

1. Resumo

As doenças colestáticas e sua evolução para fibrose e cirrose são muito conhecidas. Apesar do incremento de terapias, como o transplante hepático, esse grupo de afecções, ainda representa desafio na prática médica, desde o diagnóstico até o tratamento, além de estarem ligadas a morbidade e letalidade altas, com custos de tratamento elevados. Novas condutas e busca dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos são ampliados a cada dia. Este trabalho tem por objetivos avaliar a influência e os efeitos da exclusão parcial e total do íleo terminal em fígado, rins e íleo, na presença de colestase obstrutiva.

Foram utilizados trinta e dois ratos Wistar machos, distribuídos em quatro grupos (n = 8). Os grupos 2, 3 e 4 foram submetidos a ligadura do ducto hepático comum e, após quatro semanas, realizou-se drenagem biliar interna, por meio de hepaticoduodenostomia, com uso de prótese de nelaton. Nos animais do Grupo 3 associou-se anastomose ileocólica laterolateral com exclusão parcial dos últimos dez centímetros do íleo terminal. Nos animais do Grupo 4 realizou-se a secção e fechamento dos dez centímetros distais do íleo terminal e foi feita anastomose terminolateral, do íleo com cólon ascendente. O Grupo 1 foi controle, no qual os ratos foram submetidos, apenas a laparotomia e laparorráfia. Ao fim de oito semanas, todos os ratos dos quatro grupos foram mortos e foi colhido material para exames. Os exames bioquímicos foram: albumina, aspartatoaminotransferase, alaninaaminotransferase, fosfatase alcalina, γ -glutamilttransferase, bilirrubina direta, bilirrubina indireta, ureia e creatinina. Foram colhidos ainda, fígado, rins e segmento de íleo terminal, para análise anatomopatológica. Os resultados foram submetidos a análise estatística pelos testes de ANOVA, Kruskal-Wallis, Pearson e Fisher.

Houve persistência de graus variáveis de fibrose nos ratos do grupo 2, 3 e 4, sem diferença entre si. O grupo controle não apresentou fibrose hepática. Na histologia renal e do íleo terminal não foram vistas diferenças entre os quatro grupos. Em relação à análise bioquímica, os valores de AST, ALT, bilirrubina direta, γ -glutamyltransferase, ureia e creatinina foram maiores no Grupo 4 em relação ao controle ($p < 0,05$). O Grupo 4 apresentou valores de ureia e creatinina superiores aos dos grupos 2 e 3 ($p < 0,05$).

Conclui-se que derivação parcial do íleo terminal e a exclusão total dos últimos centímetros do íleo terminal, associadas à drenagem biliar não apresentaram diferenças na intensidade da fibrose hepática, comparadas à drenagem biliar isolada, em ratos submetidos a ligadura prévia do ducto hepático comum.

A exclusão do íleo terminal, em modelo de ligadura do ducto hepático associou-se a piora das provas bioquímicas do fígado. Não houve benefício na derivação ileocólica nas alterações morfológicas e na função do fígado e dos rins. A exclusão total do íleo terminal, associada a derivação biliodigestiva pós-colestase, piorou os valores das provas bioquímicas renais.

2. Abstract

Cholestatic diseases and their evolution into fibrosis and cirrhosis are well-known. Despite the increase in therapies, such as liver transplants, this group of affections still represents a challenge in medical practices, from the diagnosis to the treatment, and is commonly linked to high rates of morbidity and lethality, coupled with high treatment costs. New conducts and the search for the physiopathological mechanisms involved are constantly emerging. The purpose of the present study was to evaluate the influence and effect of the partial or total exclusion of the terminal ileum in the liver, kidney, and ileum, in presence of obstructive cholestasis.

Thirty-two male Wistar rats were divided into four groups (n = 8). Groups 2, 3, and 4 underwent the ligation of the common hepatic duct. After four weeks, an internal biliary drainage was performed by means of hepaticoduodenostomy, using a nelaton prosthesis. In the animals from Group 3, a laterolateral ileocolic anastomosis, with a partial exclusion of the final 10 centimeters of the terminal ileum, could be observed. In the animals from Group 4, the sectioning and closing of 10 distal centimeters of the terminal ileum, as well as a terminolateral anastomosis of the ileum with ascending colon, were performed. Group 1 was the control group, in which the rats were undertaken to only laparotomy and laparorrhaphy. At the end of eight weeks, all the rats from the four groups were killed and material was collected for exams. The biochemical exams included: albumin, aspartate-aminotransferase (AST), alanine-aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase, γ -glutamyltransferase, direct bilirubin, indirect bilirubin, urea, and creatinine. The liver, kidneys, and a segment of the terminal ileum were also collected for

anatomopathological analyses. The results were submitted to statistical analyses by means of the ANOVA, Kruskal-Wallis, Pearson, and Fisher exact tests.

