

**“Efeito da colchicina na fibrose hepática induzida
quimicamente em coelhos”**

Clodomir García Brandão

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Pedrazzoli Jr.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

Membros:

1. Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

2. Prof. Dr. Luiz Ernesto de Almeida Troncon

3. Prof. Dr. Alex Callado Vianey França

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

Data: 25/3/99

CLODOMIR GARCIA BRANDÃO

**“Efeito da colchicina na fibrose hepática induzida
quimicamente em coelhos”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de mestre em
Ciências na área de Farmacologia.

Orientador: PROF. DR. JOSÉ PEDRAZZOLI JÚNIOR

Campinas

1999

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO 60/	3440
PREC	229/99
C	☐
D	☒
PRECIO	R\$ 11,00
DATA	02/06/99
N.º CPD	

CM-00123738-1

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

B733e Brandão, Clodomir Garcia
 "Efeito da colchicina em fibrose hepática quimicamente induzida em coelhos" / Clodomir Garcia Brandão. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

Orientador: José Pedrazzoli Júnior
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cirrose hepática. 2. Matriz extracelular. 3. Fibroblasto. 4. Fígado. I. José Pedrazzoli Júnior. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

*Aos meus pais, Osvaldo e Inês
que com carinho e paciência
participaram e continuam
participando de todas as fases de
minha vida .*

*Obrigado por estarem sempre
presentes.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior, pela orientação, paciência e confiança, que tornou este trabalho possível.

Ao Prof. Newton Carlos Polimeno e aos funcionários do LUAC – USF

Ao Prof. Dr. Marcelo Muscará e aos amigos da UNIFAG (Dra. Silvana, Dra. Heloisa, Dr. Sérgio, Fernanda, Cláudia, Gustavo, Cristiane, Maristela, Sérgio, Adriano, Flávia e Paula).

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, e em especial para os amigos da Farmacologia Clínica, pelo acolhimento e disposição em me ajudar.

A todos os meus amigos. Em especial meus irmãos Clodoaldo e Clodimary e minha noiva Andréia.

Aos funcionários do canil-biotério da USF pelo apoio e acolhimento.

A todos os funcionários do laboratório de Patologia Clínica da USF, em especial a Helenice Piovezam, responsável pelos estudos histopatológicos.

À FAPESP pelo apoio financeiro recebido mediante a concessão da bolsa de mestrado.

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

**Se a sabedoria entrar no teu
coração e a ciência agradar à
tua alma, o conselho te
guardará e a prudência te
conservará...**

Provérbios 2,10-11

LISTA DE ABREVIATURAS

AST	Aspartato aminotransferase.
ALT	Alanina aminotransferase
C_{max}	Concentração máxima atingida.
CCl₄	Tetracloreto de carbono
CYP	Citocromo P450
BTF	Bilirrubina Total e Frações
EPM	Erro padrão da média
γ - GT	Gama glutamil transpeptidase
ICG	Verde de indocianina
PTF	Proteína Total e Frações
PFA	Proteínas de fase aguda
PIIINP	Procolágeno aminoterminal propeptídio do tipo III
RER	Reticulo Endoplasmático Rugoso
REL	Reticulo Endoplasmático Liso
RFA	Resposta de fase aguda
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
TIMP	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TNF	Fator de necrose tumoral
TGFβ1	Fator de crescimento e transformação β1
UV	Ultra violeta
v.o.	via oral
i.v.	intravenosa

LISTA DE MATERIAIS

Cloreto de sódio (solução injetável 0,9%, Fresenius, Campinas, SP) 100ml lote: IB2116 (11/97); 250ml lote: B 9662 (7/96);

Cloridrato de lidocaína (Xylocaína® solução injetável 2%, Astra Quím. Farm. Ltda);

Colchicina (colchicina 95%, Sigma chemical C.o. EUA, lote: 109F00992);

Fenobarbital (Gardenal® comprimidos 100 mg, Rhodia, Brasil) lote: 195 (05/97); 5^{mg}

(01/98); Heparina sódica (Heparin® solução injetável 5000 UI/ml, Cristália prod.

Quím Farm. Ltda, SP) lote: 9707299 (7/97); Pentobarbital sódico (Sagatal® solução

injetável 60mg/ml, Rhône Mérieux, Irlanda) lote: 90015 (2/95); Tetracloreto de

carbono p.a. (Merck Ind. Quím, RJ); Verde de indocianina (Sigma Chem. Co., EUA,

Lot.14H0494); Xilol (Mallinckrodt Baker SA, México, Lote:8668MTKA)

SUMÁRIO

	pág
Lista de abreviaturas.....	vi
Lista de materiais.....	vii
Lista de tabelas.....	x
Lista de figuras.....	xi
Resumo.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Fibrose hepática.....	1
1.2 Modelos experimentais.....	7
1.3 Colchicina.....	
1.4 Citocromo P450.....	15
1.5 Verde de indocianina.....	16
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Animais.....	19
3.2 Modelo de desenvolvimento de cirrose em coelho	20
3.3 Determinação da taxa de depuração plasmática do verde de indocianina ..	22
3.5 Análise histopatológica.....	23
3.6 Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS.....	26
5. DISCUSSÃO.....	41

6. CONCLUSÕES.....	45
7. SUMMARY.....	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
9. APÊNDICE	66

LISTA DE TABELAS

TABELA I – Parâmetros bioquímicos em coelhos controles e animais tratados com CCl_4

29

TABELA II - Resultados das análises histopatológicas dos fígados dos coelhos tratados com

18 semanas de fenobarbital e 16 semanas de CCl_4 . 38

TABELA III - Resultados das análises histopatológicas dos fígados dos coelhos

18 semanas de fenobarbital e 16 semanas de CCl_4 com colchicina após

tratamento com CCl_4 . 39

TABELA IV- Resultados das análises histopatológicas dos fígados dos coelhos tratados com

18 semanas de fenobarbital e 16 semanas de CCl_4 e 16 semanas de colchicina desde o início

do tratamento com CCl_4 . 40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução do peso corporal dos animais dos diferentes grupos tratados	27
Figura 2. Níveis séricos de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase dos diferentes grupos tratados	31
Figura 3. Níveis séricos de bilirrubina e γ -GT dos diferentes grupos tratados ..	32
Figura 4. Níveis séricos de albumina e proteína total dos diferentes grupos tratados	35
Figura 5. Alterações dos níveis plasmáticos de verde de indocianina nos diferentes grupos tratados	36

RESUMO

O desenvolvimento de fibrose é um ponto fundamental na formação da cirrose hepática e sua compreensão é essencial para o entendimento da fisiopatologia da cirrose e da conseqüente hipertensão portal. Assim, o desenvolvimento de um modelo experimental adequado de fibrose hepática é útil para o entendimento das enfermidades que podem evoluir para a cirrose hepática.

A colchicina tem sido usada em pacientes com cirrose hepática e seus efeitos não são totalmente conhecidos. Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento da fibrose hepática pela administração de tetracloreto de carbono (CCl_4) por via intragástrica e o de avaliar o efeito da administração de colchicina neste modelo.

Para este estudo foram utilizados 37 coelhos machos da raça *New Zealand* ($2,73 \pm 0,05$ Kg), os quais receberam água e ração *ad libitum* ao longo do período de experimentação. Estes animais foram divididos em 5 grupos.

Catorze dias após o começo do tratamento com fenobarbital os animais começaram a receber semanalmente o CCl_4 (dose inicial de 20 mg diluído em óleo de milho a 10 %) por via intragástrica. A dose foi ajustada de acordo com controles bioquímicos indicativos de lesão hepática (aspartato aminotransferase [AST] e alanina aminotransferase [ALT], visando-se manter tais níveis plasmáticos entre 400 e 800 U/l). Amostras de sangue dos animais foram coletadas 24 h após cada administração de CCl_4 , para dosagem de aminotransferases (AST e ALT), bilirrubinas (total e indireta), gama glutamil transpeptidase (γ -GT), proteínas e albumina.

Além dos controles bioquímicos, os animais foram pesados semanalmente.

Para avaliar os efeitos do tratamento com fenobarbital e CCl_4 sobre o fluxo sangüíneo hepático, foram determinadas as velocidades de depuração do verde de indocianina (ICG) antes e após o final do tratamento (aproximadamente 8 mg/kg em solução salina).

A colchicina foi administrada diariamente em 2 grupos de animais (a partir da 11ª semana de tratamento com CCl_4 e em outro, desde o início do tratamento com CCl_4).

Para este trabalho foram feitos 2 grupos controles, onde um dos grupos recebeu doses diárias de fenobarbital durante todo o experimento (controle fenobarbital) e o outro grupo apenas foi tratado com ração e água *ad libitum*.

Ao final do período de estudo os animais foram sedados e sacrificados com uma injeção de ar *i.v.* e foram retirados 3 fragmentos de cada lobo hepático para análise histológica.

Um número maior de animais que não recebeu colchicina desenvolveu cirrose, comparado com o grupo que recebeu a droga (8/10 vs. 0/10, $p < 0.01$), tendo a fibrose sido menor nos animais tratados com colchicina ($p < 0.01$). Coelhos com 16 semanas de tratamento com colchicina tiveram, no final do experimento, ICG, γ -GT, bilirrubina e ganho de peso semelhantes aos dos grupos controle, ao contrário dos animais que não receberam.

A baixa letalidade e o elevado número de animais que desenvolveram cirrose hepática (8/10) leva a concluir que este tipo de modelo é eficaz.

O peso corporal dos animais não serve como parâmetro para o ajuste da dose de tetracloreto de carbono, pois não houve alteração do mesmo durante o tratamento com CCl_4 .

Para o controle do desenvolvimento da lesão hepática, apenas a determinação das aminotransferases é suficiente.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fibrose hepática

A fibrose hepática é uma importante característica de muitas doenças hepáticas e o estudo do processo do desenvolvimento da mesma é essencial para o entendimento da etiopatogenia destas enfermidades (Buschmann et al., 1989).

Pode-se definir fibrose como um acúmulo relativo ou absoluto de componentes da matriz extracelular, determinando um aumento na relação estroma / célula no órgão acometido (Parise, 1995).

Todas as células que rodeiam os sinusóides hepáticos respondem a alterações na composição da matriz extracelular. Modelos *in vivo* e em culturas têm sido usados para avaliação da interação célula-matriz (Senoo et al., 1996; Friedman et al., 1989). A composição do substrato pode afetar a forma da célula, o crescimento e a produção da matriz extracelular. Por exemplo, a deposição endotelial prematura de fibronectina pelas células endoteliais sinusoidais provoca a ativação das células de Ito (Jarnagin et al., 1994). Posteriormente, o acúmulo de fibril formina, originada da matriz, leva à perda da função de diferenciação dos hepatócitos (Bissel et al., 1987), e reduz a porosidade das células sinusoidais (McGuire et al., 1992).

A constante presença de infiltrado de células mononucleares nos tecidos que evoluem para a fibrose ou para simples reparação tecidual tem levado ao estudo do possível papel regulador dos linfócitos e monócitos / macrófagos sobre as funções dos fibroblastos. Estes estudos tem demonstrado que tais células, por meio da liberação de fatores solúveis (as linfocinas e as monocinas), podem efetivamente

estimular ou inibir a proliferação, a síntese protéica e a movimentação dos fibroblastos e das células efetoras da fibrogênese, quer no sentido de estimular a síntese de tecido conjuntivo, quer induzindo a sua degradação (fibrólise). Entre os fatores citados encontram-se o TGF β 1 (fator de crescimento e transformação β 1), o TNF (*Tumor Necrosis Factor*), as interleucinas, a fibronectina e o fator de crescimento plaquetário. (Bissell et al., 1990; Czaja et al., 1989; Gressner et al., 1991). O TGF β 1 inibe a proliferação de hepatócitos e parece ter um papel importante na estimulação da fibrogênese pelas células de Ito, produtoras de componentes da matriz extracelular (Weiner et al., 1992).

As transformações iniciais no espaço de Disse, que ocorrem após a lesão hepática são importantes, devido a deposição de colágeno formador de fibrina (tipo I, III e V). Os sinusóides são convertidos em capilares (capilarização) com perda de fenestras sinusoidais, impedindo as trocas metabólicas entre o sangue e os hepatócitos. Experimentalmente, a capilarização sinusoidal leva a um aumento da resistência vascular hepática à hipertensão portal. A progressão da fibrose altera a arquitetura hepática levando à cirrose e à hipertensão portal. (Shibayama et al., 1989).

A formação da cicatriz fibrosa é consequência tanto da produção aumentada quanto da degradação reduzida da matriz extra celular. Ambos os processos são complexos. A fibrose em seus estágios iniciais é reversível, mas a cirrose com nódulos regenerativos não o é (Ahmed et al., 1984; Atterbury et al., 1982).

A matriz extracelular hepática é composta por 3 grandes grupos de macromoléculas, sendo eles os colágenos (intersticiais (I e II), membrana basal e intersticial (IV, V e VI) e glicosaminoglicanos, os proteoglicanos (sulfatados (heparan, dermatan e condroitim), não sulfatados (ác. hialurônico e condroitim) e fibronectina)

e as glicoproteínas (laminina e entactina) (Rojkind et al., 1982; Schuppan et al., 1990). No processo de fibrose hepática, todos estes compostos encontram-se com concentração elevada, quer seja nos septos, quer na fibrose intersticial (Parise et al., 1992). Entretanto, estas modificações não são simples conseqüências do processo, uma vez que as alterações desta matriz acabam por determinar importantes mudanças fenotípicas das células, perpetuando o processo fibrótico (Bissell et al., 1990; Schuppan et al., 1990).

Um fator importante no acúmulo de tecido fibroso é a degradação da matriz protéica, que é regulada pela família de enzimas das metaloproteinases (Arthur et al., 1994), que são subdivididas em 3 principais grupos: collagenases, gelatinases (tipo IV) e estromalisinas. As collagenases (tipos I, II e III) degradam o colágeno intersticial. As gelatinases (tipo IV) atuam na membrana basal. As estromalisinas degradam vários substratos, incluindo proteoglicanos, laminina, α_1 e fibronectina. Estas enzimas são sintetizadas primeiramente pelas células de Kupfer e ativadas pelas células de Ito. As metaloproteinases são inibidas pelos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs). A célula de Ito ativada secreta TIMP-1 (Iredale et al., 1992) e, portanto, ocupa a principal posição em ambas as regulações, tanto da degradação da matriz, como a da produção do tecido fibroso. O TIMP está aumentado no soro de pacientes pré cirróticos e em pacientes com cirrose alcoólica (Italian Multicentre Cooperative Project, 1994).

Em um plano secundário à alteração anatômica, ocorre um distúrbio funcional e hemodinâmico. A cirrose resulta da inibição do sistema hepático para restaurar a homeostase alterada por um dos muitos agentes conhecidos que causam lesão. Esta foi recentemente definida como uma alteração funcional em qualquer célula que componha o sistema hepático, independente da morte celular. Como

para um sistema complexo, dentro de certos limites, todos esses elementos permanecem constantes em termo da sua distribuição e quantidade. Contudo, o mecanismo de regulação necessário para manter o equilíbrio do sistema é feito dentro do órgão. Isto resulta em uma múltipla interação entre as várias classes de células hepáticas, bem como destas células com componentes da matriz extracelular (Rojkind et al., 1988). Quando qualquer um destes mecanismos está alterado, o organismo tenta restaurar a homeostase e produzir fator de crescimento e citocinas. Estes podem ser os mesmos fatores de crescimento e citocinas que são normalmente produzidos, ou podem incluir um novo fator, presente somente na resposta à lesões que intensifica o processo de reparo. Se a lesão é simples, de pequena intensidade e de curta duração, a restauração ocorrerá e somente mecanismos locais serão ativados. Quando o agente agressor persistir ou for de média intensidade, o agente local poderá ser insuficiente para reparar o processo. Nestas condições, a resposta geral do organismo para o processo inflamatório específico, chamada de resposta de fase aguda (RFA), irá ocorrer. A produção sistêmica das citocinas por monócitos da circulação sangüínea induz febre, leucocitose e alteração no nível plasmático de um grupo de proteínas hepáticas chamadas de proteínas de fase aguda (PFA). Em adição, as citocinas circulatórias podem induzir ou alterar a produção de citocinas e dos fatores de crescimento pelas células do fígado, bem como pelas células inflamatórias que ocorrem nos sítios inflamatórios. Em geral, a fase aguda é transitória e, uma vez que a lesão esteja sob controle, ou o agente agressor eliminado, a reação sistêmica cessa, e somente eventos locais persistem até a lesão ter sido reparada. Sob estas condições, não ocorre formação de cicatrizes, ou tendo esta sido formada, será remodelada, de tal forma a não ser detectado nenhum sinal no tecido lesado. Contudo, se um evento

simples de baixa intensidade é repetido intermitentemente por períodos prolongados, o processo de reparo leva a uma formação de cicatriz e evolui até que a quantidade de tecido conectivo depositado atinja valores de 5 a 10 vezes maiores que os níveis normais. Por razões desconhecidas, a quantidade de colágeno por grama do fígado nunca ultrapassa de 30 a 35 mg de colágeno/g (Rojkind et al., 1979). Isto é possível, porque sob condições de lesão crônica de baixa intensidade, o estímulo para regeneração é pequeno ou o tecido não se está dando o tempo necessário para remodelar a cicatriz, quando um segundo ou terceiro estímulo para fibrogêneses é imposto. O dano crônico diminui ou elimina o mecanismo envolvido na remodelagem do tecido, tal como o da produção de collagenase e outras metaloproteinases (Monfort et al., 1990). Quando a intensidade da lesão é suficiente para comprometer significativamente a função, os mecanismos que predominam são os necessários para aumentar a massa funcional do fígado (Mourelle et al., 1984). Essas alterações serão seguidas por excesso de deposição de colágeno (Rojkind et al., 1983).

