivelmente, por tratar-se de hepatopatia de etiologia diferente, isto é, provocada por CCL<sub>4</sub>.

O CCL<sub>4</sub> induz a ativação das células de Kupffer e de macrófagos do sangue, efeito este que parece ser, pelo menos em parte, devido à liberação pelos hepatócitos de fatores quimiotáticos para estas células. (Delevé & Kaplowitz, 1995). As células de Kupffer e os hepatócitos podem sintetizar a IL-8 (Sheron et al., 1993), que é conhecida como um fator quimiotático para neutrófilos, além de causar neutrofilia e liberação de enzimas lisossomais pelos neutrófilos (Hill et al., 1993). Durante a hepatite alcoólica severa, os neutrófilos polimorfonucleares são ativados e migram do sangue em direção às lesões hepáticas onde participam do dano tecidual local (Taïeb et al., 2000). A exposição aguda ao CCL<sub>4</sub> também induz uma resposta inflamatória, acompanhada pela indução hepática de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  (Horn et al., 2000). Portanto, podemos sugerir que em nossos animais, estas citocinas poderiam ativar os neutrófilos na circulação periférica, provocando o aumento da atividade migratória destas células *in vitro*.

Confirmando o modelo do tratamento proposto por Brandão et al. (2000), nossos resultados das análises histológicas dos fígados dos animais sacrificados uma semana após a administração do CCL<sub>4</sub>, demonstraram que dos oito animais, sete desenvolveu cirrose (87,5%), com a formação de septos delgados e espessos. Estes resultados também estão de acordo com os encontrados por Burns et al. (1995) que pela administração semanal de CCL<sub>4</sub> em coelhos, concomitantemente com pentobarbital, descreveram o desenvolvimento de fibrose severa e a evidência de inflamação aguda e crônica. Do mesmo modo, o CCL<sub>4</sub> foi capaz de produzir necrose e esteatose uma semana após a última administração de CCL<sub>4</sub> (Zimmerman, 1993).

A evolução da lesão hepática analisada pela observação histológica dos fígados dos coelhos sacrificados em diferentes períodos, 48 horas após a última dose da

droga, mostrou que os coelhos sacrificados após duas e 4 semanas de tratamento com o CCL<sub>4</sub>, apresentaram o mesmo diagnóstico, sendo que um coelho (25%) desenvolveu hepatite moderada e três coelhos (75%) desenvolveram hepatite leve. No entanto, os coelhos sacrificados na 4<sup>a</sup> semana diferiram dos coelhos sacrificados na 2<sup>a</sup>, pelo maior desenvolvimento de esteatose e necrose. O desenvolvimento de necrose descrito em nossos resultados está de acordo com Miao et al. (1990), que descreveram que o CCL<sub>4</sub> produz necrose dos hepatócitos e infiltração de células inflamatórias. Lesage et al. (1999), descreveram que a administração, em ratos, de uma dose única de CCL<sub>4</sub>, causa necrose aguda dos hepatócitos. Jiang et al. (1992), por sua vez, descreveram que após quatro doses de CCL<sub>4</sub>, a necrose e a esteatose são as características predominantes no fígado lesado, o qual também pode apresentar septo delgado em grau leve.

O desenvolvimento de cirrose ocorreu entre a 6<sup>a</sup> (de cinco coelhos, um desenvolveu cirrose) e a 8<sup>a</sup> semana de tratamento com o CCL<sub>4</sub>, sendo que, de seis animais, quatro sacrificados na 8<sup>a</sup> semana (aproximadamente 66,6%) desenvolveram cirrose com formação de fibrose (leve e definida) e septos (delgados e espessos) e em todos estes animais houve a presença de neutrófilos e linfócitos no infiltrado inflamatório.

A fase da cirrose estabelecida é descrita por Proctor & Chatamra. (1982) após a administração de 8 a 10 doses de CCL<sub>4</sub> concomitante ao fenobarbital e por Rozga et al. (1991), entre a 10<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> semana de tratamento. Shimizu et al. (1999) descreveram que a diferença na extensão da função hepática pode afetar variavelmente as funções dos polimorfonucleares e que elevados níveis de citocinas e alteração na função dos polimorfonucleares, têm sido observados em pacientes com cirrose sendo que estas anormalidades podem estar associadas a várias patofisiologias observadas nesta doença. Sheron et al. (1993) descreveram que, em casos severos a hepatite está associada com a presença de neutrofilia.