Persistence in the varying degrees of fibrosis could be observed in the rats from groups 2, 3, and 4, with no significant difference amongst these groups. The control group did not present hepatic fibrosis. In the histology of the kidney and the terminal ileum, no differences could be identified among the four groups. Concerning the biochemical analyses, the values of AST, ALT, direct bilirubin, γ -glutamyltransferase, urea, and creatinine were greater in Group 4 as compared to the control group ($p < 0.05$). Group 4 presented urea and creatinine values that were higher than those from groups 2 and 3 ($p < 0.05$).

In conclusion, in male Wistar rats, the ileocolic partial shunt of the terminal ileum and the total exclusion of the final centimeters of the terminal ileum after internal biliary drainage of the extra-hepatic cholestasis did not alter the intensity of hepatic fibrosis. These procedures did not modify the morphology of the kidney or the terminal ileum. The total exclusion of the terminal ileum worsened the biochemical samples from the liver and kidney. No benefit in the ileocolic shunt in either the morphology or function of the liver and kidneys could be observed. The total exclusion of the terminal ileum after biliary drainage for obstructive cholestasis worsened renal biochemical samples.

3. Introdução

As doenças colestáticas ainda representam desafio na prática médica. Estão presentes em todos os grupos etários e causam morbidade e letalidade elevadas. Apesar do desenvolvimento de novos tratamentos, a evolução para cronificação e a necessidade de transplante hepático ainda atinge grande proporção desses indivíduos.

A evolução das doenças colestáticas para fibrose, cirrose hepática e suas complicações, além do desenvolvimento de alterações extra-hepáticas, como prurido, encefalopatia e doença óssea são aspectos conhecidos (1,2). Novos conhecimentos em relação à possível reversibilidade da fibrose, força a busca de soluções e o incremento na pesquisa desses problemas.

Hollandes *et al* (3) conduziram estudo, no qual excluíram os últimos 15 % do íleo terminal, em pacientes com colestase intra-hepática familiar (doença de Byler), como forma de diminuir a quantidade circulante de sais biliares, para reduzir o prurido. Esses autores perceberam melhora da função hepática na maioria dos indivíduos, mas o tempo de seguimento foi curto e o número de pacientes foi pequeno, além de ter como foco do estudo, o prurido, não a desordem hepática.

Com base nesse trabalho, conduzimos nossa tese de mestrado, com o objetivo de verificar o efeito da exclusão do íleo terminal nas provas de função hepática e na intensidade da fibrose hepática em ratas Wistar submetidas à ligadura do ducto hepático comum, com a ressecção dos últimos cinco centímetros do íleo terminal (4). Nesse estudo encontramos menor intensidade da fibrose hepática e valores menores de bilirrubina

indireta no grupo de ratas com exclusão do íleo terminal, em relação aos animais submetidos a ligadura do ducto hepático comum. Os resultados desse estudo trouxeram vários questionamentos, em especial, se com o restabelecimento do fluxo biliar, as diferenças encontradas tanto na parte histológica, quanto na bioquímica seriam mantidas.

A relevância do tema e, por conseguinte, do trabalho atual, justifica-se pelo reduzido número de opções terapêuticas, morbidade e letalidade desse grupo de afecções, principalmente quando em estádios avançados de hepatopatia, como cirrose e hipertensão porta, complicadas. Sabe-se, também, que tanto o rim, quanto o intestino são acometidos nas fases mais avançadas da colestase.

Essas afecções acarretam elevados custos financeiros e sociais. Em regiões mais pobres, o acesso a tratamentos avançados, como o transplante hepático, ainda é raro. Assim sendo, opções terapêuticas, mesmo paliativas, que possam melhorar os sintomas e a qualidade de vida são importantes. O atual trabalho verificou a viabilidade da exclusão ou a derivação de parte do íleo terminal como opção terapêutica para melhorar a intensidade da fibrose e as funções hepática e renal de ratos com ligadura do ducto hepático comum.

4. Objetivos

Avaliar e comparar os efeitos da drenagem biliar isolada ou associada a exclusão parcial e total do íleo terminal, em ratos submetidos a ligadura do ducto hepático nas:

- provas bioquímicas de função hepática e renal;
- intensidade da fibrose hepática;
- estrutura morfológica dos rins e do íleo terminal.

5. Revisão da Literatura

5.1 Colestase

Colestase é uma manifestação grave e frequente de doenças hepáticas (5). Corresponde a alterações bioquímicas, histológicas e clínicas, associadas a defeitos no transporte biliar desde o hepatócito até o intestino. Ela resulta de processos inflamatórios e degenerativos das vias biliares intra e extra-hepáticas, além de defeitos hereditários ou adquiridos no transporte biliar (1,5,6,7). Muitas dessas condições podem evoluir para cirrose e insuficiência hepática (1).

Algumas dessas condições associam-se a complicações extra-hepáticas, por vezes, tão graves quanto a hepatopatia em si. Entre as principais estão: o prurido, por vezes, incontrolável clinicamente, a fadiga crônica e doenças metabólicas ósseas como osteopenia e osteoporose (2,8).

Define-se colestase como a interrupção ou diminuição da excreção biliar, causada por distúrbio na excreção biliar no hepatócito, ou por algum processo obstrutivo em qualquer nível da via biliar, desde os canalículos biliares até os ductos biliares extra-hepáticos (7).