Tanto as células parenquimatosas como as sinusoidais apresentam potencial de síntese para todas as proteínas da matriz extracelular. Assim, colágeno, proteoglicanos, fibronectina e laminina podem ser sintetizadas *in vitro* pelos hepatócitos, pelas células de Ito, células de Kupffer, células endoteliais e células epitéliais dos ductos biliares. No entanto, em que pese essa potencialidade fibrogênica das células hepáticas, as evidências disponíveis os estudos empregando dosagem do RNAm para colágeno e laminina, indicam que as células não parenquimatosas são as principais produtoras da matriz extracelular na fibrose hepática (Milani et al., 1989). Dentre essas, muita atenção tem sido dedicada nos últimos anos ao papel das células de Ito. Ao lado da sua participação no

metabolismo da vitamina A, essas células têm sido encaradas como fibroblastos em repouso que, com o estímulo fibrogênico, transformam-se em células transicionais e posteriormente em fibroblastos ou em miofibroblastos; como os fibroblastos, apresentam uma capacidade de produção de matriz extracelular superior às células parenquimatosas do fígado. É possível que a lesão hepática ou o próprio agente etiológico da lesão possam atuar diretamente sobre as células efectoras do processo fibrogênico (Gressner et al., 1991).

As reações do fígado à necrose são limitadas; a mais importante é a desorganização dos lóbulos hepáticos, formação de fibrose difusa e reorganização dos hepatócitos. Assim, independentemente da etiologia, o modelo histopatológico básico do fígado é semelhante. A redistribuição das células mortas e a fibrose levam à formação de nódulos que alteram a arquitetura hepática, desviando o sangue portal para a periferia, ocasionando insuficiência vascular no centro dos nódulos (zona 3). Esta se mantém persistente na cirrose, mesmo depois da causa ter sido removida. O tecido conectivo anormal deposita-se no espaço de Disse, impedindo a troca metabólica com as células hepáticas. Novos fibroblastos formam-se ao redor das células hepáticas necrosadas. A fibrose (colágeno) progride de um estado inicial reversível para um estado irreversível e a formação dos septos fibrosos é a resultante final da formação excessiva de colágeno, da redução da degradação e da granulação da matriz extracelular. Uma maior compreensão deste processo irá permitir o desenvolvimento de novos tratamentos, mas para tanto, se faz necessário o desenvolvimento de modelos experimentais de cirrose hepática (Mincis et al., 1997; Friedman et al., 1993).

1.2. Modelos experimentais

Os modelos de cirrose hepática podem variar conforme o tipo etiológico da enfermidade que se busca estudar, mas devem ter, preferencialmente, as seguintes características (Propper et al., 1978; Rubin et al., 1967):

1. imitação dos aspectos morfológicos encontrados na doença em humanos;
2. progressão gradual e discreta das alterações patológicas;
3. alta reprodutibilidade e baixa letalidade;
4. reversibilidade e irreversibilidade da fibrose desenvolvida
5. desenvolvimento de seqüelas fisiopatológicas.

Os modelos de fibrose hepática são divididos, com base nos fatores etiológicos, em tóxico, nutricional, imunológico, biliar, alcoólico e genético. Estas classes não são mutuamente exclusivas e os modelos de fibrose alérgica, por exemplo, podem ser considerados ao mesmo tempo, tóxicos, nutricionais e imunológicos (Tsukamoto et al., 1990).

Durante as últimas décadas, vários modelos experimentais de cirrose têm sido caracterizados (Bomzon et al., 1990). Dentre os modelos mais estudados estão os que utilizam a ligação crônica do ducto biliar em ratos e cães (Lee et al., 1986; Willems et al., 1986) ou a administração de agentes hepatotóxicos como o etanol (Keegan et al., 1995) e o tetracloreto de carbono (CCl_4) em ratos (Vorobioff et al., 1984; Reichen et al., 1988) que produzem dano hepático crônico, evoluindo para a cirrose.

Para a produção experimental de cirrose são necessárias repetidas doses do agente hepatotóxico, não importando a via de administração. Além disso, o intervalo

entre cada dose não deve ser muito extenso, para que não haja tempo das células lesadas se recuperarem, tornando os efeitos do agente lesivo não cumulativos (Dupin et al., 1994).

Os animais mais utilizados para o desenvolvimento de fibrose e cirrose hepática são os ratos. As vantagens de se utilizar estes animais como modelo experimental são a sua fácil manutenção, a possibilidade de se trabalhar em grupos e pelo fato do modelo de cirrose hepática nos mesmos já estar bem estabelecido.

Há várias décadas Cameron e Karunaratne (1936) descreveram um modelo de cirrose hepática em ratos utilizando o tratamento com o tetracloreto de carbono, por via subcutânea. Contudo, devido a uma grande variação na resposta ao CCl_4 , não foi possível produzir uma cirrose consistente e satisfatória (Cameron et al., 1936; Rubin et al., 1963). Além disto, foi frequentemente observado uma regressão das alterações após interromper o tratamento com CCl_4 (Moon et al., 1934; Quinn et al., 1965).

O modelo de Proctor e Chatamra (1983) é outro exemplo de cirrose hepática em modelo animal bem estabelecido. Neste modelo, o tratamento concomitante com fenobarbital e CCl_4 (por via intra gástrica) em ratos, aumentou a eficácia da indução da lesão hepática (McLean et al., 1969). Foi também introduzida a utilização das alterações do peso corporal dos animais, como parâmetro para ajustar as doses de CCl_4 (Proctor et al., 1983). Os estudos de Rozga et al. (1991) foram baseados na observação de que a estimulação com fenobarbital dependente da hidroxilação microsomal do sistema enzimático no fígado, aumenta a hepatotoxicidade do CCl_4 (McLean et al., 1966). Observaram também que a suspensão do tratamento com fenobarbital resulta, ao longo do tempo, em uma notável atrofia hepática e em reduzida capacidade do fígado de se regenerar (Rozga et al., 1991).

O mecanismo da lesão celular causada pelo CCl_4 inicia-se no retículo endoplasmático quando este composto é bioativado pelo citocromo P-450, gerando o radical livre $\cdot\text{CCl}_3$ (Koch et al., 1974; Slater, 1987) que, posteriormente, se converte no radical peróxido $\text{CCl}_3\text{O}\cdot$ (Slater, 1987).

O radical livre pode, então, se ligar covalentemente a diferentes estruturas moleculares, principalmente aos lipídios das membranas do retículo endoplasmático. Além do mais, os radicais livres podem também participar do processo de peroxidação, atacando os ácidos graxos (Munoz et al., 1988; Rao et al., 1997).

Nos hepatócitos lesados pelo CCl_4 , a síntese protéica é deficiente, refletindo em uma síntese diminuída das lipoproteínas hepáticas. Este processo leva a um acúmulo de lipídios neutros no fígado, com conseqüente infiltração lipídica (Koch et al., 1974).

1.3. COLCHICINA

Extraída da *colchicum autumnale*, este alcalóide apresenta-se como pó amarelo-pálido, hidrossolúvel, que escurece por exposição à luz (Korolkovas, 1988). Desde a antigüidade, a humanidade procura encontrar meios para aliviar a dor, a febre, a artrite e outros distúrbios similares. A colchicina foi muito provavelmente uma das primeiras drogas utilizadas para tal finalidade. Preparações com base nesta planta são usadas desde o início deste século. Foi chamada de *hermodactilo* (dedos de hermes) e *articulorum* (alma das juntas), devido ao seu efeito no alívio de dores de origem articular. Em 1763, von Störck introduziu o produto para tratamento da gota. Em 1820, os farmacêuticos franceses Pelletier e Caventou isolaram o

alcalóide. Em 1945, Dewar propôs sua estrutura química, que foi posteriormente confirmada em 1959, quando foi sintetizada pela primeira vez por van Talem e colaboradores (Korolkovas, 1988).

Mais recentemente, seus efeitos benéficos foram estabelecidos no tratamento e na prevenção de ataques da febre familiar do Mediterrâneo (Levy et al., 1997). Adicionalmente, o tratamento com colchicina tem sido experimentado com sucesso variável em várias doenças, incluindo a doença de Behçet (Tafi et al., 1987), cirrose (Kaplan et al., 1986; Kershenovich et al., 1988) esclerose sistêmica progressiva (Alarcon-Segovia et al., 1979) e amiloidose (Ravid et al., 1977; Levy et al., 1991).

Há muito tempo vem se estimulando o emprego de diversos agentes farmacológicos, com o propósito de prevenir e modificar a fibrose (Popper et al., 1978; Rojkind et al., 1979). Dentre eles, a colchicina tem mostrado ser uma droga efetiva para impedir o acúmulo do colágeno hepático (Rojkind et al., 1975).

A colchicina vem sendo utilizada para prevenir o desenvolvimento da fibrose hepática e da cirrose, tanto em nível experimental quanto clínico (Rojkind et al., 1975; Jiang et al., 1992). A colchicina pode melhorar a função hepática e diminuir o conteúdo de hidroxiprolina hepática e os níveis séricos de PIIINP no fígado de ratos com fibrose. Keshenovich e colaboradores (Kershenovich et al., 1990) demonstraram que os efeitos inibitórios da colchicina no fígado fibrótico é relacionado com suas ações em monócitos anormais e em linfócitos. Durante o curso da fibrogênese hepática, mediadores que são constantemente secretados pelas células inflamatórias estimuladas podem regular a modulação nas interações célula-célula e célula-matriz, bem como aumentar o número e a atividade dos fibroblastos nestes sítios de lesão.

A colchicina é capaz de inibir a secreção de colágeno por fibroblastos *in vitro*, por meio da quebra de microtúbulos, uma das organelas do citoesqueleto (Diegelmann et al., 1972; Ehrlich et al., 1974). Tem sido sugerido que a droga atue como hepatoprotetor por reduzir a formação dos microtúbulos citoplasmáticos, o movimento transcelular do colágeno (Ehrlich et al., 1972), estimulando a produção de collagenase em culturas de tecido sinovial (Harris et al., 1974) e exercer um efeito estabilizante nas membranas dos hepatócitos (Yahuaca et al., 1985). Ela previne e reverte cirrose hepática induzida por CCl₄ em ratos (Mourelle et al., 19981; Leoni et al., 1980), bem como inibe a síntese e a deposição de colágeno em ratos cronicamente tratados com CCl₄ (Rojkind et al., 1973). Quando administrada em pacientes cirróticos, a colchicina melhora as condições clínicas, os níveis séricos de bilirrubina e albumina, encurtando também o tempo de protrombina (Kershenobich et al., 1988).

Em seus estudos, Cedillo e colaboradores observaram que a colchicina preveniu e reverteu parcialmente os efeitos da diminuição da atividade da membrana plasmática Ca²⁺ ATPase após a intoxicação com CCl₄ (Cedillo et al., 1996). Demonstraram também que a colchicina teve um efeito benéfico sobre o fígado, preservando e restaurando parcialmente o glicogênio hepático (Cedillo et al., 1996). Além disso, demonstrou-se que a droga é capaz de prevenir o aumento de colágeno hepático em cirrose induzida por CCl₄ (Kershenobich et al., 1979; Tanner et al., 1981) ou por ligadura do ducto biliar (Poo et al., 1993) em ratos. Outros mecanismos potencialmente envolvidos nesta ação seriam o estímulo à secreção de collagenase por macrófagos (Gordon et al., 1976), inibição de mitose (Taylor et al., 1985) e a inibição da síntese de mediadores de inflamação por monócitos (Kershenobich et al., 1990).

A colchicina é rápida, mas provavelmente pouco absorvida pelo trato gastrointestinal quando da sua administração oral (Halkin et al., 1980; Wallace et al., 1973). Picos de concentração ocorrem de 0,5 a 2 horas depois da administração. A droga e os seus metabólitos sofrem extensamente a recirculação enterohepática, com a concentração plasmática de colchicina e seus metabólitos declinando de 1 a 2 horas após a ingestão e aumentando após isso (Walaszek et al., 1960). A colchicina fica concentrada nos glóbulos brancos (Wallace et al., 1973) e é também distribuída nos rins, fígado, baço, e tubo digestivo. A colchicina parece não se concentrar no coração, músculo esquelético ou cérebro. Seu volume de distribuição é de cerca de 21 Kg^{-1} (Halkin et al., 1980).

Pela administração intravenosa, a meia vida plasmática da droga pode alcançar entre 10 e 60 minutos, sendo por mais tempo na insuficiência renal (Halkin et al., 1980; Wallace et al., 1970).

A colchicina é em parte desacetilada e desmetilada no fígado e é lentamente metabolizada em outros tecidos. Entre 5 e 50 % da dose intravenosa é eliminada na bile dentro de 48 horas. Em várias espécies, o maior componente da droga na bile tem sido demonstrado como sendo colchicina inalterada, com variáveis percentagens de desmetil colchicina, desmetil colchicina glucoronida, e metabólitos polares não específicos (Hunter et al., 1975). Depois da circulação enterohepática, a maioria da droga absorvida é excretada como metabólito inativo nas fezes, mas no indivíduo normal, uma fração de 10 a 20 % é excretada inalterada na urina (Walaszek et al., 1960; Tarnavska et al., 1979).

Estudos em animais têm indicado que a secreção biliar ativa da colchicina e dos seus metabólitos é a maior rota de eliminação, mas a importância desta via para

a disposição total da colchicina varia muito entre as diferentes espécies (Hunter et al., 1975).

A excreção biliar ativa da colchicina e, em um menor grau, sua excreção urinária são consideradas as principais via de eliminação (Sabouraud et al., 1992). Em ratos, a disposição de compostos originados diretamente do sistema biliar e dos rins tem sido recentemente avaliados e relatados para aproximadamente 30 e 16%, respectivamente do total do *clearance* da colchicina (Speeg et al., 1992; Speeg et al., 1992).

1.4. CITOCROMO P450

Os citocromos P450 constituem uma família de hemoproteínas, localizadas na membrana do retículo endoplasmático (Colin et al., 1992). São classificados, com base na sequência homóloga de aminoácidos, em famílias designadas por números arábicos (ex.: CYP 1, CYP 2...) e subfamílias designadas por letras maiúsculas (ex.: CYP 2A, CYP 2B...). Membros de diferentes famílias do citocromo têm menos de 35% de semelhança entre as sequências de aminoácidos; porém, aqueles de diferentes subfamílias possuem entre 35% a 65% de semelhança. Componentes individuais de uma subfamília têm mais de 65% de semelhança e são estas designadas por números arábicos (ex.: CYP 2A1, CYP 2A2...) (Nebert et al., 1991).

Os citocromos P450 estão envolvidos no metabolismo oxidativo de esteróides, ácidos graxos, prostaglandinas, leucotrienos, aminas biogênicas (compostos endógenos), drogas e carcinogênicos químicos (compostos exógenos). Representam a clássica "fase 1" do metabolismo, onde o substrato é oxigenado

(Nerbert et al., 1987). As reações de oxidação requerem a hemoproteína do citocromo P450, a NADPH citocromo P450 redutase, o NADPH e o oxigênio molecular (Nerbert et al., 1987). O substrato xenobiótico reage com a forma oxidada (Fe^{3+}) do citocromo P450 para formar um complexo enzima-substrato. A citocromo P450 redutase aceita um elétron do NADPH que, por sua vez, reduz o complexo oxidado citocromo P450-xenobiótico; este, por sua vez, reage com o oxigênio molecular e com um outro elétron do NADPH, doado por meio da mesma flavoproteína redutase, para formar um oxigênio ativado. Nas etapas finais desta reação, um átomo de oxigênio é liberado como H_2O e outro é transferido para o substrato. As biotransformações oxidantes, catalisadas pelas monooxigenases do citocromo P450, incluem a hidroxilação da cadeia aromática bilateral, a N-oxidação, a sulfoxidação, a N-hidroxilação, a desaminação, a desalogenização e a dissulfuração. Inúmeras reações redutoras também são catalisadas por enzimas do citocromo P450, geralmente, em condições de baixa tensão de oxigênio (Nebert et al., 1987).

No fígado humano, foram identificados pelo menos 12 enzimas do sistema citocromo P450 (Nebert et al., 1991), sendo que cada uma delas é codificada por um único gene (Watkins, 1990). Cada enzima do citocromo P450 possui um único sítio de ligação com o substrato e um mesmo citocromo P450 pode metabolizar várias drogas. Isto pode gerar competição entre duas ou mais drogas para a oxidação pela mesma enzima, o que pode diminuir o metabolismo de um dos agentes (Murray, 1992). Os membros das famílias CYP 1, 2 e 3 são os predominantemente envolvidos com o metabolismo de drogas no homem e sua expressão é modulada por hormônios, citocinas, fatores genéticos, bem como pode ser afetada por diferentes doenças (George et al., 1995). O CCl_4 é metabolizado no retículo

endoplasmático sendo bioativado pelo citocromo P-450, gerando o radical livre $\bullet\text{CCl}_3$ (Koch et al., 1974; Slater, 1987) que, posteriormente, se converte no radical peróxido $\text{CCl}_3\text{O}\bullet$ (Slater, 1987).