Uma semana após a administração do CCL<sub>4</sub> não observamos relação entre os níveis séricos de ALT e AST e a resposta quimiotática, pois enquanto os níveis das enzimas continuaram elevados ao longo do tratamento, o que está de acordo com o descrito por Brandão et al. (2000), a resposta quimiotática só variou entre a 2<sup>a</sup> e a 6<sup>a</sup>

semana. Ao contrário, 24 horas após a administração do CCL<sub>4</sub>, pudemos observar uma relação entre o aumento da quimiotaxia *in vitro*, o aumento da contagem dos polimorfonucleares do sangue periférico, o aumento das enzimas (ALT e AST) e a presença de neutrófilos em aproximadamente 73,6% dos fígados dos coelhos sacrificados em diferentes períodos. Estes resultados podem estar relacionados à ativação e ao recrutamento destas células inflamatórias para o fígado, devido à formação da lesão hepática.

## 6 - CONCLUSÕES

---

- ◆ A resposta quimiotática *in vitro* dos neutrófilos verificada uma semana após a administração da droga, mostrou aumento entre a 2<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semana de tratamento. Quando verificada 24 h após a droga, a quimiotaxia apresentou elevação a partir da 2<sup>a</sup> até a 8<sup>a</sup> semana de tratamento.
- ◆ Neste mesmo período (2<sup>a</sup> até 8<sup>a</sup> semana), 24 h após a droga, observou-se também aumento no número dos neutrófilos do sangue periférico. Estes resultados podem estar relacionados à ativação e ao recrutamento destas células para o fígado, devido à formação da lesão hepática provocada pelo CCL<sub>4</sub>.
- ◆ A presença de neutrófilos no fígado dos animais com cirrose, associada com o aumento da quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos durante a administração do CCL<sub>4</sub>, sugere que estas células têm importante função no desenvolvimento do dano hepático causado pelo CCL<sub>4</sub>.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- AL-WABEL, A.; AL-JANADI, M.; RAZIUDDIN, S.; PATH, M.R.C. - Cytokine profile of viral and autoimmune chronic active hepatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**(6): 902-908, 1993.
- AKAHORI, A.; MASUI, M.; KAGAWA, K.; ENOMOTO, M.; SAITO, M. - Time course of biochemical and histological alterations following a single feeding of carbon tetrachloride to mice. *Japan. J. Exp. Med.* **53**(4): 199-209, 1983.
- BIANCHI, L.; DE GROOTE, J.; DESMET, V.J.; GEDIGK, P.; KORB, G.; POPPER, H.; POULSEN, H. - Acute and chronic hepatitis revisited. *Lancet* **2**: 914-919, 1977.
- BATTS, P.K. & LUDWING, J. - Chronic hepatitis: an update on terminology and reporting. *Am. J. Surg. Pathol.* **19**(12): 1409-1417, 1995.
- BIRD, G. - Interleukin-8 in alcoholic liver disease. *Acta. Gastroenterol. Belg.* **57**: 255-259, 1994.
- BOSMA, A.; BROUWER, A.; SEIFERT, W.F.; KNOOK, D.L. - Synergism between ethanol and carbon tetrachloride in the generation of liver fibrosis. *J. Pathol.* **156**: 15-21, 1988.
- BRANDÃO, C.G.; FRREIRA, H.H.A.; PIOVESANA, H.; POLIMENO, N.C.; FERRAZ, J.G.P.; PEDRAZZOLI, J.J. - Development of an experimental model of liver cirrhosis in rabbits. *Exp. Clí. Pharm. Physiol.* **27**: 987-990, 2000.
- BURNS, R.C.; WU, Y.; SITZMANN, V. - Role of cirrhosis in the hemodynamic response to hemorrhage in portal hypertension. *Surgery* **117**: 488-493, 1995.
- BUSCHMANN, R.J. & RYOO, J.W. - Hepatic structural correlates of liver fibrosis: a morphometric analysis. *Exp. Mol. Pathol.* **50**: 114-124, 1989.

CALAMITA, Z. & BURINI, R.C. - Alterações imunitárias na cirrose hepática alcoólica+. *Arq. Gastroenterol.* 32(2): 79-84, 1995.

CAMPBELL, A.C.; DRONFIELD, M.W.; TOGHILL, P.J.; REEVES, W.G. - Neutrophil function in chronic liver disease. *Clin. Exp. Immunol.* 45: 81-89, 1981.