Colestase intra-hepática resulta da interrupção do fluxo biliar secundário a lesão dentro do fígado, podendo comprometer tanto o parênquima hepático, quanto os ductos biliares intra-hepáticos (7).

Colestase por oclusão extra-hepática indica que o bloqueio a fluxo biliar está fora do fígado, ao longo da via biliar extra-hepática. Por convenção pode ser denominada colestase obstrutiva (7).

Colestase aguda decorre de defeito agudo (dias a poucas semanas de duração), secundário a bloqueio completo do fluxo biliar, a dano no parênquima hepático (ex. colestase secundária a drogas), ou a obstrução completa da via biliar extra-hepática (ex. coledocolitíase) (7).

Colestase crônica é condição de longa duração, semanas, meses ou anos, podendo ser secundária a bloqueio completo ou incompleto do fluxo biliar ou a lesão hepatocelular (7).

Há que mencionar, que icterícia e colestase não são sinônimos. Pode haver colestase com ou sem icterícia, que é um sinal clínico. Na colestase, pode haver tanto o acúmulo de bilirrubina (bilirubinoestase), quanto de sais biliares (colatoestase) ou de ambos (7).

5.1.1 Excreção biliar

Bile é a principal via de excreção do colesterol, de fosfolípedes, de xenobióticos e outras substâncias tóxicas, além de participar da digestão de gorduras (5). É um complexo aquoso, com substâncias orgânicas e inorgânicas em suspensão ou dissolvidas. Os principais constituintes orgânicos são: sais biliares, fosfolípedes, colesterol, proteínas e pigmentos biliares (9). Sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{++}) e bicarbonato (HCO_3^-) apresentam concentrações mais elevadas na bile que no plasma (9).

Pode-se dividir a excreção biliar em dois componentes principais: a bile canalicular e a bile ductal. Na bile canalicular ocorre absorção e excreção de sais biliares e outros íons orgânicos, gerando gradiente osmótico, atraindo água e íons. Na bile ductal ocorrem modificações na concentração de íons e água nos ductos biliares, secundários a estímulos

hormonais e neuroendócrinos (9,10). A bile canalicular é formada por dois componentes: a fração dependente de sais biliares e a fração independente de sais biliares (9).

Para que a excreção de bile ocorra, são necessárias membranas celulares especializadas, células polarizadas, proteínas carreadoras e uma rede de canalículos e ductos que transportem e influam na composição biliar. O aparelho de excreção biliar consiste de ductos convergentes, que iniciam nos canalículos biliares, seguidos pelos ductos biliares e que terminam no ducto biliar comum (9). Os canalículos são pequenos ductos delimitados pela membrana apical de dois hepatócitos adjacentes (9), já os ductos biliares são formados pela união de colangiócitos e possuem membrana própria. Nessa rede de canalículos e ductos, são formados cerca de 30 % do volume final da bile, havendo alteração na composição biliar, principalmente em relação à água e eletrólitos (9). Completando o aparelho de excreção biliar, há membranas celulares polarizadas e especializadas, tanto nos hepatócitos, quanto nos colangiócitos. São esses os locais de troca de íons, sais biliares, fosfolípedes e outros elementos constituintes da bile.

Nos hepatócitos, podem-se distinguir três diferentes regiões de membrana. A membrana sinusoidal, que cobre 37 % da superfície celular, está em íntimo contato com os sinusoides, sendo local de intensa troca de substâncias entre o sangue e o hepatócito (5,9).

A membrana lateral cobre 50 % da superfície do hepatócito. Nessa região há áreas de adesão entre hepatócitos adjacentes, presença de *gap-junctions* (junções comunicantes) e *tight-junctions* (junções estreitas). Nesse local da membrana, há contato com o espaço de Disse e ocorre intensa troca iônica e de fluidos. As regiões sinusoidal e lateral formam a membrana basolateral (5,6,9).

A última região da membrana hepatocitária é denominada apical ou canalicular. Ela constitui a menor parte da membrana e é responsável pela excreção de sais biliares e ânions

orgânicos para os canalículos biliares. Nessa região da membrana hepatocitária, é gerado o gradiente osmótico, que resultará em fluxo de água, eletrólitos e solutos menores para dentro dos canalículos biliares, formando a bile (5,6,9).

Os principais componentes do gradiente osmótico da bile são os sais biliares, principalmente, os conjugados (5,6,9-11). Esses compostos são concentrados até 1000 vezes na bile (5). Assim sendo, a bile é um composto aquoso, gerado por uma força osmótica, resultante da concentração de sais biliares nos canais biliares, desde os canalículos.

Sais biliares conjugados, juntamente com Na^+ são transportados através da membrana sinusoidal dos hepatócitos, por meio da proteína carreadora de membrana NTCP (proteína de cotransporte do taurocolato de sódio - *sodio-taurocholate cotransport protein*). Sais biliares não conjugados e outros íons orgânicos, como bilirrubina, são transportados para o hepatócito por outra proteína carreadora de membrana, OATP2 (*organic anion transporting polypeptide 2* – polipeptídeo de transporte de ânions orgânicos 2). Essas duas proteínas são as principais responsáveis pela absorção dos sais biliares conjugados e outros íons orgânicos, que geram força de atração iônica e resultam na formação inicial da bile (11).