Em 1997, Tateishi e colaboradores fizeram a identificação do citocromo P450 3A4 (CYP3A4) como sendo a principal enzima responsável pela biotransformação da colchicina (Tateishi et al., 1997).

1.5. Verde de indocianina

A determinação do *clearance* hepático de uma variedade de xenobióticos tem sido utilizado para avaliar o metabolismo de drogas, medir a perfusão hepática, determinar o prognóstico de diversas doenças do fígado, bem como verificar a resposta ao tratamento (Jurg Reichen, 1995).

O verde de indocianina (*cardio green* ou *Fox green*) é uma tintura tricarbocianina, a primeira desenvolvida para uso em emulsão colorida. Por causa do espectro de absorção característico, esta propriedade fisiológica foi minuciosamente investigada e isto tem sido extensivamente utilizado como um indicador em técnicas de diluição de tintura para a medida do rendimento cardíaco (Fox et al., 1957; Fox & Woody, 1957; Merriman et al., 1958). Wheeler Cranston e Meltzer (1958) mostraram que, em injeções intravenosas em cães, a tintura se liga à albumina e é rapidamente distribuída no plasma circulante.

O verde de indocianina é excretado inalterado na bile (Cherrick et al., 1960). A determinação de seu *clearance* sistêmico tem sido utilizada há muitos anos como um teste de função hepática (Brody & Leicher, 1979). Devido à sua média de

extração elevada, pode ser utilizado como um marcador de fluxo hepático (Caesar et al., 1961). Sua extração média encontra-se diminuída em pacientes com cirrose hepática (Skak & Keideng, 1987).

Medidas da taxa de retenção plasmática do verde de indocianina (ICG) em 15 minutos, da taxa de desaparecimento plasmático (Leevy et al., 1967; Leevy et al., 1979), ou a taxa de remoção máxima (R_{max}) do ICG (Paumgartner et al., 1970; Martin et al., 1976) obtidos depois de uma administração intravenosa, tem sido utilizada para avaliar a função hepática. Em adição, o ICG é utilizado também para medida de fluxo sanguíneo hepático, calculado da razão hepática de extração obtida com o uso do método de infusão constante (Caesar et al., 1961).

A toxicidade do ICG em animais é relativamente baixa. Nenhum efeito significativo foi encontrado em humanos com altas doses, da ordem de 5 mg/Kg de peso corporal (Paumgartner et al., 1975).

Depois da injeção i.v., o ICG é rápida e completamente ligado às proteínas plasmáticas. Um estudos demonstrou que, em cães, 90% do ICG e no soro em humano 80% estão ligados às globulinas (Baker et al., 1966).

O ICG é eliminado do sangue quase que exclusivamente pelo fígado. A captação do ICG por tecidos periféricos, rins ou pulmões é insignificante (Cherrick et al., 1959; Leevy et al., 1963; Rapaport et al., 1959; Reubi et al., 1966) e nenhuma excreção pelos rins pôde ser demonstrada (Cherrick et al., 1960; Hunton et al., 1960; Ketterer et al., 1959; Leevy et al., 1963; Rapaport et al., 1959).

O ICG pode ser determinado em fluidos biológicos por espectrofotometria direta, ou depois da precipitação das proteínas utilizando-se acetona (Gudowski et al., 1967; Porstmann et al., 1965). Em virtude do fato que a absorção máxima do ICG no soro ou plasma ocorre na faixa de 795 a 805nm, a influência da hemoglobina

ou da bilirrubina na sua leitura óptica é pequena. Isto tem facilitado o registro das curvas de desaparecimento de todo ICG sangüíneo pelo uso de um autoanalisador (Begon et al., 1965).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- I. avaliar a viabilidade do desenvolvimento do modelo de produção de cirrose hepática em animais de médio porte, como o coelho;
- II. avaliar o efeito da administração de colchicina em coelhos que foram submetidos a fibrose quimicamente induzida.

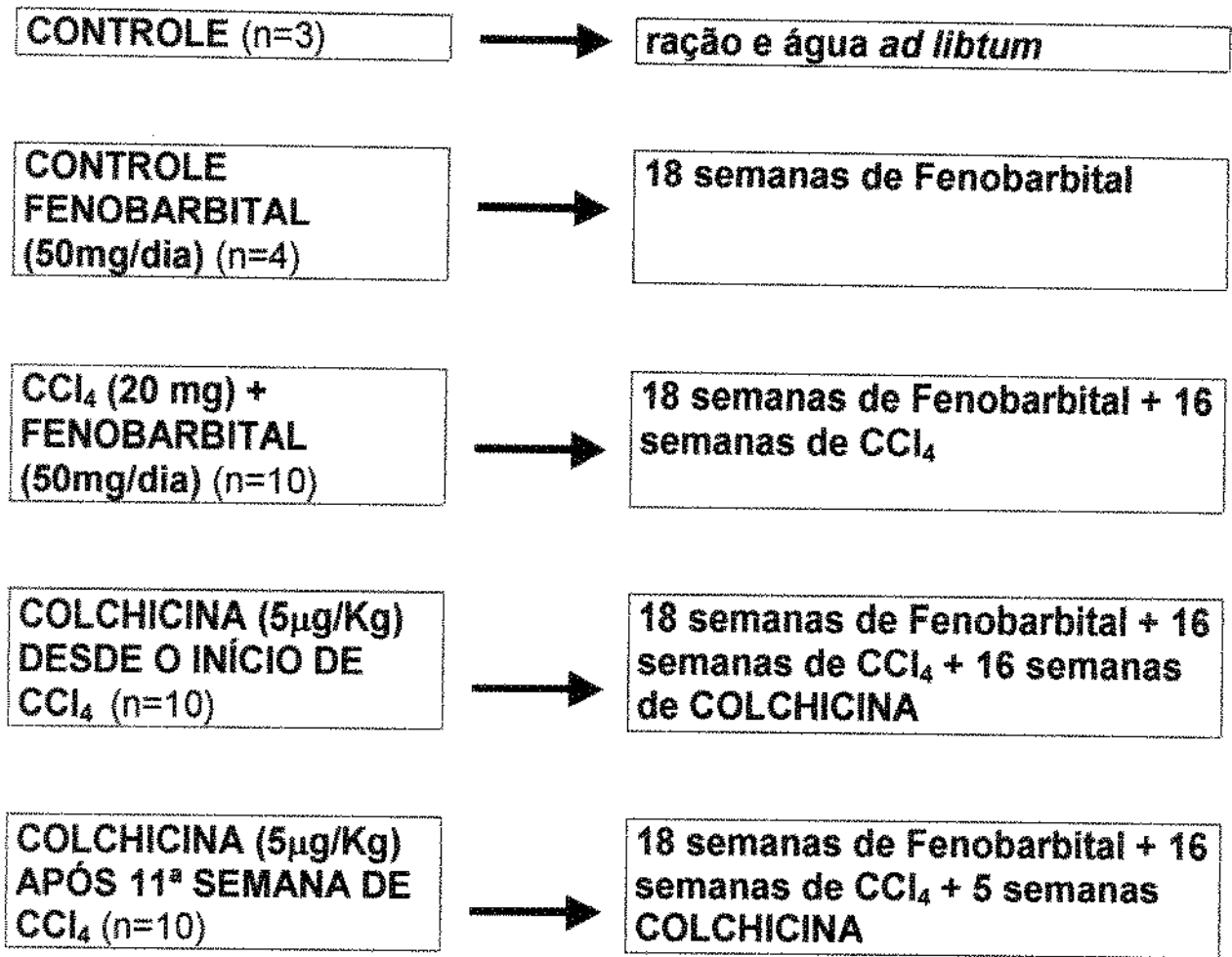
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 37 coelhos machos, da raça New Zealand, com idade de aproximadamente de 100 dias e com peso inicial de $2,73 \pm 0,05$ Kg. Os animais receberam água e ração *ad libitum* ao longo de todo o período de experimentação. A ração fornecida foi constituída de farelo de feno de gramíneas, milho, farelo de arroz solvente, sorgo, farelo de arroz cru, farelo de casca de arroz, farelo de soja, farelo de glúten de milho, caulium, carbonato de cálcio, melão líquido, sal, premix mineral e vitamínico e fosfato bicálcio.

Os animais foram divididos em 5 grupos conforme apresentado no quadro I. Os grupos foram denominados: controle, controle fenobarbital, CCl_4 + fenobarbital (os animais que somente sofreram lesão hepática), sendo que os animais receberam tratamentos diários de colchicina em tempos diferentes do tratamento. (Quadro I).

Quadro I: Esquemas da constituição dos grupos de estudo.



3.2. Modelo de desenvolvimento de cirrose em coelhos.

3.2.1. Indução do metabolismo hepático pela administração de fenobarbital p.o.

Após período de adaptação (7 dias), os animais receberam fenobarbital p.o. adicionado à água de beber (concentração: 167 mg/l). Levando-se em consideração a ingestão diária média estimada de água, esta solução deve fornecer aproximadamente 50 mg de fenobarbital por animal.

3.2.2. Administração de CCl₄

Catorze dias após o início do tratamento com fenobarbital os animais começaram a receber semanalmente o CCl₄ na dose inicial de 0.2 ml de solução de CCl₄ diluída em óleo de milho a 10%. Esta solução foi administrada por via intragástrica, sendo a dose ajustada de acordo com controles bioquímicos indicativos de lesão hepática (aspartato aminotransferase [AST] e alanina aminotransferase [ALT]). Neste ajuste da dose visou-se manter os níveis plasmáticos destas enzimas entre 400 e 800 UI/dl.

Ao final do período de estudo de 18 semanas os animais foram sedados com sagatal® e sacrificados com uma injeção de ar *i.v.*, (levando a morte por embolia gasosa). Após exposição do fígado, foram retirados 3 fragmentos de cada lobo hepático para análise histopatológica.

3.2.3. Administração de colchicina

A colchicina foi administrada por via intragástrica em dois grupos de animais, em doses diárias de 5µg por Kg de peso por animal durante 5 dias da semana. O primeiro grupo de animais iniciou o tratamento com a colchicina a partir da 12ª semana de CCl₄ e o segundo grupo recebeu a droga desde o início do tratamento com CCl₄.

3.2.4. Controle semanal de Peso corporal dos animais

Além dos controles bioquímicos, os animais foram pesados semanalmente, antes de cada experimento, sempre no mesmo horário e pela mesma pessoa.

3.2.5. Dosagens bioquímicas

Amostras de sangue foram coletadas antes do início da administração de fenobarbital, anteriormente ao tratamento com CCl_4 e a partir deste, 24 h após cada administração, para dosagem de aminotransferases (AST e ALT), bilirrubinas (total e indireta), gama glutamil transpeptidase (γ -GT) e albumina. As dosagens foram feitas automaticamente em analisador automático marca Cobas modelo *Mira plus* (Roche, Suíça).

3.3. Determinação da taxa de depuração plasmática do verde de indocianina

Para avaliar os efeitos do tratamento com fenobarbital e CCl_4 sobre o fluxo sanguíneo hepático, foram determinadas as velocidades de depuração do verde de indocianina antes do começo e no final do tratamento. Os animais receberam uma injeção i.v. de verde de indocianina (Sigma Chem. Co, EUA; aproximadamente 8 mg/kg em solução salina). Amostras de sangue (3 ml) foram coletadas em tubos contendo EDTA nos tempos 0, 2, 4, 8, 15, 20 e 30 min. As amostras de sangue foram centrifugadas (2000 g, 4 min) e o plasma separado e congelado a -20°C . As concentrações plasmáticas de verde de indocianina foram determinadas por espectrofotometria a 800 nm.

Foram construídas as curvas de concentração plasmática em função do tempo, e a partir destas curvas foi derivado o parâmetro farmacocinético da taxa de depuração plasmática (Cl).

3.4. O trabalho foi aprovado pelo comitê de pesquisa da Universidade São Francisco.

3.5. Análise histopatológica

Os animais foram sacrificados e foram retirados fragmentos do fígado que foram conservados em solução de formalina a 10%.

Após a fixação das amostras, foram feitos cortes histológicos, onde foram realizados os seguintes procedimentos: 1) desidratação da amostra; 2) clarificação da amostra 3) impregnação da amostra; 4) microtomia.

Após a realização do corte histológico, as lâminas foram coradas com tricromio de Masson e hematoxilina e eosina.

As análises histopatológicas das lâminas foram feitas utilizando-se o sistema semi-quantitativo de Scheuer (Scheuer et al, 1991), onde as diferentes alterações hepáticas foram graduadas de 0 a 4 conforme expressa o quadro II. As análises histopatológicas foram feitas pelo mesmo patologista, que desconhecia a procedência da amostra analisada em relação aos diferentes grupos de estudo.

Quadro II: Sistema semi-quantitativo de Scheuer para análise histopatológica do fígado.

Grau	Atividade portal/perportal	Atividade lobular	Fibrose
0	Nenhuma ou mínima inflamação portal	nenhuma	nenhuma
1	Inflamação portal	Inflamação sem necrose	Trato portal fibrótico aumentado
2	Necrose leve	Necrose focal ou corpos acidófilos	Periportal ou septo porta-portal, mas com a arquitetura intacta
3	Necrose moderada	Lesão celular focal severa	Fibrose com desorganização da arquitetura, mas sem cirrose
4	Necrose abundante	Lesão incluindo pontes de necrose	Cirrose provável ou definida

3.6. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão das médias (EPM) de n experimentos. Diferenças estatísticas significantes foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA), teste t de Student não pareado, teste de Tukey para comparações múltiplas e teste do Qui-Quadrado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados indicativos de diferença estatística significativa.

4. RESULTADOS

4.1. EFEITO DO TRATAMENTO COM CCl_4 SOBRE A MORTALIDADE E O GANHO PONDERAL

4.1.1. Mortalidade

Dos trinta e sete animais utilizados nesta pesquisa, trinta e quatro completaram o período de estudo de 18 semanas de tratamento de fenobarbital associadas a de 16 semanas de CCl_4 , com posterior análise histológica. Três animais morreram devido a causas não relacionadas com o experimento; em 2 animais, houve a quebra de uma das patas inferiores e em um terceiro animal observaram-se alterações na musculatura do pescoço, de causa também desconhecida.

Os 3 animais mortos pertenciam aos grupos tratados (grupo CCl_4 e os 2 grupos tratados com CCl_4 e colchicina), sendo um animal de cada grupo.

4.1.2. Ganho ponderal

Como mostrado na figura 1, a administração do CCl_4 aos coelhos impediu o ganho de peso corporal durante as 18 semanas do tratamento completo para indução da cirrose hepática. Ao contrário, tanto nos animais controles (que não receberam qualquer tipo de droga) como nos animais que só receberam o fenobarbital (controle do fenobarbital) foi observado ganho ponderal significativo ($p < 0.05$) quando comparado com o seus pesos iniciais (figura 1).

De maneira semelhante aos animais controles, os animais que receberam o tratamento com a colchicina desde o início ou após onze semanas de administração do CCl₄ apresentaram ganho de peso significativo ao final de 19 semanas (figura 1).

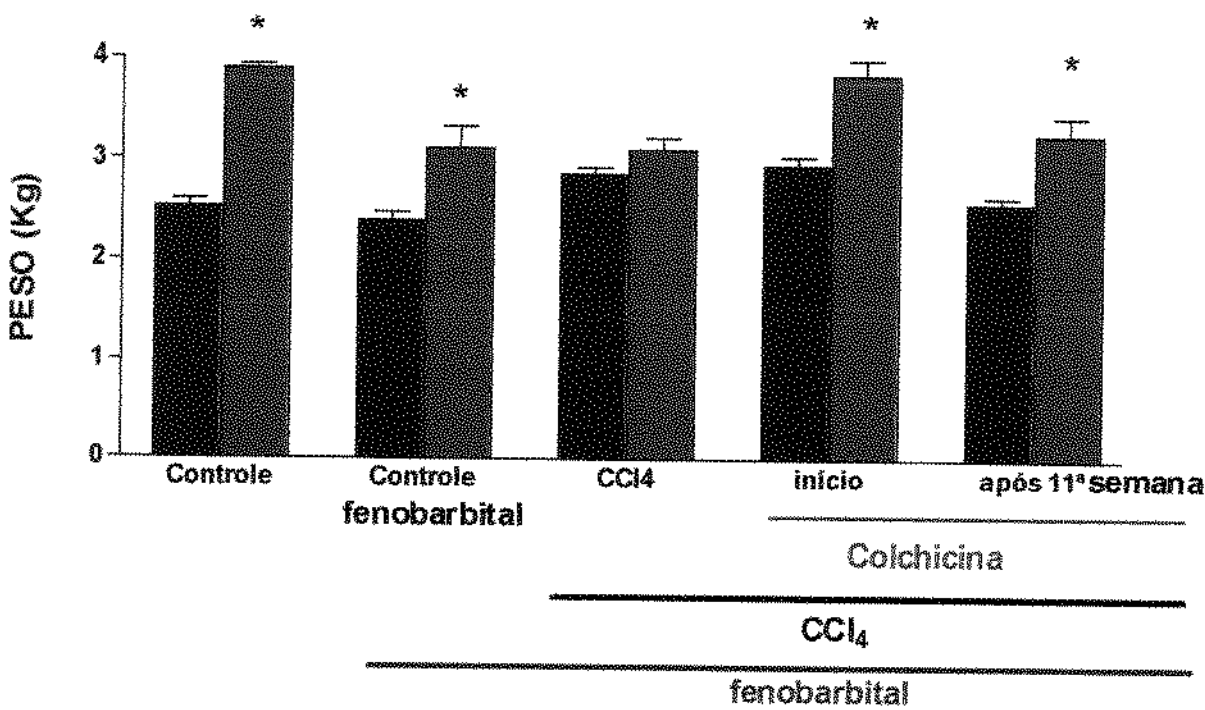


Figura 1. Peso corporal dos animais de diferentes grupos, obtidos antes (colunas azuis) e após 18 semanas de tratamento total (colunas vermelhas). O grupo controle (n=3) não recebeu qualquer tipo de droga, enquanto o controle fenobarbital (n=4) recebeu esta droga (50mg/dia) por 18 semanas. No grupo CCl₄ (n=10) a droga (20 mg/semana) foi administrada por 16 semanas. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de n animais. * $p < 0,05$ comparando-se com o basal do mesmo grupo.