CONN, H. Atterbury CE. Cirrhosis. In Schiff L. Schiffer. **Diseases of the liver**, 7<sup>a</sup>ed. Philadelphia, J. B. Lippincott Company. 875-934, 1993.

DELEVE, L.D. & KAPLOWITZ, N. – Mechanisms of drug-induced liver disease. **Drug-induced liver disease** 24(4): 787-805, 1995.

DESMET, V.J.; GERBER, M.; HOOFNAGLE, J.H.; MANNS, M.; SCHEUER, P.J. - Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 19: 1513-1520, 1994.

EVERSON, G.T.; JENSEN, D.M.; CRAIG, J.R.; LEEUWEN, D.J.V.; BAIN, V.G.; EHRINPREIS, M.N.; ALBERT, D.; JOH, T.; WITT, K.; GROUP, C.I.S. – Efficacy of interferon treatment for patients with chronic hepatitis C: comparison of response in cirrhotics, fibrotics, or nonfibrotics. *Hepatology* 30: 271-276, 1999.

FIUZA, C.; SALCEDO, M.; TELLADO, J.M. – In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. *J. Infect. Dis.* 182(2): 526-533, 2000.

HARKNESS, R.A. – The characteristic cell of acute inflammation. The polymorphonuclear neutrophil leucocyte, and its biochemistry. **Molec. Aspects Med.** 4(3/4): 191-207, 1981.

HILL, D.B.; MARSANO, L.S.; MCCLAIN, C.J. - Increased plasma interleukin-8 concentrations in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 18: 576-580, 1993.

HORN, T.L.; O'BRIEN, T.D.; SCHOOK, L.B.; RUTHERFORD, M.S. - Acute hepatotoxicant exposure induces TNFR-mediated hepatic injury and cytokine/apoptotic gene expression. *Toxicol. Sci.* 54: 262-273, 2000.

- JAESCHKE, H.; SMITH, C.W.; CLEMENS, M.G.; GANEY, P.E.; ROTH R.A. - Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** **139**: 213-226, 1996.
- JAESCHKE, H. - Celular adhesion molecules: regulation and functional significance in the pathogenesis of liver diseases. **Am. J. Physiol.** **273**: G602-G611, 1997.
- JAESCHKE, H. & SMITH, C.W. - Cell adhesion and migration III: leukocyte adhesion and transmigration in the liver vasculature. **Am. J. Physiol.** **36**: G1169-G1173, 1997.
- JAMAL, M.M.; SONI, A.; QUINN, P.G.; WHEELER, D.E.; ARORA, S.; JOHNSTON, D.E. - Clinical features of hepatitis C-infected patients with persistently normal alanine transaminase levels in the southwestern United States. **Hepatology** **30**: 1307-1311, 1999.
- JIANG, Z.; YOU, D.; CHEN, X.; WU, J. - Monitoring of serum markers for fibrosis during CCL<sub>4</sub>-induced liver damage: effects of anti-fibrotic agents. **J. Hepatol.** **16**: 282-289, 1992.
- KHORUTS, A.L.; STAHLKE, L.; MCCLAIN, C.J.; LOGAN, G.; ALLEN, J.I. - Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. **Hepatology** **13**: 267-276, 1991.
- LAFFI, G.; FOSCHI, M.; MASINI, E.; SIMONI, A.; MUGNAI, L.; VILLA, G.L.; BARLETTA, G.; MANNAIONI, P.F.; GENTILINI, P. - Increased production of nitric oxide by neutrophils and monocytes from cirrhotic patients with ascites and hyperdynamic circulation. **Hepatology** **22**: 1666-1673, 1995.
- LASO, F.J.; IGLESIAS, M.C.; LOPEZ, A.; CIUDAD, J.; MIGUEL, J.F.S.; ORFAO, A. - Increased interleukin-12 serum levels in chronic alcoholism. **J. Hepatol.** **28**: 771-777, 1998.
- LAWSON, J.A.; FARHOOD, A.; HOPPER, R.D.; BAJT, M.L.; JAESCHKE, H. - The hepatic inflammatory response after acetaminophen overdose: role of neutrophils. **Toxicol. Sci.** **54**: 509-516, 2000.