No citoplasma do hepatócito, os sais biliares e os demais íons orgânicos são transportados através de uma rede de microtúbulos, vesículas e microfilamentos do aparelho de Golgi. Essas substâncias atingem a membrana apical do hepatócito e desse local são excretadas no canalículo biliar (9).

Na membrana apical do hepatócito, sais biliares e demais constituintes orgânicos da bile são excretados, mediante transporte ativo. Sais biliares são transportados pela proteína carreadora BSEP (*bile salt export pump* – bomba de exportação de sais biliares) e os

demais íons orgânicos excretados pela MRP2 (*multidrug resistance associated protein 2* – proteína associada a resistência a multidrogas 2). Pelo mecanismo de *flip-flop*, utilizando uma enzima da família *ABC-transporter* (proteínas de transporte ligadas ao ATP), denominada MRD3 (*multidrug resistance P-glycoprotein 3* – P-glicoproteína de resistência a multidrogas 3), são excretados às expensas de ATP, fosfolípedes e fosfaditilcolina, que são responsáveis pela formação de micelas, nas quais ficam dissolvidos os sais biliares e o colesterol (11).

Apesar de conter 3 % a 5 % da massa celular hepática, o epitélio dos ductos biliares (colangiócitos), principalmente dos intra-hepáticos médios e grandes, desempenha papel relevante na excreção biliar. Neles estão contidas numerosas proteínas de transporte, dentre elas, a proteína de troca iônica 2 (*AE2 – anion exchanger 2* – proteína 2 de troca de ânion), responsável pelo mecanismo de troca de cloro/bicarbonato ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$), a principal força de geração de potencial osmótico independentemente de sais biliares - “fluxo biliar independente de sais biliares” e a ASBT (*apical Na⁺-dependent bile salt transporter* – proteína apical de transporte de sais biliares dependente de Na^+), cuja função é reabsorver sais biliares (10).

5.1.2 Ciclo êntero-hepático dos sais biliares

Ciclo êntero-hepático ou circulação êntero-hepática é o movimento das moléculas de sais biliares do fígado para o intestino e de volta ao fígado. Os sais biliares são excretados pelos hepatócitos através da membrana canalicular, passam pelos ductos biliares

e seguem pelo intestino, onde são reabsorvidos ativamente no íleo terminal ou passivamente no intestino grosso e retornam ao hepatócito pelo sangue porta (12,13,14,15).

A circulação êntero-hepática permite a manutenção do *pool* de sais biliares, uma vez que grande parte deles é reabsorvida no íleo terminal e retorna ao fígado, resultando em economia de energia. A circulação êntero-hepática envolve a biossíntese dos sais biliares, a partir do colesterol, a sua conjugação com glicina ou taurina, a sua excreção para a árvore biliar, a reabsorção no íleo terminal e cólon e o retorno pela circulação porta até os hepatócitos (12,14,15).

São necessárias, essencialmente, duas proteínas de transporte no íleo terminal e duas no hepatócito, para que a circulação êntero-hepática possa ocorrer. A absorção no íleo terminal é mediada por um transportador dependente sódio (Na^+) (*ASBT – apical bile salt transporter* – proteína apical de transporte de sais biliares dependente de Na^+), enquanto a liberação dos sais biliares do ileócito para a circulação porta é mediada por um complexo heterodímero de duas proteínas *OST α /OST β* (*organic solut transporter α/β* – transportador de soluto orgânico α/β). Os sais biliares são absorvidos na membrana basolateral do hepatócito por transporte ativo, mediado por Na^+ via *NTCP (Na^+ -taurocholate cotransporting polypeptide* – proteína de cotransporte do taurocolato de sódio). Absorção independente de sódio pode também ocorrer em menor escala mediada pelo *OATP (*organic anion transporter polypeptide* – polipeptídeo de transporte de ânion orgânico)*. Na circulação êntero-hepática, os sais biliares são excretados para os canais biliares por transporte ativo, por meio da *BSEP (*bile salt export pump* – bomba de exportação de sais biliares)* (12,14,15).

A base para a circulação êntero-hepática é o equilíbrio entre a síntese de sais biliares e sua preservação no intestino. Esses dois estádios, síntese e preservação, são regulados

pela ativação dos receptores nucleares FXR (receptor X de farnesoide) e PXR (receptor X de pregnana), que inibem a síntese da enzima 7α -hidroxilase, responsável pela síntese de sais biliares a partir do colesterol. Esses receptores nucleares são regulados pela concentração de sais biliares no hepatócito ou no sangue, realizando uma contrarregulação negativa (15,16).

5.1.3 Mecanismos de colestase

As afecções coleestáticas representam um grupo extenso e todos os grupos etários são atingidos. As causas variam de defeitos congênitos e afecções genéticas, a tumores das vias biliares ou distúrbios autoimunes, infecciosos e hormonais.