4.2. Resultados laboratoriais

Os resultados dos testes bioquímicos (Tabela 1) mostram que o tratamento com o CCl_4 provocou um aumento significativo ($p < 0,01$) nos níveis séricos das enzimas aspartato aminotransferase [AST] e alanina aminotransferase [ALT] quando comparado com as dosagens basais destes animais. Do mesmo modo, as dosagens séricas da gama glutamil transpeptidase (γ -GT) e da bilirrubina total mostraram um aumento de 65% e 146%, respectivamente, após tratamento com o CCl_4 (Tabela 1). Nos coelhos controles não foi observada nenhuma alteração significativa entre as dosagens bioquímicas basais e finais (Tabela 1).

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que não houve alteração nos níveis séricos finais da proteína total e da albumina nos animais dos grupos não tratados ou tratados com o CCl_4 , em relação às dosagens basais.

Quando comparados os níveis séricos basais e finais dos coelhos que receberam somente o fenobarbital durante o período de 18 semanas (controle fenobarbital) não foram observadas qualquer alteração significativa nas dosagens bioquímicas das enzimas AST e ALT ($38,750 \pm 7,660$ e $38,250 \pm 7,320$; $76,25 \pm 13,590$ e $73,750 \pm 17,75$, respectivamente). O mesmo ocorreu em relação ao γ -GT e à bilirrubina total ($7,25 \pm 2,50$ e $6,50 \pm 1,85$; $0,05 \pm 0,02$ e $0,09 \pm 0,05$, respectivamente)., assim como com a proteína total e albumina ($6,45 \pm 0,350$ e $6,90 \pm 0,11$; $4,3 \pm 0,080$ e $4,68 \pm 0,24$, respectivamente).

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos em coelhos controles e animais tratados com CCl_4 .

	CONTROLES		ANIMAIS TRATADOS COM CCl_4		P
	BASAL	FINAL	BASAL	FINAL	
ALT (U/l)	$77 \pm 17,15$	$74,67 \pm 6,02$	$62,60 \pm 5,80$	$1450 \pm 419 *$	$p < 0,01$
AST (U/l)	$25,67 \pm 9,87$	$24,50 \pm 5,58$	$39,80 \pm 4,80$	$2488,30 \pm 641,20 *$	$p < 0,01$
BILIRRUBINA TOTAL (mg/dl)	$0,07 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,04$	$0,13 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,05 *$	$p > 0,05$
γ -GT (U/l)	$7 \pm 1,51$	$6,30 \pm 1,00$	$8,10 \pm 1,10$	$62,80 \pm 12,10 *$	$p < 0,01$
ALBUMINA (g/dl)	$4,43 \pm 0,34$	$4,17 \pm 0,07$	$4,50 \pm 0,10$	$4,20 \pm 0,20$	$p > 0,05$
PROTEÍNA TOTAL (g/dl)	$6,53 \pm 0,52$	$6,67 \pm 0,20$	$6,50 \pm 0,10$	$6,50 \pm 0,20$	$p > 0,05$

AST – aspartato aminotransferase, ALT – alanina aminotransferase, γ -GT – gamma glutamil transpeptidase. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 7 controles e 10 coelhos tratados. * $p < 0,05$ comparando-se com o basal do mesmo grupo.

4.3. EFEITO DO TRATAMENTO COM A COLCHICINA

4.3.1. Dosagens bioquímicas

A Figura 2 mostra que tanto os coelhos que receberam tratamento com a colchicina ao longo da administração do CCl₄ como os que receberam este tratamento após a décima primeira semana apresentaram níveis séricos das enzimas ALT e AST superiores aos respectivos níveis basais. Estes resultados são semelhantes aos observados nos animais tratados com o CCl₄ e que não receberam a colchicina (Figura 2).

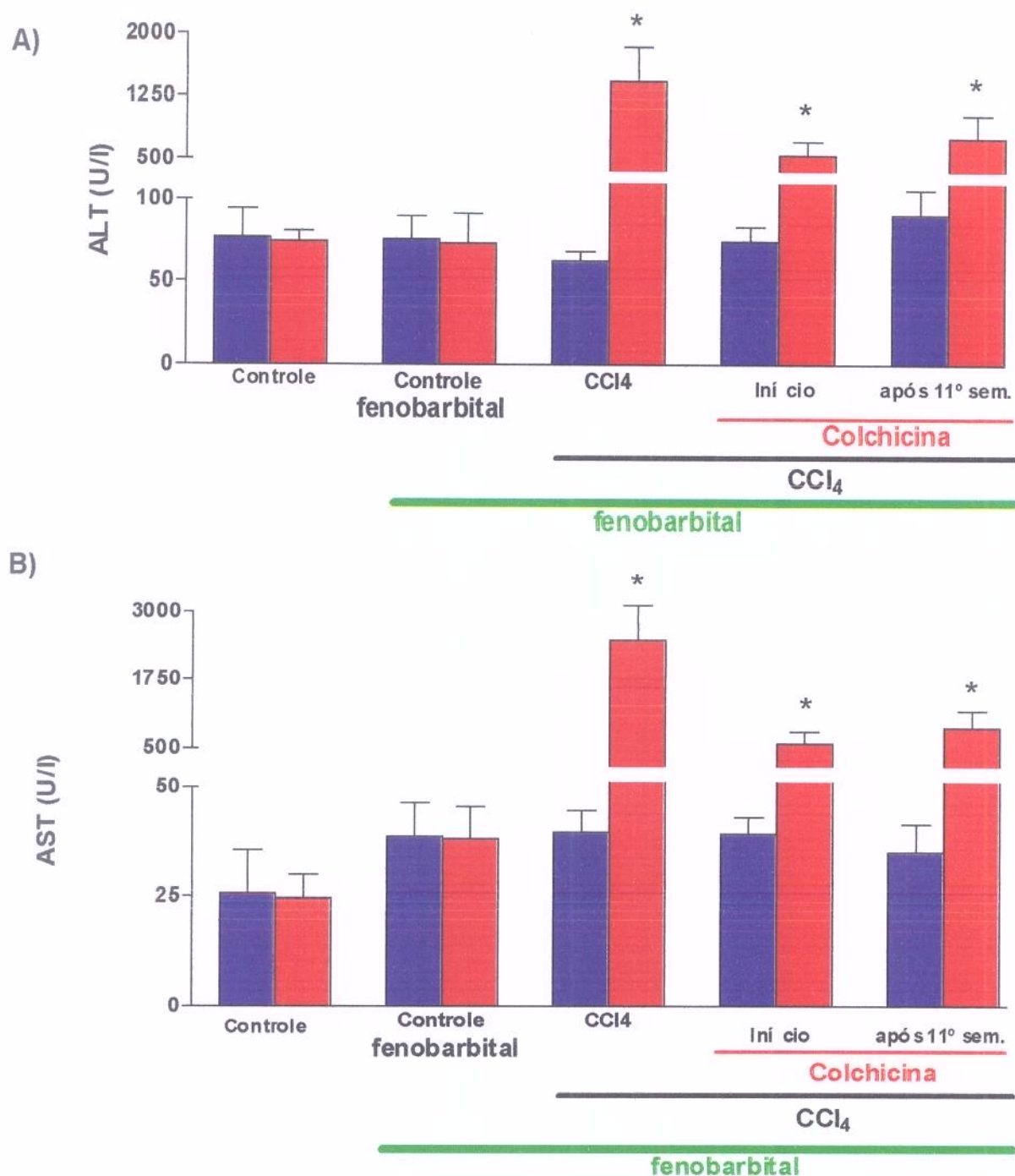


Figura 2. Concentrações séricas de alanina aminotransferase (ALT, gráfico A) e aspartato aminotransferase (AST, gráfico B) dos animais de diferentes grupos, obtidos antes (colunas azuis) e após 18 semanas de tratamento total (colunas vermelhas). O grupo controle (n=3) não recebeu qualquer tipo de droga, enquanto o controle fenobarbital (n=4) recebeu esta droga (50mg/dia) por 18 semanas. O CCl₄ (20 mg/semana; n=10) foi administrado após o período de 2 semanas de administração do fenobarbital (50mg/dia). Alguns animais receberam colchicina (5µg/Kg/dia) desde o início do tratamento com CCl₄ (n=10) e outros após a 11ª semana (n=10). Os resultados representam a média ± EPM de n animais. * p<0,05 comparando-se com o basal do mesmo grupo.

As duas diferentes formas de tratamento com a colchicina também não alteraram significativamente os níveis de bilirrubina sérica (Figura 3).

Com relação à γ -GT, observou-se que a administração da colchicina desde o início do tratamento com CCl_4 foi capaz de evitar alterações significativas nos níveis séricos desta enzima, de maneira semelhante ao observado anteriormente com o grupo controle (Figura 3). No entanto, se o tratamento com a colchicina inicia-se após 11 semanas, os resultados das dosagens de γ -GT são semelhantes aos do grupo tratado somente com o CCl_4 , (Figura 3).

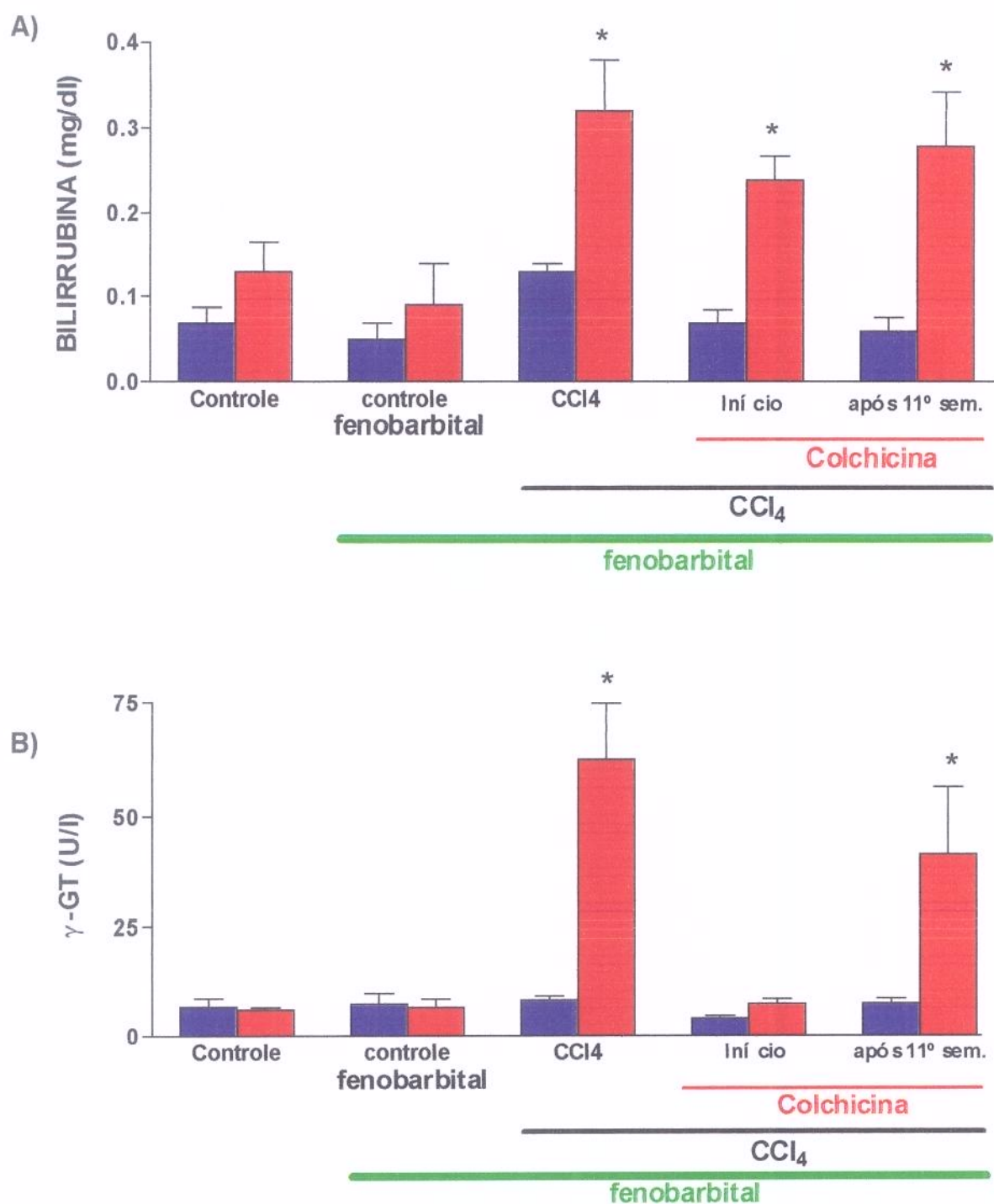


Figura 3. Níveis séricos de bilirrubina total (A) e de gama glutamil transpeptidase (B) dos animais de diferentes grupos, obtidos antes (colunas azuis) e após 18 semanas de tratamento total (colunas vermelhas). O grupo controle (n=3) não recebeu qualquer tipo de droga, enquanto o controle fenobarbital (n=4) recebeu esta droga (50mg/dia) por 18 semanas. O CCl₄ (20 mg/semana; n=10) foi administrado após o período de 2 semanas de administração do fenobarbital (50mg/dia). Alguns animais receberam colchicina (5μg/Kg/dia) desde o início do tratamento com CCl₄ (n=10) e outros após a 11ª semana (n=10). Os resultados representam a média ± EPM de n animais. * p<0,05 comparando-se com o basal do mesmo grupo.

As concentrações séricas de proteínas totais não apresentaram diferenças significativas entre os níveis basais ou finais (após as 18 semanas de tratamento total), tanto nos animais que receberam somente o CCl_4 como naqueles submetidos ao tratamento com a colchicina desde o início ou após a décima primeira semana (Figura 4). Com relação as dosagens de albumina, não foram também observadas diferenças significativas no soro dos animais dos diferentes grupos (Figura 4). tratados.

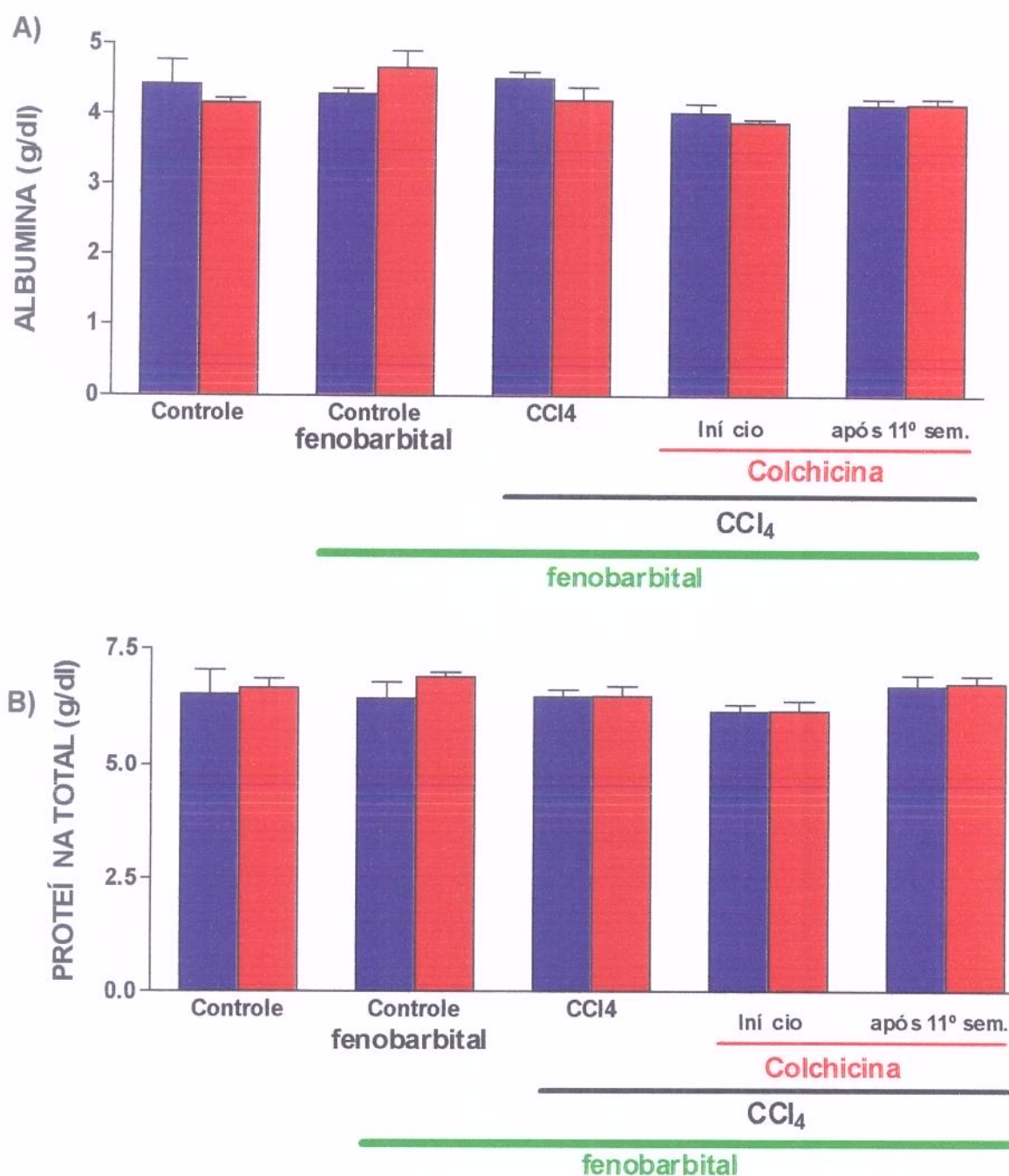


Figura 4. Concentrações séricas de albumina (A) e proteína total (B) dos animais de diferentes grupos, obtidas antes (colunas azuis) e após 18 semanas de tratamento total (colunas vermelhas). O grupo controle (n=3) não recebeu qualquer tipo de droga, enquanto o controle fenobarbital (n=4) recebeu esta droga (50mg/dia) por 18 semanas. O CCl₄ (20 mg/semana; n=10) foi administrado após o período de 2 semanas de administração do fenobarbital (50mg/dia). Alguns animais receberam colchicina (5µg/Kg/dia) desde o início do tratamento com CCl₄ (n=10) e outros após a 11ª semana (n=10). Os resultados representam a média ± EPM de n animais. * p<0,05 comparando-se com o basal do mesmo grupo.