- LESAGE, G.D.; GLASER, S.S.; MARUCCI, L.; BENEDETTI, A.; PHINIZY, J.L.; RODGERS, R.; CALIGIURI, A.; PAPA, E.; TRETJAK, Z.; JEZEQUEL, A.M.; HOLCOMB, L.A.; ALPINI, G. – Acute carbon tetrachloride feeding induces damage of large but not small cholangiocytes from BDL rat liver. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** **276**: G1289-G1301, 1999.
- LLORENTE, L.; PATIN, Y.R.; CASTILLEJOS, N.A.; SOTO, R.R.; MERCADO, M.A.; OROZCO, H.; DOMÍNGUEZ, A.G.; VARELA, J.A. – Cytokine gene expression in cirrhotic and non-cirrhotic human liver. **J. Hepatol.** **24**: 555-563, 1996.
- LOUIS, H.; LAETHEM, J.V.; WU, W.; QUERTINMONT, E.; DEGRAEF, C.; BERG, K.V.D.; DEMOLS, A.; GOLDMAN, M.; MOINE, O.L.; GEERTS, A.; DEVIÈRE, J. – Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. **Hepatology** **28**: 1607-1615, 1998.
- MACKAY, C.R. & IMHOF, B. A. – Cell adhesion in the immune system. **Immul. Today** **14**: 99-102, 1993.
- MACKINNON, M.; CLAYTON, C.; PLUMMER, J.; AHERN, M.; CMIELEWSKI, P.; ILSLEY A.; HALL, P. – Iron overload facilitates hepatic fibrosis in the rat alcohol/low-dose carbon tetrachloride model. **Hepatology** **21**: 1083-1088, 1995.
- MACSWEEN, R.N.M. - Alcoholic liver disease: morphological manifestations. **Lancet** i:707-711, 1981.
- MAHER, J.J. – Alcoholic liver disease. In **Sleisinger & Fordtran's Gastrointestinal and liver diseases**. Feldman, M.; Scharschmidt, B.F.; Sleisinger, M.H., eds, 6<sup>th</sup> ed, 1998, 1199-1214.
- MARRA, F. - Review: hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. **J. Hepatology** **31**: 1120-1130, 1999.
- MASUMOTO, T.; OHKUBO, K.; YAMAMOTO, K.; NINOMIYA, T.; ABE, M.; AKBAR, S.F.; MICHITAKA, K.; HORIKE, N.; ONJI, M. – Serum IL-8 levels and localization of IL-8 in liver from patients with chronic viral hepatitis. **Hepato-Gastroenterology** **45**: 1630-1634, 1998.

- MATSUKAWA, A.; YOSHIMURA, T.; MIYAMOTO, K.; OHKAWARA, S.; YOSHINAGA, M. - Analysis of inflammatory cytokine network among TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 receptor antagonist, and IL-8 in LPS-induced rabbit arthritis. **Lab. Invest.** **76**(5): 629-638, 1997.
- MCLEAN, E.K.; MCLEAN, A.E.M.; SUTTON, P.M. - Instant cirrhosis: an improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. **Br. J. Exp. Path.** **50**: 502-506, 1969.
- MIAO, S.; BAO-EN, W.; ANNONI, G.; ESPOSTI, S.D.; BIEMPICA, L.; ZERN, M.A. - Two rat models of hepatic fibrosis: a morphologic and molecular comparison. **Lab. Invest.** **63**(4): 467-475, 1990.
- MINCIS, M. - Cirrose hepática. In **Gastroenterologia**. Guimarães, R.X. & Vilela, M.P., Sarvier, São Paulo, 1979, 321-333.
- MINCIS, M. & LANZONI, V.P. - Cirrose hepática. In **Gastroenterologia & Hepatologia**. Ferraz, M.L. & Silva, A.E., Lemos Editorial & Gráficos Ltda, São Paulo, 1997, 715-739.
- MIYAMOTO, K.; MATSUKAWA, A.; OHKAWARA, S.; TAKAGI, K.; YOSHINAGA, M. - IL-8 is involved in homologous TNF $\alpha$ -, but not in IL-1 $\beta$ -induced neutrophil infiltration in rabbits. **Inflamm res** **46**: 472-477, 1997.
- MOODY, D.E.; JAMES, J.L.; SMUCKLER, E.A. - Phenobarbital pretreatment alters the localization of CCL<sub>4</sub>-induced changes in rat liver microsomal fatty acids. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** **103**: 16-27, 1990.
- MURIEL, P. - Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbon tetrachloride. **Biochem. Pharmacol.** **56**(6): 773-779, 1998.
- NIELSEN, A.F.; POULSEN, H.E.; HANSEN, B.A.; HAGE, E.; KEIDING, S. - CCL<sub>4</sub> cirrhosis in rats: irreversible histological changes and differentiated functional impairment. **J. Hepatol.** **12**: 110-117, 1991.