Podem-se distinguir duas formas principais de colestase: intra-hepática e extra-hepática e duas categorias principais: defeitos inatos e defeitos adquiridos da excreção biliar (11,14,17,18).

A inibição da excreção biliar pode originar-se por obstrução mecânica, alterações imunitárias das vias biliares intra ou extra-hepáticas, defeitos genéticos nas proteínas de transporte e alterações secundárias a drogas, hormônios, sepse e hepatites virais. (11,18).

Observam-se três locais principais de inibição da excreção biliar:

- _ Não hepatocelular, decorrente de obstrução mecânica por tumor, cálculos ou processo inflamatório (pós-hepatocelular); mudanças hemodinâmicas (pré-hepatocelular).
- _ Hepatocelular por inibição da formação da bile, inibição da biotransformação, inibição do transporte biliar, piora da capacidade de concentrar a bile pelo aumento da permeabilidade.
- _ Ductular por refluxo devido ao aumento da permeabilidade nos ductos biliares intra-hepáticos. (18).

Dentre os defeitos inatos da excreção biliar, destacam-se a colestase intra-hepática familiar progressiva (PFIC), a colestase intra-hepática benigna recorrente (BRIC), a fibrose cística. Entre os defeitos da excreção biliar adquiridos estão a inflamação, as toxinas, as drogas e os hormônios (11,14,15,17).

Na colestase por obstrução do fluxo biliar, diferenciam-se formas congênitas e adquiridas. Entre os defeitos congênitos estão a colestase intra-hepática familiar progressiva (PFIC), síndrome de Dubin-Johnson e a fibrose cística. Nas formas adquiridas: nos ductos biliares pequenos: cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária e síndromes ductopênicas; nos ductos hepáticos maiores: cálculos, tumores, colangite esclerosante primária e atresia de vias biliares (11,14,15,17,19,20).

Como resultado da colestase, independentemente do mecanismo, observa-se o acúmulo de sais biliares, colesterol e outros componentes da bile no hepatócito, gerando lesões na membrana, que pioram a sua função, diminuem a produção de sais biliares e alteram o ciclo entero-hepático, por conseguinte, a composição do sangue porta. Provoca ainda, ativação de células e mediadores inflamatórios, resultando, em longo prazo, em fibrose e cirrose hepática (18,19).

Mecanismos de adaptação ao acúmulo de sais biliares aparecem no fígado, rins e intestino delgado. O principal objetivo é diminuir a absorção e aumentar a excreção desses compostos. No fígado, aparecem mecanismos que diminuem a absorção pela membrana basolateral do hepatócito e aumenta o refluxo de sais biliares para o sangue sinusoidal (11). Em nível molecular, ocorre aumento ou diminuição da produção de proteínas carreadoras de sais biliares nas membranas dos hepatócitos e na regulação da produção de sais biliares por receptores localizados no núcleo do hepatócito (11).

A inibição da atividade de NTCP e OATP2 reduz a absorção dos sais biliares e outros íons orgânicos, aumentando a atividade das proteínas MRP3 e MRP4 (normalmente expressas em níveis muito baixos, na membrana basolateral), transportando sais biliares, glutatona e demais íons orgânicos para a circulação sanguínea (11). Os receptores nucleares FXR (receptor farnesoide X), PXR (receptor pregnana X) e CAR (receptor constitutivo de androstana), atuam na regulação das proteínas carreadoras de sais biliares e demais íons orgânicos que compõem a bile (11).

5.2 Fibrose hepática

A fibrose hepática é um processo dinâmico, que envolve alterações moleculares e celulares complexas, resultantes da ativação de mecanismos de reparo e cicatrização, em resposta a injúria tissular (21). Trata-se de um processo similar ao da cicatrização (21). Fibrose hepática é a lesão característica da hepatopatia crônica e pode evoluir para cirrose, insuficiência hepática, hipertensão porta e carcinoma hepatocelular (22,23).

Até mesmo lesões hepáticas agudas podem ativar mecanismos de geração de fibrose. Para que a fibrose ocorra, entretanto, é necessário que o estímulo nocivo, causado por infecção, drogas, desordens metabólicas ou alterações autoimunes, seja mantido continuamente (22,24). A fibrose pode progredir rapidamente em poucas semanas ou meses, como pode acontecer na hepatite medicamentosa ou na recidiva de hepatite viral C, após transplante hepático (24).

5.2.1 Definição

Fibrose hepática é caracterizada pelo acúmulo de colágeno e de outros componentes da matriz extracelular no interstício hepatocitário, em resposta a estímulo nocivo crônico, levando a alteração da arquitetura e da função do fígado. O processo de fibrose hepática ocorre em três fases principais: inflamação, síntese de colágeno e de outros componentes da matriz extracelular e remodelação tissular. Soma-se a elas a capilarização dos sinusoides hepáticos (21,25,26).