4.3.2. Clearance do verde de indocianina

A taxa do desaparecimento plasmático do verde de indocianina após a administração intravenosa da droga (8 mg/kg/coelho) mostrou resultados semelhantes nos animais controles, quando verificados antes e após o período de 18 semanas (Figura 5). No entanto, o tratamento dos animais com o CCl_4 foi capaz de provocar uma diminuição do *clearance* do verde de indocianina. Este efeito foi significativamente revertido pelo tratamento com a colchicina desde o início, mas não quando esta foi administrada somente após a décima primeira semana (Figura 5).

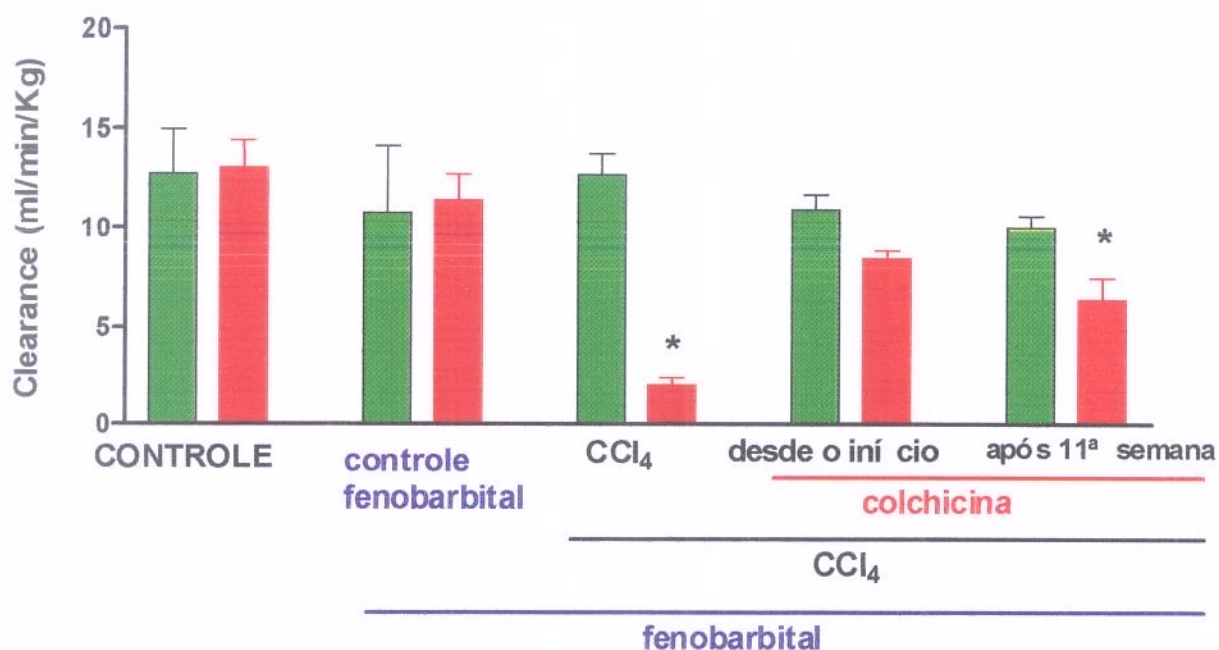


Figura 5. Efeito do tratamento com a colchicina nos animais tratados com CCl_4 : sobre os parâmetros farmacocinéticos do *clearance* do verde de indocianina. A determinação foi feita no início (colunas verdes) e após 18 semanas (colunas vermelhas) do tratamento total. O grupo controle (n=3) não recebeu qualquer tipo de droga, enquanto o controle fenobarbital (n=4) recebeu esta droga (50mg/dia) por 18 semanas. No grupo CCl_4 (n=10) a droga (20mg/semana) foi administrada por 16 semanas. Neste grupo, alguns animais receberam colchicina (5µg/Kg/dia) desde o início do tratamento com CCl_4 (n=10) e outros após a 11ª semana (n=10). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de n animais. * $p < 0,05$ comparando-se com o basal do mesmo grupo.

4.3.3.ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados das análises histopatológicas dos fígados dos coelhos submetidos ao tratamento com CCl₄. Do número total composto de dez animais, oito apresentaram cirrose hepática, um fibrose e em outro foi detectada esteatohepatite.

No grupo de coelhos nos quais a colchicina foi administrada após a 11ª semana de tratamento com o CCl₄ ocorreu a formação de cirrose hepática em 20% dos animais tratados, enquanto que nos outros 80% encontrou-se um quadro de fibrose (Tabela 3). No entanto, quando os animais foram tratados com a colchicina desde o início observou-se uma ausência de formação de cirrose, sendo que 20% dos animais apresentaram estudo histológico normal (Tabela 4). Além disto houve uma diminuição de 62% na formação de fibrose. Neste mesmo grupo o quadro histológico encontrado em 30% dos coelhos foi de hepatite, sendo que 10% dos animais apresentaram hepatite acompanhada de fibrose (Tabela 4).

Tabela 2. Resultados das análises histopatológicas dos fígados dos coelhos submetidos ao tratamento com CCl₄. Os números entre parênteses indicam o grau de lesão pela escala de Scheuer.

Animal N°	INFLAMAÇÃO	FIBROSE	Diagnóstico
1	Inflamação (+)	c. septos espessos (4)	CIRROSE HEPÁTICA
2	Esteatose (++) Inflamação (+)	0	ESTEATO HEPATITE
3	Esteatose (++) Inflamação (+)	c. septos delgados (4)	CIRROSE HEPÁTICA
4	Esteatose (++) Inflamação (++) inflamação aguda (+)	c. septos delgados (4)	CIRROSE HEPÁTICA
5	Esteatose (++) Inflamação (+)	c. septos espessos (4)	CIRROSE HEPÁTICA
6	Esteatose (++) Necrose (+++) inflamação (+)	c. septos espessos (4)	CIRROSE HEPÁTICA
7	Esteatose (+) Inflamação (+)	fibrose leve (1)	FIBROSE
8	Esteatose (+) Necrose (+) inflamação (++)	c. septos espessos (4)	CIRROSE HEPÁTICA
9	Esteatose (++) Necrose (+++) inflamação (+)	c. septos espessos (4)	CIRROSE HEPÁTICA
10	Esteatose (++) Necrose (+) inflamação (+)	c. septos espessos (4)	CIRROSE HEPÁTICA

Tabela 3. Resultados das análises histopatológicas dos fígados dos coelhos submetidos ao tratamento com CCl₄ e colchicina após a 11ª semana de administração do CCl₄. Os números entre parênteses indicam o grau de lesão pela escala de Scheuer.

Animal Nº	INFLAMAÇÃO	FIBROSE	Diagnóstico
1	Esteatose (+) Necrose (+) Inflamação (+)	c. septos espessos (4)	CIRROSE HEPÁTICA
2	Esteatose (+) Necrose (++) Inflamação (+)	fibrose definida (3)	FIBROSE
3	Esteatose (++) Necrose (+) Inflamação (+)	fibrose definida (3)	FIBROSE
4	Esteatose (++) Inflamação (+)	fibrose leve (1)	FIBROSE
5	Esteatose (+) Inflamação crônica (+)	fibrose definida (3)	FIBROSE
6	Esteatose (+) Inflamação (+)	C. Septos espessos (4)	CIRROSE HEPÁTICA
7	Inflamação (+)	fibrose leve (1)	FIBROSE
8	Inflamação (+)	fibrose leve (2)	FIBROSE
9	Inflamação (++)	fibrose leve (2)	FIBROSE
10	Inflamação (++)	fibrose leve (2)	FIBROSE

Tabela 4. Resultados das análises histopatológicas dos fígados dos r submetidos ao tratamento com CCl₄ e colchicina desde o início da administração de CCl₄. Os números entre parênteses indicam o grau de lesão pela escala de Scheuer.

Animal Nº	INFLAMAÇÃO	FIBROSE	Diagnóstico
1	Inflamação (+)	fibrose leve (2)	HEPATITE + FIBROSE
2	Normal	0	NORMAL
3	Esteatose (+) Necrose (+++) Inflamação (+)	fibrose definida (3)	FIBROSE
4	Inflamação (++)	fibrose leve (2)	FIBROSE
5	Normal	0	
6	Inflamação (+)	fibrose leve (2)	FIBROSE
7	Inflamação (+)	0	HEPATITE
8	Inflamação (+)	fibrose leve (1)	HEPATITE
9	Inflamação crônica (++)	fibrose leve (1)	FIBROSE
10	Inflamação (+)	fibrose leve (2)	FIBROSE

5. Discussão:

A indução de cirrose hepática por CCl_4 é um modelo experimental largamente utilizado para o estudo de fibrose hepática, por reproduzir muitas das alterações no metabolismo do colágeno, de forma semelhante às alterações descritas no homem (Perez-Tamoyo et al., 1983; Tsukamoto et al., 1970).

Em 1983, Proctor e Chatamra estabeleceram um modelo de cirrose hepática em ratos. Em seu estudo, que consistiu em tratamentos concomitantes de fenobarbital e CCl_4 (por via intra gástrica), foi utilizada a variação do peso corporal dos animais como parâmetro para o ajuste as doses de CCl_4 (Proctor et al., 1983). Neste estudo, nós adaptamos para coelhos o modelo de cirrose hepática desenvolvido por Proctor e Chatamra.

Ao contrário do observado por Proctor e Chatamra, com relação à perda do peso corporal em ratos, os nossos resultados sugerem que não é possível dose de CCl_4 pela mesma variável, quando coelhos são utilizados como modelo experimental (Figura 1), pois nos grupos tratados não houve variação de peso corporal significativa. Assim, adotamos os níveis séricos das aminotransferases (AST e ALT) para o ajuste da dose semanal de CCl_4 . As doses de CCl_4 foram adaptadas visando manter os níveis séricos das aminotransferases dentro dos limites de 400 e 800 U/l. As dosagens séricas destas enzimas mostraram ser melhores indicadores de lesão hepática, quando comparadas com outros indicadores, possibilitando a manutenção dos animais por todo o período de tratamento (18 semanas) com formação de uma cirrose consistente. Os níveis de AST e ALT elevados, mesmo com o uso de colchicina, indicam a não atuação da mesma na inibição da lesão celular.

Nossos resultados concordam com os dados de Ugazio e colaboradores (1995), a respeito da ausência de ascite nos animais que desenvolveram cirrose.

A γ -GT sérica mostrou um padrão semelhante de evolução no grupo tratado com colchicina desde o início quando comparado com o controle (Figura 3; Tabela 1).

A bilirrubina total apresentou alteração quando comparada com a dosagem basal dos mesmos grupos, em todos os grupos estudados. Já os níveis séricos de proteína total e albumina não apresentaram alterações significativas, o que também foi relatado por Ugazio et al., 1995.

Os resultados apresentados na Figura 8 sugerem que o tratamento concomitante dos coelhos com fenobarbital e CCl_4 provoca uma importância do fluxo plasmático hepático, evidenciado pela diminuição significativa da taxa de depuração do verde de indocianina (CI). Estes resultados são consistentes com os achados de Dupin et al. (1994), a respeito da disponibilidade do verde de indocianina em ratos cirróticos.

Já está bem estabelecido que a colchicina inibe a secreção de colágeno em fibroblastos *in vitro* pela quebra dos microtúbulos (Diegelmann et al., 1972; Ehrlich et al., 1974). *In vivo*, o colágeno é produzido pelos hepatócitos e pelas células não-parenquimatosas, apesar da contribuição de cada um dos dois tipos de células ainda estar sendo debatida (Chojkier et al., 1988; Ogata et al., 1991). A colchicina atua inibindo a formação de microtúbulos, mas sem nenhum efeito celular específico. Tem sido demonstrado que a droga previne o aumento do colágeno hepático em ratos cirróticos (Rojkind et al., 1973; Rojkind et al., 1975; Tanner et al., 1981).

A colchicina atua no colágeno por outros mecanismos, bem como na estimulação da secreção da collagenase por macrófagos (Gordon et al., 1976), a

inibição da mitose (Taylor et al., 1985) e pela inibição da biossíntese de vários mediadores inflamatórios pelos monócitos em pacientes com cirrose biliar primária (Kershenovich et al., 1990). É também capaz de inibir a produção de fatores de crescimento de fibroblastos pelas células de Kupffer (Armendariz-Borunda et al., 1989).

Oitenta por cento dos animais não tratados com colchicina (grupo CCl₄) apresentaram cirrose hepática. Este número caiu para 20 % no grupo tratado com colchicina após a 11ª semana de CCl₄. Em nenhum animal no grupo tratado com colchicina desde o início teve formação de cirrose hepática e apenas 10 % destes animais formaram fibrose. No grupo de animais tratados com colchicina após a 11ª semana de tratamento com CCl₄ a proporção de animais com fibrose hepática foi de 80 %. Nos grupos de animais utilizados para este estudo a mortalidade foi muito baixa (3/37).

Em nosso estudo a colchicina mostrou-se capaz de reduzir a fibrose hepática e inibir a formação de cirrose hepática (Tabelas 1, 2 e 3). Lin et al. (1996) sugerem que a colchicina poderia inibir o processo inflamatório que leva a formação de cirrose. Não encontramos diferença no infiltrado inflamatório hepático dos 3 grupos. Assim, se a colchicina atuar reduzindo o processo inflamatório, esta ação não seria no número de células envolvidas neste processo, mas sim na liberação de agentes pró inflamatórios pelas mesmas.

Com base nestes resultados, podemos afirmar que o tratamento com colchicina inibe o desenvolvimento de fibrose e reduzindo também a formação de cirrose hepática, sugerindo o seu possível uso em doenças hepáticas que evoluem com a formação de fibrose hepática.

A colchicina, quando administrada desde o início do tratamento com CCl_4 , mostrou ser eficaz inibindo a cirrose hepática e diminuindo a fibrose em coelhos.

Apesar destas conclusões, acreditamos que outros estudos devem ser realizados buscando determinar seu mecanismo de ação, tanto em células inflamatórias, bem como células relacionadas com a formação de fibrose hepática, como por exemplo, as células de Ito.

6. Conclusões

A baixa letalidade e o número de animais que desenvolveram cirrose hepática leva a concluir que este tipo de modelo é viável.

O peso corporal dos animais não serve como parâmetro para o ajuste da dose de tetracloreto de carbono.

Para o controle do desenvolvimento da lesão hepática, apenas a determinação das aminotransferases é suficiente.

A colchicina mostrou-se eficaz na prevenção da cirrose hepática, inibiu a formação de fibrose, e impediu as alterações do fluxo hepático que ocorreram nos animais não tratados com a mesma.

7. SUMMARY

The fibroses development is a fundamental point in the formation of the hepatic cirrhosis, and its comprehension is essential for the understanding of the physiopatology of the cirrhosis and the consequent portal hypertension. The development of an adapted experimental model of hepatic fibroses is useful for the study of the illnesses that may develop the hepatic cirrhosis.

The colchicine has been used in patients with hepatic cirrhosis, but its effects are not totally known. The aim of this study was to evaluate the colchicine effects in the hepatic cirrhosis chemically developed and to evaluate if the Proctor Chatamra model is suitable to apply in rabbits.