- OLASO, E. & FRIEDMAN, S.L. - Review: molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J. Hepatol.* **29**: 836-847, 1998.
- OSBORN, L. – Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* **62**: 3-6, 1990.
- OZEKI, T.; FUNAKOSHI, K.; IWAKI, K. - Rapid induction of cirrhosis by administration of carbon tetrachloride plus phospholipase D. *Br. J. Exp. Path.* **66**: 385-390, 1985.
- PROCTOR, E. & CHATAMRA, K. - High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* **83**: 1183-1190, 1982.
- RAJKOVIC, I.A.; YOUSIF-KADARU, A.G.M.; WYKE, R.J.; WILLIAMS, R. - Polymorphonuclear leucocyte locomotion and aggregation in patients with alcoholic liver disease. *Clin. exp. Immunol.* **58**: 654-662, 1984.
- RAO, P.S.; MANGIPUDY, R.S.; MEHENDALE, H.M. – Tissue injury and repair as parallel and opposing responses to CCL<sub>4</sub> hepatotoxicity: a novel dose-response. *Toxicol.* **118**: 181-193, 1997.
- RICHARDS, K.L. & MCCULLOUGH, J.M. - A modified microchamber method for chemotaxis and chemokinesis. *Immunol. Commun.* **13(1)**: 49-62, 1984.
- ROBBINS, R.A.; ZETTERMAN, R.K.; KENDALL, T.J.; GOSSMAN, G.L.; MONSOUR, H.P.; RENNARD, S.I. - Elevation of chemotactic factor inactivator in alcoholic liver disease. *Hepatology* **7(5)**: 872-877, 1987.
- ROJKIND, M. & DUNN, M.A. Hepatic fibrosis. *J. Hepatol.* **19**: 64-70, 1993.
- ROSENBLUM, A.J.; PINSKY, M.R.; BRYANT, J.L.; SHIN, A.; TRAN, T.; WHITESIDE, T. - Leukocyte activation in the peripheral blood of patients with cirrhosis of the liver and SIRS: correlation with serum interleukin-6 levels and organ dysfunction. *JAMA* **274(1)**: 58-65, 1995.
- ROSSI, A.G. & HELLEWELL, P.G. – Mechanisms of neutrophil accumulation in tissues. In: *Handbook of Immunopharmacology*. Hellewell, P.G. and Williams, T.J. (Eds) Academic press, 1994, 223-243.

- ROZGA, J.; FOSS, A.; ALUMETS, J.; AHREN, B.; JEPPSSON, B.; BENGMARK, S. - Liver cirrhosis in rats: regeneration and assessment of the role of phenobarbital. *J. Surg. Res.* **51**: 329-335, 1991.
- SHERLOCK, S. & DOOLEY, J. - Assessment of Liver Function. In: **Disease of the Liver and Biliary System**, Sherlock, S. and Dooley, J., 10<sup>a</sup> Edição, Blackwell Scientific Publications, London, 1997, 17-32.
- SHERON, N., BIRD, G., ALEXANDER, G.; WILLIAMS, R. - Elevated plasma interleukin-6 and increased severity and mortality in alcoholic hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.* **84**: 449-453, 1991.
- SHERON, N.; BIRD, G.; KOSHINAS, J.; PORTMANN, B.; CESKA, M.; LINDLEY, I.; WILLIAMS, R. - Circulating and tissue levels of the neutrophil chemotaxin interleukin-8 are elevated in severe acute alcoholic hepatitis, and tissue levels correlate with neutrophil infiltration. *Hepatology* **18**: 41-46, 1993.
- SHIMIZU, Y.; MIYAZAKI, M.; ITO, H.; NAKAGAWA, K.; AMBIRU, S.; SHIMIZU, H.; NAKAMURA, S.; OKUNO, A.; NOZAWA, S.; NUKUI, Y.; YOSHITOMI, H.; NAKAJIM, N. - Enhanced polymorphonuclear neutrophil-mediated endothelial cell injury and its relation to high surgical mortality rate in cirrhotic patients. *Am. J. Gastroenterol.* **94**: 3297-3303, 1999.
- SMEJKALOVA, J.; SIMEK, J.; ROUCHAL, J.; DVORACKOVA, I. - The time course of biochemical and histological changes following carbon tetrachloride-induced liver damage in rats of both sexes. *Physiol. Bohemoslov.* **34(6)**: 494-501, 1985.
- SMITH, J.A. - Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukoc. Biol.* **56**: 672-686, 1994.
- SNYDER, R. - Microssomal enzyme induction. *Toxicol. Sci.* **55**: 233-234, 2000.
- SORBI, D.; BOYNTON, J.; LINDOR, K.D. - The ratio of aspartato aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* **94**: 1018-1022, 1999.