A fase de inflamação consiste em resposta a estímulo nocivo, com a produção de citocinas e quimiocinas, originadas de células de Kupffer, linfócitos, células endoteliais dos sinusoides, hepatócitos e plaquetas, com consequente ativação dos miofibroblastos e principalmente, das células estreladas hepáticas, responsáveis pela síntese dos elementos da matriz extracelular, resultando na fase de síntese de matriz extracelular. Na fase de remodelação tissular, proteínas de degradação da matriz são produzidas pelas células de Kupffer e pelos miofibroblastos, assim que os estímulos nocivos diminuem ou cessam. A capilarização dos sinusoides consiste na diminuição das fenestrações das células do endotélio sinusoidal, levando a alterações na configuração dos sinusoides, somada a formação de membrana basal no espaço de Disse, provocando o aumento da pressão porta. Alguns autores atribuem a esse fato o início da hipertensão porta (24,26).

5.2.2 Mecanismo de lesão hepática

Após dano hepático agudo, ocorre a regeneração do parênquima hepático, com a substituição de células necrosadas ou apoptóticas e resolução do processo inflamatório,

com mínima deposição de matriz extracelular. Caso o estímulo persista, a substituição de elementos celulares por matriz extracelular torna-se intensa, resultando em fibrose (22).

Independentemente da causa da lesão hepática, há dois fenômenos para a gênese da fibrose hepática: apoptose dos hepatócitos e ativação dos miofibroblastos, principalmente, as células estreladas hepáticas (22,23,24,26,27,28).

A apoptose é um mecanismo comum de morte celular programada. Em condições normais, após ocorrer a apoptose, os corpos apoptóticos resultantes são fagocitados e eliminados pelas células de Kupffer e por outros fagócitos do tecido hepático. Quando há excesso de estímulos nocivos contínuos e persistentes, reduz-se a capacidade de eliminação desses elementos, permitindo a fagocitose dos corpos apoptóticos pelas células estreladas hepáticas, o que resulta em sua ativação, com aumento da produção de citocinas e fatores inflamatórios. Essa sequência interfere na produção de matriz extracelular, resultando em fibrose hepática e até cirrose (21,23,27,28).

Foi mostrado em várias doenças colestáticas e em modelos experimentais de colestase e fibrose hepática por ligadura do ducto hepático, que o acúmulo de sais biliares nos hepatócitos favorece a morte celular por apoptose, pela ativação de receptores Fas e TRAIL - 1 e 2 (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* – indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral). Esses receptores ativam a cascata de reações enzimáticas, cujo resultado é disfunção mitocondrial e do retículo endoplasmático, alterações na permeabilidade lisossomal, danos no DNA do núcleo celular e culminando com a fragmentação celular e a formação dos corpos apoptóticos (27,29).

A fibrogênese hepática envolve a apoptose de hepatócitos, recrutamento de células inflamatórias, células de Kupffer, células estreladas hepáticas e plaquetas, resultando na

produção de citocinas e ativação dos miofibroblastos, com a produção de excesso de matriz extracelular (22,23, 24,25,26).

As citocinas estão envolvidas no processo de ativação dos miofibroblastos, na angiogênese e, conseqüentemente, na alteração estrutural dos sinusoides hepáticos e em todo processo inflamatório, que resultará na fibrose hepática. Nesses processos, destacam-se a TGF β (*transforming growth factor β* – fator de transformação do crescimento β) e a PDGF (*platelet derived growth factor* – fator de crescimento derivado das plaquetas) (26,30,31). Nas alterações relativas a angiogênese e capilarização dos sinusoides hepáticos a angiotensina II está associada a essas citocinas, contribuindo para a instalação da hipertensão porta (30,31).

Os miofibroblastos ativados são providos de movimentos, por meio da actina, presente na parede celular. Migram para o parênquima hepático, onde produzem colágeno e demais proteínas da matriz extracelular. Muitos atribuem a origem do miofibroblasto a alteração do fenótipo de células presentes no fígado, como células estreladas hepáticas (lipócitos ou células de Ito), fibroblastos circulantes, células endoteliais hepáticas, células derivadas da medula óssea circulantes no tecido hepático e colangiócitos. Entretanto, apesar da possibilidade de transformação de todos esses tipos celulares, estudos comprovaram ser a célula estrelada hepática, a principal fonte de miofibroblasto ativado (26,32,33).

As fases de fibrose hepática estão de acordo com as fases evolutivas da célula estrelada hepática. Podem-se distinguir três fases evolutivas: iniciação, perpetuação e resolução ou degradação da matriz extracelular. As duas primeiras compõem a chamada ativação da célula estrelada (24,34). A fase de iniciação é um estágio pré-inflamatório, referente a alterações fenotípicas precoces na célula estrelada hepática, que responde aos

estímulos parácrinos das células de Kupffer, células endoteliais e hepatócitos em apoptose e a citocinas, principalmente, TGF β ₁ e PDGF (24,34).

A fase de perpetuação envolve pelo menos seis alterações na forma e comportamento da célula estrelada. As alterações estruturais são: proliferação, quimiotaxia, fibrogênese, contratilidade, degradação da matriz extracelular e perda de retinoides (24,34).