Thirty seven male New Zealand rabbits were used (2.73 ± 0.05 Kg), Group A (n= 10), Group B (n= 10), Group C (n=10) and 7 controls animals. Group A was given only carbon tetrachloride (CCl_4) and phenobarbitone (PB), Group B received the same treatment as Group A with the addition of colchicine (100 μg /daily/five days a week 16 weeks) and Group C received the as Group B but had the colchicine treatment for a longer period of time. They were given phenobarbitone dissolved in drinking water (approximately 50 mg/day/animal) and a weekly treatment (10% solution in corn oil; 20 mg/animal/week) concomitant with PB. The CCl_4 dose was adjusted weekly in order to obtain serum AST and ALT levels between 400 U/l and 800 U/l. The indocyanine green (ICG) pharmacokinetics were determined after injecting the ICG (8mg/Kg, i.v.) and collecting plasma samples at suitable time points for the ICG quantification.

At the end of the experiment, animals were sacrificed, and 3 fragments of each liver sent to histology examination.

A higher proportion of animals which did not receive colchicine developed cirrhosis compared to those which received the drug (8/10 vs. 0/10, $p < 0.01$), the liver fibrosis was also reduced ($p < 0.01$). Rabbits that had been through the 16 week treatment had at the end of experiment, ICG, γ -GT, bilirubin and weight gain similar to controls.

The serum enzymes and the elimination rate of ICG (before and after 16 weeks of treatment) in the CCl_4 group were: ALT: 62.6 ± 170.87 U/l; AST: 39.40 ± 0.3661 ml/min/kg, respectively.

The low mortality and the quantity of the animals which developed liver cirrhosis conduce to conclude with that model is suitable.

The body weight is not suitable to regulate the CCl_4 doses. Only the aminotransferases measurement is necessary for control of the liver development.

The colchicine reduces the development of liver fibrosis and cirrhosis in an experimental model of chronic toxic liver damage, supporting its potential as a therapy of liver diseases.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, S.S.; et al. Cardiac function in alcoholics with cirrhosis: absence of overt cardiomyopathy: myth or fact? *J. Am. Coll. Cardiol.* 3:696, 1984
- ALA-KOKKO, L.; STENBACK, F.; RYHANEN, L. Preventive effect of malotilate on carbon tetrachloride-induced liver damage and collagen accumulation in the rat. *Biochem. J.*, 246: 503-509, 1987.
- ALARCON-SEGOVIA, D.; RAMOS-NIEMBRO F.; DE KASEP, G.I.; ALCACER, J.; PEREZ TAMOYO, R. Long term evaluation of colchicine in the treatment of scleroderma. *J. Rheumatol.* 6: 705-712, 1979.
- ARTHUR, M.J.P.; IREDALE, J.P. Hepatic lipocytism, TIMP-1 and liver fibrosis. *J. Roy. Coll. Phys. London*, 28:200, 1994.
- ATTERBURY, C.E. When not to do a liver biopsy. *J.Clin. Gastroenterol.* 4:465, 1982.
- BAKER K.J. Binding of sulfobromophthalein (BSP) sodium and indocyanine green (ICG) by plasma α_1 -lipoproteins: *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)*, 122,957, 1966.
- BEGON, F.; BOHUON, C. Technique de l'épreuve au vert d'indocyanine par l'analyse en continu. *Clin. chim. Acta*, 12, 425, 1965.
- BISBY, R.H.; CUNDALL, R.B.; DREDPATH, J.L.; et al. 1-electron reduction reactions with enzymes in solution. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 172: 51-63, 1976.

- BISSELL, D.M.; ARESON, D.M.; MAHER, J.J.; ROLL, F.J. Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *J. Clin. Invest.*, 79: 801-12, 1987.
- BISSELL, D.M.; FRIEDMAN, S.L.; MAHER, J.J.; ROLL, F.J. Connective tissue biology and hepatic fibrosis: report of a conference. *Hepatology*, 11: 488-98, 1990.
- BOMZON, A.; BLENDIS, L.M. Animal models of liver disease. In: Bomzon A., Blendis L.M., eds. *Cardiovascular Complications of Liver Disease*. Boston, CRC Press, 9-28, 1990.
- BORING, C.C.; SQUIRES, T.S.; TONG T. Cancer Statistics 1993. *Cancer J. Clin.*, 43(1):7-26, 1993.
- BOSMA, A.; BROUWER, A.; SEIFERT, W.F.; KNOOK, D.K. Synergism between ethanol and carbon tetrachloride in the generation of liver fibrosis. *J Pathol.*, 156: 15-21, 1988.
- BRODIE, A.E.; POTTER, J.; REED, D.J. Effects of vinblastine, oncodazole, procarbazine, chlorambucil, and bleomycin in vivo on colchicine binding activity of tubulin. *Life Sciences*, 24: 1547-1554, 1979.
- BUSCHMANN, R.J.; RYOO, J.W. Hepatic structural correlates of liver fibrosis: A morphometric analysis. *Experimental and Molecular Pathology*, 50:114-124, 1989.
- CAESAR, J.; CHIANDUSSI, S.L.; GUEVARA, L.; et al. The use of indocyanin green in the measurement of hepatic blood flow and as a test of hepatic function. *Clin. Sci.* 21: 43-57, 1961.

- CAMERON, G.R.; KARUNARATNE, W.A.E. Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *J. Pathol. Bact.* 42:1,1936.
- CEDILLO, A.; MOURELLE, M.; MURIEL, P. Effect of colchicine and trimethylcolchicinic acid on CCl₄ – induced cirrhosis in the rat. *Pharmacology & Toxicology*, 79: 241-246, 1996
- CHATAMRA, K.; PROCTOR, E. Phenobarbitone-induced enlargement of the liver in the rat: its relationship to carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Br. J. Exp. Pathol.* 62: 283-288, 1981.
- CHERRICK, G. R.; STEIN, S. W.; LEEVY, C. M.; DAVIDSON, C.S. Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay and hepatic extraction. *J. Clin. Invest.* 39, 592, 1960.
- CHOJKIER, M.; LYNCH, K.D.; FILIP, M.; Increased production of collagen in vivo by hepatocytes and nonparenchymal cells in rats with carbon tetrachloride induced hepatic fibrosis. *Hepatology*, 8:808-14, 1988.
- CZAJA, M.J.; WEINER, F.R.; TAKASHI, S.; GIAMBRONE, M.A. treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. *Hepatology*, 10: 795-800, 1989.
- COLIN, N.; PALMER, C.N.; COATES, P.J.; DAVIES, S.E.; SHEPHARD, E.A.; PHILLIPS, I.R. – Localization of cytochrome P450 gene expression in normal and decreased human liver by in hybridization of wax-embedded archival material. *Hepatology*, 16(3):682-687,1992.

- DIEGELMANN, R.F.; PETERKOFKY, B. Inhibition of collagen secretion from bone and cultured fibroblasts by microtubules disruptive drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 892-6, 1972.
- DUPIN, S.; DELRAT, P.; LE QUELLEC, A.; et al. Indocyanin Green Pharmacokinetics in rats with progressive carbon tetrachloride-induced hepatocellular insufficiency. *Arzneim - Forsch Drug Res.*, 44: 267-280, 1994.
- EHRlich, H.P.; BORNSTEIN, P. Microtubules in transcellular movement of procollagen. *Nature (London)*, 238:275, 1972.
- EHRlich, H.P.; ROSS, R.; BORNSTEIN, P. Effects of antimicrotubular agents on the secretion of collagen. A biochemical and morphological study. *J. Cell. Biol.*, 62: 390-405, 1974.
- FOX, I.J.; Brooker, L.G.S.; Heseltine, D.W.; Essex, H.E.; Wood, E.H. A tricarbo-cyanine dye for continuous recording of dilution curves in whole blood independant of variations in blood oxygen saturation. *Proc. Mayo Clin*, 32: 478, 1957.
- FOX, I.J.; WOOD, E.H. Application of dilution curves recorded from the right side of the heart or venous circulation with the aid of a new indicator dye. *Proc. Mayo Clin.*, 32: 541, 1957.
- FRIEDMAN, S.L. – Acetaldehyde and alcoholic fibrogenesis: fuel to fire but not the spark. *Hepatology*, 12(3): 609-611, 1990.

- FRIEDMAN, S.L.; ROLL, F.J.; BOYLES, J.; ARENSON, D.M.; BISSEL, D.M.
Maintenance of differentiated phenotype of cultured rat hepatic lipocytes by basement membrane matrix. *J. Biol. Chem.*, 264: 10756-62, 1989.
- FRIEDMAN, S.L. The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanisms and treatment strategies. *N. Engl. J. Med.*, 328: 1828, 1993.
- GORDON, S.; WERB, Z. secretion of macrophage neutral proteinase is enhanced by colchicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 872-876, 1976.
- GRESSNER, A.M.; BACHEM, M.G. Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat storing cells in fibrogenesis. *Semin. Liver Dis.*, 10: 30-46, 1990.
- GRESSNER, A.M. Liver fibrosis: perspectives in pathobiochemical research and clinical outlook. *Eur. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 29: 293-311, 1991.
- GUDOWSKI, G.; GMIREK, D.; WEILAND, R.; ZOELLNER, R.
Vergleichsuntersuchungen über den Wert der Wofaverdin und Bromsulphthalein-Clearance im Kindesalter. *Dtsch. Gesundh. -Wes.*, 35, 1656, 1967.
- HALKIN, H.; DANY, S.; GREENWALD, M.; SHNAPS, Y.; TIROSH, M. Colchicine Kinetics in patients with familial Mediterranean fever. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 28: 82, 1980.
- HARRIS, E.D.; KRANE, S.M. Collagenases. *N. Engl. J. Med.*, 291: 557, 1974.
- HUNTER, A.L.; KLAASEN, C.D. Biliary excretion of colchicine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 192: 605-617, 1975.

- HUNTON, D.B.; BOLLMAN, J.L.; HOFFMAN, H. N. Studies of hepatic function with indocyanine green. *Gastroenterology*, 39, 713, 1960.
- IREDALE, J.P.; MURPHY, G.; HEMBRY, R.M.; et al. Human hepaticlipocytes synthesise tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1): implications for regulation of matrix degradation in liver. *J. Clin. Invest.*, 90: 282, 1992.
- ITALIAN MULTICENTRE COOPERATIVE PROJECT. Nutritional status in cirrhosis. *J. Hepatol.*, 21:317, 1994.
- JARNAGIN W.R.; ROCKEY, D.C.; KOTELIANSKY, V.E.; WANG, S.S.; BISSEL, D.M. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J. Cell. Biol.*, 127(6 pt 2): 2037-48.
- JIANG, Z.; YOU, D.; WU, J.; CHEN, X. Monitoring of serum markers of fibrosis . CCl₄ – induced liver damage effects of anti-fibrotic agents. *J. Hepathol.* 16: 282-9. 1992.
- KAASSEN, C.D.; PLAA, G.L. Plasma disappearance and biliary excretion of indocyanine green in rats, rabbits and dogs. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 15, 374, 1969.
- KAPLAN, M.M.; ALLING, D.W.; ZIMMERMAN, H.J.; WOLFE, H.J.; SPERSKY, R.A.; HIRSCH, G.S.; ELTA G.H.; GLICK, K.A.; EAGEN, K.A. A prospective trial of colchicine for primary biliary cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* 315: 1448-1454, 1986.

- KAWASAKI, S.; SUGIYAMA, Y.; IGA, T.; HANANO, M.; SANJO, K.; BEPPU, T.; IDEZUKI, Y. Pharmacokinetic study on the hepatic uptake of indocyanine green in cirrhotic patients. *The American Journal of Gastroenterology*, 80:801-806, 1985.
- KEEGAN, A.; MARTINI, R.; BATEY, R. Ethanol-related liver injury in the rat: a model of steatosis, inflammation and pericentral fibrosis. *Journal of Hepatology*, 23: 591-600, 1995.
- KERSHENOBICH, D.; ROJKIND, M.; QUIROGA, A.; ALCOCER-VARELA, J. Effect of colchicine on lymphocyte and monocyte function and its relation to fibroblast proliferation in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, 11: 205-209, 1990.
- KERSHENOBICH, D.; VARGAS, F.; GARCIA-TSAO, G.; et al. Colchicine in the treatment of cirrhosis of the liver. *N. Engl. Med. J.*, 318: 1709-13, 1988.
- KERSHENOBICH, D.; URIBE, M.; SUAREZ, G.I.; et al. Treatment of cirrhosis with colchicine. A double-blind randomized trial. *Gastroenterology*, 77: 532-6, 1979.
- KERSHENOBICH, D.; VARGAS, F.; GARCIA - TSAO, G.; PÉREZ-TAMOYO, R.; GENT, M.; ROJKIND, M. Colchicine in the treatment of cirrhosis of the liver. *N. Engl. J. Med.*, 318:1709, 1988.
- KETTERER, S.G.; WIEGAND, B. D. The excretion of indocyanine green and its use in the estimation of hepatic blood flow. *Clin. Res.*, 7,71, 1959.
- KOCH, R.R.; GLENDE, E.A. Jr.; RECKNAGEL, R.O. Hepatotoxicity of bromotrichloromethane-bond dissociation energy and lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, 23, 2907-2915, 1974.

- KOROLKOVAS, A.; JOSEPH, H. B. Química Farmacêutica. 1ªed.pp 183. Editora Guanabara. 1988.
- KRÄHENBÜHL, S.; REICHEN, J. Decreased hepatic glucose production in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J. Hepatol.* 19: 64-70, 1993.
- LEE, S.S.; GIRORD C.; VALLA, D.; BRAILON, A.; HADENGUE, A.; LEBREC, D. Hemodynamic characterization of chronic bile duct-ligated rats: effect of pentobarbital sodium. *Am. J Physiol*, 251:G176-G180,1986.
- LEONI, S.; SPAGNUOLO, S.; CONTI DE VIRGILIS, L. Effects of colchicine on rat liver plasma membranes. *Biochim. Biophys Acta*, 596:451, 1980.
- LEEVEY, C. M.; BENDER, J.; SILVERBERG, M.; NYALOR, J. Physiology of dye extraction by the liver: comparative studies of sulfobromophthalein and indocyanine green. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 111, 161, 1963.
- LEEVEY, C.M.; LEEVEY, C.B.; HOWARD M.M. Indocyanine green and the liver. In: Davidson C.S. ed. Problems in liver diseases. New York, Stratton International Medical Book Corp, 42-52,1979.
- LEEVEY, C.M.; MENDENHALL, C.L.; LESKO W. et al. Estimation of hepatic blood flow with indocyanine green. *J. Clin Invest*, 41:1169-80, 1962.
- LEEVEY, C.M.; SMITH, F.; LONGUEVILLE, J. et al. Indocyanine green clearance as a test for hepatic function. *JAMA*, 200: 236-40, 1967.
- LEVI, A.J.; GATMAITAN, Z.; ARIAS, I.M. Two hepatic cytoplasmic protein fractions, Y and Z, and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin, sulfobromophthalein, and other anions. *J. clin. Invest.*, 48,2156, 1969.

- LEVY, M.; ELIAKIM, M. Long-term colchicine prophylaxis in familial Mediterranean fever. *Br. Med. J.* 2: 808-809, 1977.
- MACLEAN, E.; MACLEAN, 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. Pathol.*, 50: 502-506, 1969.
- MARTIN, J.F.; MIKUKECKY, M.; BLASCHKE, T.F. et al. Differences between the plasma indocyanine green disappearance rates of normal men and women. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 150:612-17, 1975.
- MARTIN, J.F.; VIERLING, J.M.; WOLKOFF, A.W.; et al. Abnormal hepatic transport of indocyanine green in Gilbert's syndrome. *Gastroenterology*, 70: 385-91, 1976.
- MARTINEZ-HERNADEZ, A. The hepatic extracellular matrix II. Electron immunohistochemical studies in rats with CCl₄ induced cirrhosis. *J. Liver Dis.* 1: 166-168, 1986.
- MATSOUKA, M.; TSUKAMOTO, H. — Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell – derived transforming growth factor β : implication for a pathogenic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology*, 11(4):599-605, 1990.
- MERRIMAN, J.E.; WYANT, G. M.; BRAY, G.; MCGEACHY, W. Serial cardiac output determinations in man. *Canad Anaesth. Soc. J.*, 5:375, 1958.
- McGUIRE, R.F.; BISSEL, D.M.; BOYLES, J.; ROLL F.J. Role of extracellular matrix in regulating fenestrations of sinusoidal endothelial cells isolated from normal rat liver. *Hepatology*, 15: 989-97, 1992.

McLEAN, E.K.; McLEAN, A.E.M.; SUTTON, P.M. Instant cirrhosis. *Br. j. Exp. Pa*
50: 502,1969.

McLEAN, A.E.M.; McLEAN, E.K. The effect of diet and 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane (DDT) on microsomal hydroxylating enzymes and sensitivity of rats to carbon tetrachloride poisoning. *Biochem. J.* 100:564,1966.

MILANI, S.; HERBST, H.; SCHUPPAN, D.; HAHN, E.G.; STEIN, H. In situ hybridization for procollagen types I, III and IV mRNA in normal and fibrotic liver: evidence for predominant expression in nonparenchymal liver cells. *Hepatology*, 10: 84-92, 1989.

MINCIS M. Gastroenterologia e hepatologia. Lemos Editorial e Gráfica Ltda. 1997.

MONFORT, I.; PEREZ-TAMOYO, R.; ALVIZOURI, A.M.; TELLO, E.; Collagenase in the hepatic and sinusoidal liver cells in the reversibility of experimental cirrhosis of the liver. *Virchows Arch[Cell. Pathol.]*, 59:281-289, 1990.