- SUGAWARA, T.; MIYAMOTO, M.; TAKAYAMA, S.; KATO, M. - Separation of neutrophils from blood in human and laboratory animals and comparison of the chemotaxis. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **33**(2): 91-100, 1995.
- TAÏEB, J.; MATHURIN, P.; ELBIM, C.; CLUZEL, P.; ARCE-VICIOSO, M.; BERNARD, B.; OPPOLON, P.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A.; POYNARD, T.; CHOLLET-MARTIN, S. – Blood neutrophil functions and cytokine release in severe alcoholic hepatitis: effect of corticosteroids. *J. Hepatol.* **32**: 579-586, 2000.
- TAKAHASHI, T.; KAMINURA, T.; ICHIDA, F. - Ultrastructural findings on polymorphonuclear leucocyte infiltration and acute hepatocellular damage in alcoholic hepatitis. *Liver* **7**: 347-358, 1987.
- TAYLOR, B.S.; ALARCON, L.H.; BILLIAR, T.R. - Review: inducible nitric oxide syntase in the liver: regulation and function. *Biochemistry (mosc)* **63**(7): 766-781, 1998.
- TORRES, M.E.; BOUZA, P.J.I.; HERNANDEZ, A.M.M.; MARTIN, A.M.J.; BRAVO, L.A. - Experimental carbon tetrachloride-induced cirrhosis of the liver. *Int. J. Tiss. Reac.* **X(4)**: 245-251, 1988.
- TSUKAMOTO, H.; MATSUOKA, M.; FRENCH, S.W. – Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin. Liver Dis.* **10**(1): 56-62, 1990.
- UGASIO, G.; BOSIA, S.; CORNAGLIA, E. – Experimental model of cirrhosis in rabbits exposed to carbon tetrachloride by inhalation. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **88**(1): 63-77, 1995.
- VAN EPPS, D.E.; STRICKLAND, R.G.; WILLIAMS, R.S. - Inhibition of leucocyte chemotaxis in alcoholic liver disease. *Am. J. Med.* **59**: 200-205, 1975.
- VERGANI, D. & MIELI, V.G. - Type II autoimmune hepatitis: what is the role of hepatitis C virus? *Gastroenterology* **104**: 1870-1872, 1993.
- WANG, P.Y.; KANEKO, T.; TSUKADA, H.; NAKANO, M.; NAKAJIMA, T.; SATO, A. - Time courses of hepatic injuries induced by chloroform and by carbon tetrachloride: comparison of biochemical and histopathological changes. *Arch. Toxicol.* **71**: 638-645, 1997a.

WANG, P.Y.; KANEKO, T.; TSUKADA, H.; NAKANO, M.; NAKAJIMA, T.; SATO, A. - Dose- and route-dependent alterations in metabolism and toxicity of chemical compounds in ethanol-treated rats: difference between highly (chloroform) and poorly (carbon tetrachloride) metabolized hepatotoxic compounds. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** **142**: 13-21, 1997b.

WILKINSON, P.C. – Celular accumulation and inflammation. In: **Texbook of Immunopharmacology**. Dale, M.M. & Foreman, J.C. Blackwell Scientific Publication, 1984, 217-232.

YAMAUCHI, M.; MIZUHARA, Y.; MAEZAWA, Y.; TODA, G. - Serum levels of integrins in chronic liver diseases. **Path. Res. Pract.** **190**: 984-992, 1994.

ZIMMERMAN, H.J. - Hepatotoxicity. **Dis. Mon.** **39(10)**: 675-787, 1993.

ZIMMERMAN, H.J. & LEWIS, J.H. – Chemical- and toxin-induced hepatotoxicity. **Drug-induced liver disease** **24(4)**: 1027-1041, 1995.