A célula estrelada produz metaloproteínas (MMP), proteínas responsáveis pela degradação da matriz extracelular. Durante a fase de perpetuação, a célula estrelada inibe a ação dessas MMPs por meio da secreção das TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases* – inibidores tissulares de metaloproteinases) (24,26,34).

A última fase é a resolução, refere-se a inativação da célula estrelada, ou pela redução do número de células ativadas ou por apoptose em resposta a diminuição do estímulo nocivo. Essa fase é mediada pela célula NK (*natural killer*) (34).

5.2.3 Reversibilidade da fibrose hepática

Apesar de alguns autores usarem os termos fibrose e cirrose hepática como sinônimos, há que distingui-los (35,36,37). Fibrose hepática consiste na deposição excessiva de matriz extracelular em resposta a estímulos nocivos crônicos, cirrose consiste em um estado crônico, difuso, caracterizado por fibrose hepática, nódulos de regeneração, alteração da arquitetura lobular e formação de derivações vasculares entre os ramos da artéria hepática e da veia porta com ramos da veia hepática. Tais derivações são os achados fisiopatológicos essenciais na cirrose (36,37).

Trabalhos recentes atestam a reversibilidade da fibrose hepática em pacientes com doença avançada (22,35,36,37,38). Ainda que novas drogas antifibróticas estejam sendo testadas, a retirada do fator causal da fibrose é fundamental nesse tratamento (21,22,35,36,37,38).

Muitos autores preferem o termo regressão da fibrose ao termo reversão (35,36,37). A retirada do fator causal da fibrose pode levar à diminuição ou parada de evolução, como se observa nas hepatites virais tratadas (35,36,37). Estabelecida a cirrose, não há mais regressão do processo, mesmo se for retirado o fator causal (35,36,37,38).

6. Método

6.1.1 Amostra

Foram seguidas as recomendações do CETEA (Comitê de Ética em Experimentação Animal) da UFMG, no cuidado e manejo dos animais. Este projeto foi aprovado pela Câmara do Departamento de Cirurgia da Faculdade de medicina da UFMG e pelo CETEA/UFMG (Apêndice 1).

Foram estudados trinta e dois ratos Wistar, machos, pesando entre 200 g e 300 g. Todos os animais permaneceram sob as mesmas condições de alojamento e foram tratados pelo mesmo profissional, no Biotério do Departamento de Parasitologia do ICB (Instituto de Ciências Biológicas) da UFMG. Eles foram nutridos com ração para ratos (Nuvilab® - Nuvital – Colombo, PR) e tendo acesso livre a água. Os animais foram mantidos em número quatro por gaiola e distribuídos em quatro grupos (n = 8, cada grupo):

- _ Grupo 1: Controle
- _ Grupo 2: Drenagem biliar
- _ Grupo 3: Drenagem biliar + Derivação ileocólica
- _ Grupo 4: Drenagem biliar + Exclusão do íleo terminal.

Todos os animais que morreram no pós-operatório da primeira ou da segunda operação foram excluídos e substituídos. Essas mortes ocorreram, com maior frequência, nos primeiros dias pós-operatórios, não comprometendo o estudo. Os animais que apresentaram recanalização do ducto hepático ou apresentaram fístulas espontâneas entre o coto proximal do ducto hepático comum e estômago, ou duodeno foram excluídos do estudo e substituídos. A perda de animais não foi superior a 20 %, predominando, após o segundo procedimento cirúrgico.

6.2 Procedimentos

Os grupos 2, 3 e 4 foram submetidos a dois procedimentos cirúrgicos, enquanto o Grupo 1, apenas a laparotomia e laparorráfia. Todos os ratos foram mortos após oito semanas, quando foi colhido material para exames bioquímicos e foram retirados fígado, rins e íleo terminal de cada animal, para análise histológica.

Foram respeitados os princípios de assepsia e antisepsia durante os procedimentos. Utilizaram-se fios, luvas e instrumental cirúrgico estéreis. Empregou-se álcool etílico a 70% na antisepsia.

Todos os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos anestésicos e operados pelo mesmo cirurgião. Materiais cirúrgicos, fios e técnica foram padronizados. Utilizaram-se gorros, luvas, máscara e avental cirúrgicos.

Os animais foram anestesiados e imobilizados com esparadrapo, sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito dorsal horizontal. Durante todo o período de anestesia, os ratos foram observados quanto às frequências respiratória e cardíaca, movimentos respiratórios e movimentação voluntária, bem como a necessidade de realizar repiques de anestésicos. Após o fim de cada procedimento cirúrgico, cada animal foi mantido em local ventilado e isolado, até a recuperação pós-anestésica.

6.2.1 Anestesia

Todos os animais receberam anestesia intramuscular. Foram utilizados o anestésicos xilazina a 2% (Virbac do Brasil - Jurubatuba SP) e quetamina a 10% (Ceva - Paulínea SP), nas doses de 0,15 mg/kg e 0,25 mg/kg, respectivamente.