MOODY, F.G.; RIKKERS, L.F.; ALDRETE J.S.; Estimation of the functional reserve of human liver. *Ann. Surg.*, 180: 592-8,1974.

MOON, V.H. Experimental cirrhosis in relation to human cirrhosis. *Arch. Pa*
18:381,1934.

MOURELLE, M.; ROJKIND, M.; RUBALCABA, B. Colchicine improves the alterations in the liver adenylate cyclase system of cirrhotic rats. *Toxicology*, 21:213, 1990.

MOURELLE, M.; RUBALCAVA, B. Regeneration of the liver after carbon tetrachloride. *J. Biol Chem.*, 256:1656-1660, 1981.

- MUÑOZ TORRES, E.; PAZ BOUZA, J.I.; ABAD HERNANDEZ, M.M.; ALONSO MARTIN, M.J.; LOPEZ BRAVO, A. Experimental carbon tetrachloride-induced cirrhosis of the liver. *INT. J. Tiss. Reac.*, x (4) 245, 1988.
- MURRAY, M. – P450 enzymes, inhibition mechanisms, genetic regulation and effects of liver diseases. *Clin. Pharmacokinet.*, 23(2):132-146, 1992.
- NAKAE, D.; et al.: Liposome encapsulated superoxide dismutase prevents liver necrosis induced by acetaminophen. *AM. J. Pathol.*, 134: 787, 1990.
- NEBERT, D.W.; GONZALEZ, F.J. P450 genes: structure, evolution and regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, 56:945-993, 1990.
- NEBERT, D.W.; NELSON, D.R.; COON M.J.; ESTABROOK, R.W.; FEYERIESEN, R.; FUJII-KURIYAMA Y.; GONZALEZ, F.J.; GUENGERICH, F.P.; GUNSALUS, F.C.; JONSON, E.F. – The P450 superfamily: update on new sequencing mapping and recommended nomenclature. *DNA Cel. Biol.*, 10(1): 1-14, 1991.
- PAUMGARTNER, G.; PROBST, P.; KRAISNER, R. et al. Kinetics of indocyanine green removal from the blood. *Ann N.Y. Acad. Sci.*, 170:134-47, 1970.
- PAUMGARTNER, G. The handling of indocyanine green by the liver. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, 3-29, 1975.
- PARISE, E.R. Cirrose hepática. In: *Compêndio de hepatologia*, ed. By A.A. Matos & W. Dantas, pp 367-374, Fundo Editorial BYK, São Paulo, 1995.
- PARISE, E.R.; CHEHTER, L.; PARISE, F.H.; KONDO, M.; LEITE-MÓR, M.M.B.; NOGUEIRA, M.D. Estudo dos componentes da matriz extracelular na doença hepática crônica. *Rev. Hosp. São Paulo*, 1: 32-35, 1992.

- PARISE, E.R.; CHEHTER, L.; NOGUEIRA, M.D.; LEITE-MOR, M.M.B.; TERSARIOL, I.L.L.S.; MICHELACCI, Y.M.; NADER, H.B. Effects of vitamin A administration on collagen and sulfated glycosaminoglycans contents in the liver of rats treated with carbon tetrachloride. *J. Lab. Clin. Med.*, 119: 676-81, 1992.
- PERZ-TAMOYO R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*, 3:112, 1983.
- PIERCE, P.A.; GLANY, M.R.; GRECO, R.S. Increased procollagen mRNA levels in CCl₄ induced liver fibrosis rats. *J. Biol. Chem.*, 262: 1651, 1987.
- POO, J.L.; FELDMANN, G.; MOREAU, A.; et al. Early colchicine administration reduces hepatic fibrosis and portal hypertension in rats with bile duct ligation. *J. Hepatol.*, 19: 90-4, 1993.
- POPPER, H.; PIEZ, K.A. Collagen metabolism in the liver. An annotated and supplemented report of a workshop at the National Institute of Health. *Dig. Dis.*, 23: 641-659, 1978.
- PORSTMANN, W.; BANASCHAK, H. Wofaverdin – ein Indocyaninfarbstoff zur arteriellen und venösen Dilutionsdiagnostik. *Dtsch. Gesundh. -Wes.*, 20, 889, 1965.
- POYER, J.L.; MCCAY, P.B.; LAI, E.K., et al. Confirmation of assignment of the trichloromethyl radical spin adduct detected by spin-trapping during ¹³C-carbon tetrachloride metabolism in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 94: 1154-1160, 1980.

- PROCTOR, E.; CHATAMRA, K. Controlled induction of cirrhosis in the rat. *Br. J. Exp. Pathol.*, 64: 320-330, 1983.
- PROCTOR, E.; CHATAMRA, K. High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology*, 83: 1183-90, 1982.
- PROCTOR, E.; CHATAMRA, K. Standardized micronodular cirrhosis in the rat. *Eur Surg. Res.* 16: 182, 1984.
- QUINN, P.S.; HIGGINSON, J. Reversible and irreversible changes in experimental cirrhosis. *Am. J. Pathol.* 47: 353, 1965.
- RAO, P.S.; MANGIPUDY, R.S.; MEHENDALE, H.M. Tissue injury and repair as parallel and opposing responses to CCl₄ hepatotoxicity: a novel dose-response. *Toxicology*, 118: 181-193, 1997.
- RAPAPORT, E.; KETTERER, S.G.; WIEGAND, B. D. Hepatic clearance of indocyanine green. *Clin. Res.*, 7:289, 1959.
- RAVID, M.; ROBSON, M.; KEDAR, I. Prolonged colchicine treatment in four patients with amyloidosis. *Ann. Intern. Med.* 87: 568-570, 1977.
- RECKNAGEL, G.O.; GHOSHAL, A.K. Quantitative estimation of peroxidative degeneration of rat liver microsomal and mitochondrial lipids after carbon tetrachloride poisoning. *Exp. Mol. Pathol.*, 5: 413-416, 1966.
- RECKNAGEL, R.O.; GLENDE, E.A.J. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: An example of lethal cleavage. *Crit. Rev. Toxicol.*, 2: 263-297, 1973.

- REICHEN, J.; EGGER, B.; OHARA, N.; BELTNER, B.; ZYSSET, T.; ZIMMERMANN, A. Determinants of hepatic function in liver cirrhosis in the rat. *J. Clin. Invest.*, 82: 2069-2070, 1988.
- REUBI, F.C.; GROSSWEILER, N.; GÜRTLER, R. Renal circulation in man studied by means of a dye-dilution method. *Circulation*, 33, 426, 1966.
- REYES, H.; LEVI, A. J.; GATMAITAN, Z.; ARIAS, I. M. Studies of Y and Z, two hepatic cytoplasmic organic anion-binding proteins: effect of drugs, chemicals, hormones and cholestasis. *J. clin. Invest.*, 50, 2242, 1971.
- ROJKIND, M.; DUNN, M.A. Hepatic fibrosis. *Gastroenterology*, 76: 849-863, 1979.
- ROJKIND, M.; GIAMBRONE, M.A.; BIEMPICA, L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology*, 76:710-719, 1979.
- ROJKIND, M.; GREENWEL, P. The liver as a bioecological system. In: Arias I M, Jakoby WB, Propper H, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The liver: biology and pathology*, 2nd ed. New York: Raven Press, 707-716, 1988.
- ROJKIND, M.; KERSHENOBICH, D. Effect of colchicine on collagen, albumin and transferrin synthesis by cirrhotic rat liver slices. *Biochim. Biophys Acta*, 378:415-23, 1975.
- ROJKIND, M.; PONCE-NOYOLA, P. The extracelular matriz of the liver. *Collagen. Rel. Res.*, 2:151-75, 1982.
- ROJKIND, M.; ROJKIND, M.H.; CORDERO-HERNANDES, J. In vivo collagen synthesis and deposition in fibrotic and regenerating rat livers. *Collagen Relat. Res.*, 3:335-347, 1983.

- ROJKIND, M.; URIBE, M.; KERSHENOBICH, D. Colchicine and the treatment of liver cirrhosis (lett). *Lancet*, 1:38-39, 1973.
- ROSA, H.; PARISE, E.R.; PARANHOS, F.R.L.; et al. Controlled production of cirrhosis in the rat liver. *Arq. Gastroenterol*, São Paulo, 28: 39-43, 1991.
- ROZGA, J.; FOSS, A.; ALUMETS, J.; et al. Liver cirrhosis in rats: regeneration and assessment of the role of phenobarbital. *J. Sur. Res.*, 51: 329- 335, 1991.
- RUBIN, E.; HUTTERER, F.; PROPER, H. Cell proliferation and fibre formation in chronic CCl₄ intoxication. *Am. J. Pathol.* 42: 715, 1963.
- RUBIN, E.; HUTTERER, F. Methods in the study of structural changes induced by experimental chronic hepatic injury. *Methods Achiev Exp. Pathol.*, 2: 224-242, 1967.
- SABOURAUD, A.; ROCHDI, M.; URTIZERBA, M.; CHRISTEN, M.O.;ACHTE, G.;SCHERMANN, J.M. Pharmacokinetics of colchicine: a review of experimental and clinical data. *Z. Gastroenterol* 30 (Suppl 1):35-9, 1992.
- SCHEUER, P.J. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *Journal of Hepatology*, 13:372-374, 1991.
- SCHUPPAN, D. Structure of the extracelullar matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Semin. Liver Dis.*, 10:1-10, 1990.
- SENOO, H.; IMAI, K.; SATO M.; KOJIAMA N.; MIURA M.; HATA R. Three-dimensional structure of extracellular matrix reversibly regulates morphology, proliferation and collagen metabolism of perisinusoidal stellate cells (vitamin A-storing cells). *Cell. Biol. Int.*, 20:501-12, 1996.

- SHERLOCK, S. European livers. *Lancet*, 342(8880):1127-1128, 1993.
- SHIBAYAMA, Y.; NAKATA, K. The role of sinusoidal stenoses in portal hypertension of liver cirrhosis. *J. Hepatol.*, 8:60, 1989.
- SHULL, M.M.; ORMSBY, I.; KIER, A.B.; PAWLOWSKI, S.; DIEBOLD, R.J.; YIN, M.; ALLEN, R.; SIDMAN, C.; PROETZEL, G.; ANNUNZIPTA, N.; DUIETSCHAMAN, T. – Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, 395(6397):693-699, 1992.
- SLATER, R.F. Free radicals and tissue injury: fact and function. *Br. J. Cancer*, 8, 5-10, 1987.
- SPEEG, K.V.; MALDONADO, A.L.; LIACI, J.; MUIRHEAD, D. Effect of cyclosporine on colchicine secretion by a liver canalicular transporter studied in vivo. *Hepatology* 15: 899-903, 1992.
- TAFI, L.; MATUCCI-CERINIC, M.; FALCINI, F.; VALENTINI, G.; BARTOLOZZI, G. Colchicine treatment of Behçet's disease in children. *Arthritis Rheum.* 30: 1435, 1987.
- TANNER, M.S.; JACKSON, D.; MOWAT, A.P. Hepatic collagen synthesis in a rat model of cirrhosis and its modification by colchicine. *J. Pathol.*, 135: 179-87, 1981.
- TARNAVSKA, Z.; KUCHAR, M.; REJHOLEC, V.; TRNAVSKY, K. The binding of colchicine and its derivatives to bovine and human serum albumin and human plasma. *Pharmacology*, 18: 123-127, 1979.
- TAYLOR, A.W. The mechanism of colchicine. Inhibition of mitosis. I Kinetiks of inhibition and the binding of H3 Colchicine. *J. Cell. Biol.*, 25: 145-60, 1985.

- TSUKAMOTO, M.; MATSUOKA, M.; FRENCH, S. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Sem. Liver Dis.*, 10(1):56-65, 1990.
- UGAZIO, G.; BOSIA, S.; CORNAGLIA, E. Experimental model of cirrhosis in rabbits exposed to carbon tetrachloride by inhalation. *Res. Com. In Molecular Pathology and Pharmacology*, 63:77, 1995.
- VOROBIOFF, J.; Bredfeldt, J.; Groszmann, R.J. Increased blood flow through the portal system in cirrhotic rats. *Gastroenterology*, 87: 1120-1126, 1984.
- WALLACE, S.L.; OMOKOKU, B.; ERTEL, N.H. Colchicine plasma levels: implications as to pharmacology and mechanism of action. *American Journal of Medicine*, 50: 443-448, 1970.
- WALASZEK, E.J.; KOCSIS, J.J.; LEROY, G.V.; GEILING, E.M.K. Studies on the excretion of radioactive colchicine. *Archives Internationales de Pharmacodynamie*, 125: 371-382, 1960.
- WALLACE, S.L.; ERTEL, N.H. Plasma levels of colchicine after oral administration of a single dose. *Metabolism*, 22: 749-753, 1973.
- WATKINS, P.B. – Role of cytochromes P450 in drug metabolism and hepatotoxicity. *Sem. Liver Dis.* 10(4):235-250, 1990.
- WEIBEL, E.R.; STÄUBLI, W.; GNÄGL, H.R.; et al. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. Morphometric model, stereologic methods and normal morphometric data for rat liver. *J. Cell. Biol.*, 42: 68-91, 1969.
- WEINER, A.J.; GEYSEN, H.M.; CHRISTOPHERSON, C.; HALL, J.E.; MASON, T.J.; SAIACCO, G.; BONINO, F.; CRAWFORD, K.; MAUON, C.D.; CRAWFORD, K.A.-

Evidence of immune selection of hepatitis C virus putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc.Natl. Acad. Sci.*, 89(8):3468-3474,1992

WEINER, F.R.; ESPOSITI, S.D.; ZERN, M.A.- The regulation of hepatic matrix protein syntesis by cytokines. In: Clement B, Guillozo A. *Cellular and molecular aspect of cirrhosis*. John Libbery Eurotech, 1992. p.147- 156.

WEINER , F.R.; GIAMBRONE, M.A.; CZAJA, M.J.; SHAH, A.; ANNONI, G.; TAKAHASKI, S.; ZERN, M.A.- Ito cell gene expression and collagen regulation. *Hepatology*, 11(1):111 – 117, 1990.

WHEELER, H.O.; CRANSTON, W.I.; MELTZER, J.I. Hepatic uptake and biliary excretion of indocyanine green in the dog. *Proc. Soc. exp. Biol*, 99:11, 1958.

WILLEMS, B.; VILLENEUVE, J.P.; HUERT, P. M.; Effect of propranolol on hepatic and systemic hemodynamics in dogs with chronic bile duct ligation. *Hepatology* 6:92-97,1986.

WILSON, L.; BAMBURG, J.R.; MIZEL, S.B.; GRISHAM, L.M.; CRESWELL; K.M. Interaction of drugs with microtubule proteins. *Federation Proceedings* 33: 158-166, 1974.

YAHUACA, P.; AMAYA, A.; ROJKIND, M.; MOURELLE, M. Cryptic ATPase activities in plasma membranes of CCl₄-cirrhotic rats. Its modulation by changes in cholesterol phospholipid ratios. *Lab. Invest.*, 21:213, 1985.

9. APÉNDICE

Development of an experimental model of liver cirrhosis in rabbits

Brandão CG^{*}, Ferreira HHA^{*}, Piovesana H^{**}, Polimeno NC[†], de Nucci G^{*}
Pedrazzoli Jr J^{*}.

^{*}Clinical Pharmacology and Gastroenterology Unit, São Francisco University Medical School, Bragança Paulista, SP, Brazil; ^{**}Department of Pathology, São Francisco University Medical School, Bragança Paulista, SP, Brazil; [†]Hemocenter, São Francisco University Medical School, Bragança Paulista, SP, Brazil, ^{*}Cartesius Analytical Unit, Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, São Paulo University São Paulo, SP, Brazil

Running Title: Experimental liver cirrhosis

Acknowledgments: Mr. Brandão is supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil. This work was supported by a grant from Propep - São Francisco University (to J.P.Jr).

Author for correspondence:

Dr. José Pedrazzoli Júnior,
Clinical Pharmacology Unit,
São Francisco University Medical School,
Av. São Francisco de Assis, 218
12900-000, Bragança Paulista, SP, Brazil.
Fax: +55-11-78441825
e-mail: pedrazz@dginet.com.br

SUMMARY

The aim of this study was to develop an experimental model of liver cirrhosis in rabbits, using CCL₄ intoxication and enzymatic induction with phenobarbital.

Material and Methods: Seventeen male New Zealand white rabbits were used. Seven rabbits served as controls, and 10 were treated with CCL₄. Phenobarbital was included in the drinking water (50 mg/daily) throughout the study. After 14 days on phenobarbital, the first dose of CCL₄ in corn oil was administered intragastrically. The time between doses was 7 days, and the duration of treatment was 16 weeks. Subsequent doses of CCL₄ were calculated to maintain the AST/ALT levels between 400-800 IU/l. Standard laboratory tests, including ALT, AST, GGT, albumin, bilirubin and IGC clearance were performed at pre-determined times. At the end of the experiment, animals were sacrificed and three fragments of each liver lobe processed for histological examination. A semi-quantitative score was used to evaluate the development of fibrosis.

Results: Eight of 10 rabbits from the experimental group developed cirrhosis. Rabbits treated with CCL₄ did not gain weight, in contrast to the controls (40% weight gain, $p < 0.05$). A significant reduction of ICG CI was observed in CCL₄-treated rabbits at the end of the experiment, when compared with the corresponding basal values or with final values for the control group ($p < 0.05$ for both comparisons). The AST, ALT, Bilirubin and GGT levels were elevated in CCL₄-treated rabbits.

Conclusion: This model was successful in producing liver cirrhosis and may be useful in studies investigating metabolic, immunological or biochemical changes during the evolution of chronic liver disease.

INTRODUCTION

A reproducible animal model of liver cirrhosis is highly desirable for appropriate metabolic and therapeutic studies (1). The criteria for an ideal animal model vary, but should include duplication of the morphological features observed in human disease, a gradual progression of pathologic changes, high reproducibility and low mortality, reversible and irreversible fibrotic changes and the development of pathophysiological sequelae (2).

Many agents have been used as hepatotoxins in experimental models. The most common method of producing experimental cirrhosis is by administering multiple doses of carbon tetrachloride (CCL₄) (3). As with chloroform and halothane, CCL₄ requires activation by oxidases, involving hemolytic breakage of the C-Cl bond. This activation leads to the formation of trichloromethyl radical (CCL₃), the reactive metabolite, and occurs in the hepatic endoplasmatic reticulum through an enzyme system of electron transport from NADPH to oxygen. CCL₃ binds covalently to a series of molecular structures, particularly lipids of endoplasmic reticulum membranes, and initiates lipid peroxidation or reacts with sulfhydryl groups of proteins. Since the acute toxicity of CCL₄ is dependent upon its metabolism by the microsomal hydroxylating hepatic system, inducers of cytochrome P450 such as ethanol or phenobarbitone can potentiate this toxicity (4-9). Using an association of intragastric CCL₄ and phenobarbitone in drinking water, Proctor and Chatamra were able to induce liver cirrhosis in 72% of treated rats within 8-10 weeks (10-11). In this study we adapted the model described by Proctor and Chatamra (10-11) to rabbits, and studied the resulting cirrhosis.

MATERIAL AND METHODS

The study was performed in 17 male New Zealand white rabbits (initial body weight 2730 ± 50 g, 100 days old). The animals were allowed to adapt to their environment for one week, prior to use, with access to normal rabbit chow (Purina, Campinas, Brazil) and tap water *ad libitum*. Seven rabbits served as controls, and all received normal rabbit chow. Ten rabbits were used in the experimental group. Phenobarbital (Rhodia, São Paulo, Brazil) was added to the drinking water (50 mg/day) aiming to increase cytochrome P450 activity. The first dose of CCL₄ (Merck Ind. Quim, Rio de Janeiro, Brazil) in corn oil was given, after 14 days of phenobarbital treatment. This study was approved by the São Francisco University Research Committee and the standard criteria for care and use of laboratory animals in research were followed.

CCL₄ was administered intragastrically route, using a cannula made from a blunt-ended needle. The initial dose was 20 μ g, diluted in corn oil (0.2 ml). The time interval between doses was 7 days, and the duration of treatment was 16 weeks. The CCL₄ was always administered at the same time of day, by the same person (CGB), after an accurate weighing of the animals. The subsequent doses were calculated to maintain AST/ALT levels of 400-800 IU/l. Phenobarbital was given in the drinking water until throughout the experiment.

Biochemical parameters were determined for all animals, before phenobarbital administration, one week after initiating treatment, and 24 h after each CCL₄ dose, until the end of the experiment. The biochemical analyses were done using heparinized blood on an auto analyser (Mira Cobas).

Indocyanine green (ICG) clearance (Cl) as an index of liver function (12-13) was evaluated in all animals before and at the end of treatment by injecting a single dose of freshly prepared ICG (8 mg/kg) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) freshly prepared in 9 ml of saline solution into an ear vein. Blood samples (3 ml) were collected into EDTA-containing tubes before, 2, 4, 8, 15, 20, and 30 min after ICG administration. The blood samples were centrifuged at 2,000 g for 4 min and the plasma then separated and stored at -20°C until assayed. The plasma concentration of ICG was determined using a Hitachi U 2001 spectrophotometer at 805 nm. The maximum plasma concentration (C_{max}) and the time taken to reach this concentration (t_{max}) were obtained from the individual time-concentration curves. A first-order terminal elimination rate constant (k_e) for ICG was derived by log-linear regression of selected data points from the time-concentration curves describing a terminal log-linear decay phase. The half-life ($t_{1/2}$) was estimated from this rate constant ($t_{1/2} = \ln(2) / k_e$). To determine the extent of ICG excretion, the respective areas under the time-concentration curves for ICG (AUC_{ICG}) were calculated by the linear trapezoidal method. Extrapolation of AUC_{ICG} to infinity ($AUC_{0-\infty}$) was done, and the value $AUC_{0-\infty} / t_{1/2}$ was calculated as an index of ICG clearance (14).

The rabbits were killed with an overdose of sodium pentobarbital (Rhône Merieux, Ireland) anaesthesia at the end of experiment, and three fragments of each liver lobe were prepared for light microscopy. The tissues were fixed in 10% formalin and then embedded in paraffin. Serial sections were cut and stained with either hematoxylin-eosin, Masson's trichrome and reticulin. Histological evaluation was performed blind, i.e. without knowledge of the treatment performed. The extent of fibrosis, inflammation and necrosis was scored using the semi-quantitative criteria suggested by Scheuer (15).

Statistical analysis

The results were expressed as the mean $\pm$ SEM, unless otherwise stated. All the variables were analysed by one-way ANOVA followed by Student's *t* test, the Tukey test for multiple comparisons and the chi-square test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Eight of the ten rabbits in the experimental group developed cirrhosis, one animal developed fibrosis, and another, toxic hepatitis. One rabbit from each group died, of causes unrelated to the experimental protocol. None of the cirrhotic animals developed ascitis. Rabbits treated with CCL₄ did not gain weight, in contrast to the controls ($p < 0.05$, Figure 1 A). There was a significant reduction of ICG CI at the end of experiment in treated animals when compared with their basal values or the final values of the control group ($p < 0.01$ for both comparisons) (Figure 1 B).

The liver biochemistry tests confirmed the above mentioned findings with increased AST, ALT, bilirubin and GGT levels in animals with CCL₄-induced liver disease compared to the controls. The plasma albumin and protein levels were unchanged in both groups at the end of the study (Table 1). The liver histology demonstrated a well defined cirrhosis in most of the CCL₄-treated rabbits (Figure 2).

DISCUSSION

One of the main aims of experimental studies is to provide models of human disease free of the many variables associated with clinical diagnosis and treatment (11). We described here a model of hepatic fibrosis produced by the simultaneous administration of phenobarbital and CCL₄ in rabbits.

CCL₄ has long been known to cause liver cirrhosis in rats (9). A reliable experimental model for producing severe, decompensated micronodular cirrhosis in rats was described by Proctor and Chatamra (10-11), based on a CCL₄ dosing schedule evaluated by daily weight determinations. This model has a high frequency of cirrhosis and a low death rate (10-11).

Although being well characterised, rat models do not allow serial determinations of liver damage markers because of the small size of the animals. A consistent animal model should also allow the study of metabolic, immunological and biochemical changes during the evolution of liver cirrhosis, and not just at the end of the process. The information provided by such a model could improve our understanding of the ongoing liver damage and regeneration, and thus provide a more reliable model for studying pharmacokinetic, therapeutic and metabolic changes during chronic, progressive liver disease. Rabbits have been used as an animal model for liver cirrhosis induced by endotoxins (16) and sinusoidal fibrosis (17-18). CCL₄-induced liver cirrhosis in rabbits has been described by Ugazio *et al* (19) who suggested that microsomal induction by phenobarbital was not possible because of the extreme sensitivity of rabbits to the initial dose of CCL₄ used (120 µl). Furthermore, the time required for the development of established cirrhosis

was long (6 months). As described above, we were able to obtain a microsomal induction by including phenobarbital in the drinking water and by beginning with a lower initial dose of CCL₄ (20 µg) with a consequent reduction in the duration of treatment (18 weeks). As in the study by Ugazio *et al* (19), the treated animals did not gain weight (figure 1), and therefore required another parameter for adjusting the amount of hepatotoxin administered. Since aminotransferases are elevated in many forms of liver disease, especially those associated with significant hepatocyte necrosis such as acute viral hepatitis and chemical or ischemic injury, we adjusted the CCL₄ doses based on the AST and ALT levels determined 24h after CCL₄ administration. If the levels were < 400 U/l the CCL₄ dose was increased and if they were > 800 U/l the CCL₄ dose was reduced. The serial determination of markers of hepatocellular injury is necessary, because of the variable sensitivity of rabbits to CCL₄, as suggested by the wide variation found in plasma AST and ALT levels at the end of treatment (Table 1).

A common feature was the absence of ascitis in the rabbits which developed cirrhosis, despite the occurrence of well-defined cirrhosis (Figure 2). Wanless *et al* (17) and Mastai *et al* (18) reported ascitis in about 50% of rabbits in an experimental model of liver disease, induced by extensive sinusoidal fibrosis, instead of cirrhosis.

In conclusion, the model described above was successful in producing liver cirrhosis in rabbits and may be useful in studies aimed to investigate metabolic, immunological and biochemical changes during the evolution of chronic liver disease.

REFERENCES

1. Rosga J, Foss A, Alumets J, et al. Liver cirrhosis in rats: regeneration and assessment of the role of phenobarbital. *J Sur Res* 1991; 51: 329-335
2. Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Sem Liver Dis* 1990; 10: 56-64
3. Proctor E, Chatamra K. Controlled induction of cirrhosis in the rat. *Br J Exp Path* 1983; 64: 320-330
4. Fischer-Nielsen A, Poulsen HE, Hansen BA, et al. CCL₄ cirrhosis in rats: irreversible histological changes and differentiated functional impairment. *J Hepatol* 1991; 12: 110-117
5. Munoz TE, Paz BJI, Abad HMM, et al. Experimental carbon tetrachloride-induced cirrhosis of the liver. *Int J Tiss Reac* 1988; 10: 245-251
6. Abosma A, Brouwer A, Seifert WF, et al. Synergism between ethanol and carbon tetrachloride in the generation of liver fibrosis. *J Pathol* 1988; 156: 15-21
7. Chatamra K, Proctor E. Phenobarbitone-induced enlargement of the liver in the rat: its relationship to carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Br J Exp Pathol* 1981; 62: 283-288
8. Rozga J, Foss A, Alumets J, et al. Liver cirrhosis in rats: regeneration and assessment of the role of phenobarbital. *J Sur Res* 1991; 51: 329-335
9. McLean EK, McLean AEM, Sutton PM. An improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. *Br J Exp Path* 1969; 50: 502-506
10. Proctor E, Chatamra K. High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1982; 83: 1183-1190
11. Proctor E, Chatamra K. Controlled induction of cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1983; 64: 320-330

12. Caesar J, Shaldon S, Chiandussi L, et al. The use of indocyanine green in the measurement of hepatic blood flow and as a test of hepatic function. *Clin Sci* 1961; 21: 43-57
13. Klaassen CD, Plaa GL. Plasma disappearance and biliary excretion of indocyanine green in rats, rabbits, and dogs. *Toxicol Appl Pharmacol* 1969; 15: 374-384
14. Hauschke D, Steinjans VW, Diletti E. A distribution-free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1990; 28: 72-77.
15. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13: 372-374
16. Shiga J, Mori W. Protracted histopathological change of the liver necrosis induced by Schwarzman reaction. An experimental model of liver cirrhosis. *Acta Pathol Jpn* 1985; 35: 103-107
17. Wanless IR, Belgiorno J, Huet P-M. Hepatic sinusoidal fibrosis induced by cholesterol and stilbestrol in the rabbit: 1. Morphology and inhibition of fibrogenesis by dipyridamole. *Hepatology* 1996; 24: 855-864
18. Mastai R, Laganieri S, Wanless IR, et al. Hepatic sinusoidal fibrosis induced by cholesterol and stilbestrol in the rabbit: 2. Hemodynamic and drug disposition studies. *Hepatology* 1996; 24: 865-870
19. Ugazio G, Bosia S, Cornaglia E. Experimental model of cirrhosis in rabbits exposed to carbon tetrachloride by inhalation. *Exp Comm Mol Pathol Pharmacol* 1995; 88: 63-77

Figure Legend

Figure 1:

Panel A: Body weight changes in control and CCl₄-treated rabbits did not gain weight after 16 weeks, the opposite from controls. Asterisk denotes a significant difference denotes a significant difference compared to the correspondent basal value ($p < 0.05$)

Panel B: Plasma indocyanine green clearance (ICG CI) following the intravenous administration of 8 mg ICG/kg mg in control and CCl₄-treated rabbits. The results are expressed as the mean $\pm$ s.e.m. ICG Clearance was significantly reduced in animals with CCl₄-induced liver cirrhosis compared to controls. Asterisks denote a significant difference compared to the basal value and the cross indicates a significant difference compared to the final value for the controls ($p < 0.01$ for both comparisons).

Table 1 - Biochemical parameters in control and in CCl₄-rabbits.

	CONTROLS		CCl ₄ TREATED		P
	BASAL	FINAL	BASAL	FINAL	
ALT (U/l)	76.6 ± 9.7	74.3 ± 7.4	62.6 ± 5.8	1450 ± 419	p<0.01
AST (U/l)	33.1 ± 6.1	30 ± 4.8	39.8 ± 4.8	2488.3 ± 641.2	p<0.01
TOTAL BILLIRUBIN (mg/dl)	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.03	0.13 ± 0.01	0.32 ± 0.05	p>0.05
G-GT (U/l)	7.0 ± 1.51	6.3 ± 1.0	8.1 ± 1.1	62.8 ± 12.1	p<0.01
ALBUMIN (g/dl)	4.4 ± 0.1	4.5 ± 0.2	4.5 ± 0.1	4.2 ± 0.2	p>0.05
TOTAL PROTEIN (g/dl)	6.5 ± 0.27	6.8 ± 0.1	6.5 ± 0.1	6.5 ± 0.2	p>0.05

AST - aspartate aminotransferase, ALT - alanine aminotransferase, GGT - gamma glutamyl transpeptidase. The results are expressed as the mean ± sem of 7 control and 10 treated rabbits

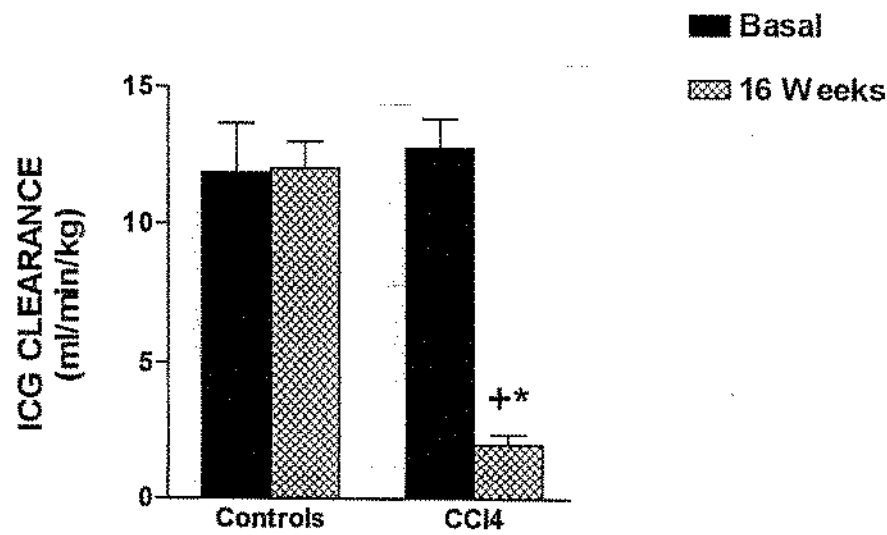
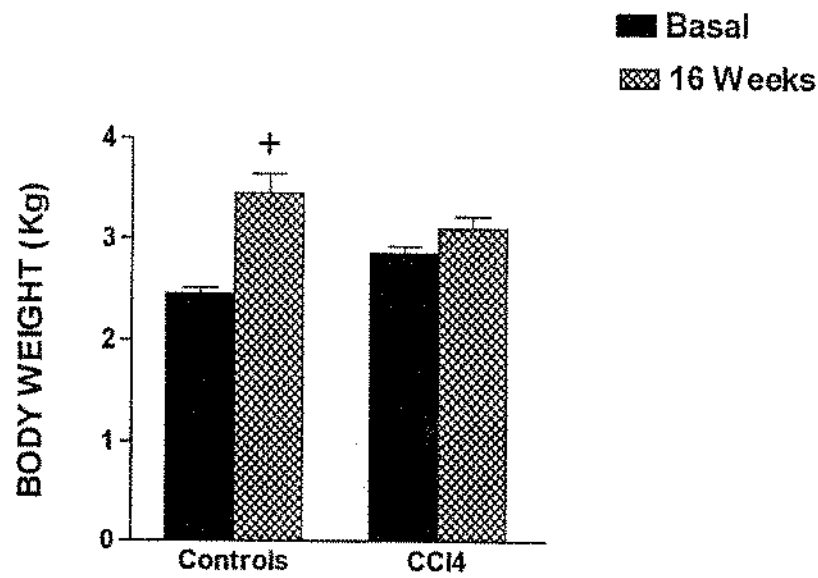


Figure Legend

Figure 2:

Upper plate: normal liver, H.E. staining (100x).

Middle and lower plates: Liver cirrhosis, with a pseudolobe (H.E. and Masson's Trichrome staining; 400x), in CCl₄-induced liver disease animals.