6.2.2 Tricotomia abdominal

Os animais foram submetidos a tricotomia abdominal, por meio de raspagem com lâmina. A tricotomia foi necessária apenas na primeira operação, não havendo necessidade nos procedimentos subsequentes. Figura 1.

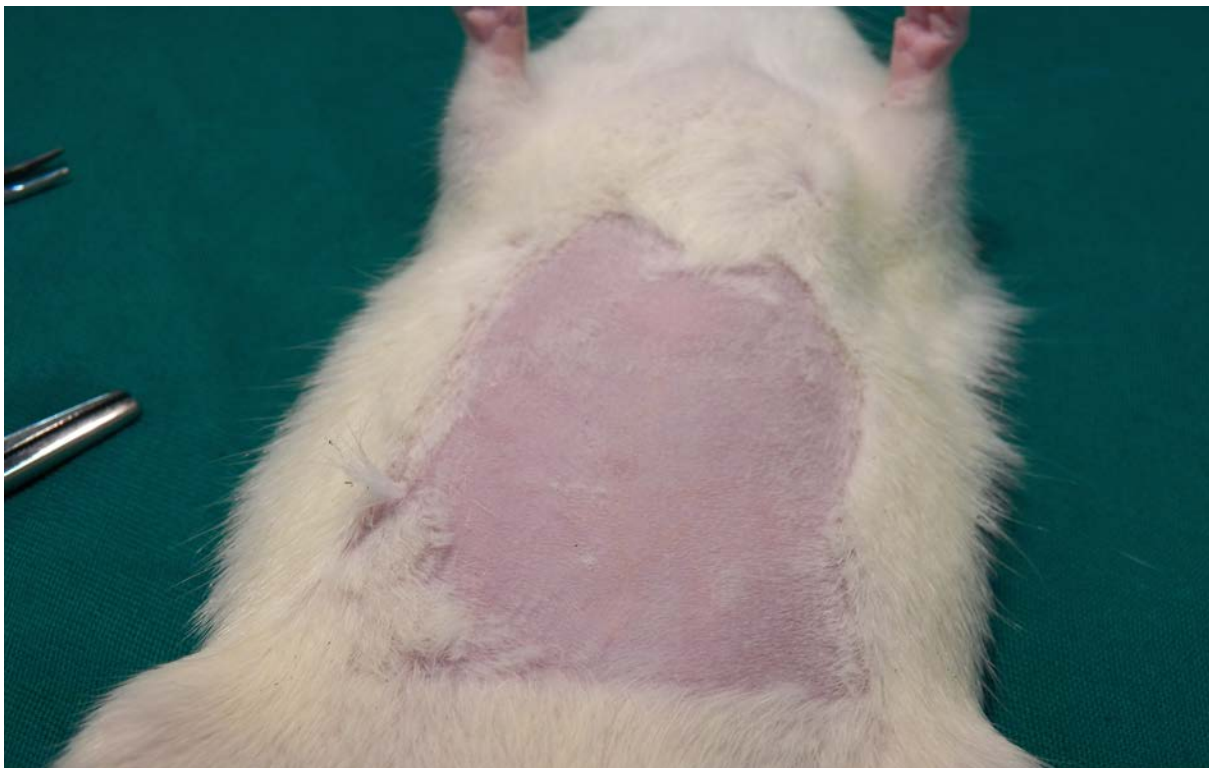


Figura 1. Tricotomia abdominal.

6.2.3 Procedimentos cirúrgicos

Os animais do Grupo 1 foram submetidos a laparotomia e laparorrafia, enquanto os animais dos Grupos 2, 3 e 4 foram submetidos a laparotomia e ligadura dupla com fio de seda 4-0 (Bioline – Anápolis, GO), seguido de secção do ducto hepático comum, entre as

ligaduras. Após quatro semanas, todos os animais, exceto os do Grupo 1, foram relaparotomizados e submetidos à drenagem biliar interna, que consistiu em colocação de tubo de nelaton, com perímetro de 4 mm (4 Fr) (Mark Med - Bragança Paulista, SP), entre o saco ductal, remanescente, e o duodeno.

Nos animais do Grupo 3 realizou-se, ainda, anastomose ileocólica com um centímetro de extensão, com exclusão parcial dos últimos 10 cm do íleo terminal. Nos animais do Grupo 4, os últimos 10 cm do íleo terminal foram ligados e desconectados do trânsito intestinal e a seguir, realizou-se anastomose ileocólica, configurando a exclusão completa desse segmento de íleo terminal.

6.2.1.1 Técnica Cirúrgica

6.2.1.1.1 Descrição dos procedimentos cirúrgicos

Ligadura do ducto hepático (grupos 2, 3 e 4):

Laparotomia mediana;

Localização do ducto biliar e sua dissecação;

Ligadura dupla do ducto biliar com fio de seda 4-0 (Bioline - Anápolis, GO);

Secção do ducto entre as ligaduras;

Laparorrafia (plano musculoaponeurótico) com fio de náilon 2-0 (Bioline - Anápolis, GO);

Sutura de pele com fio de náilon 2-0 (Bioline - Anápolis, GO), Figura 2.

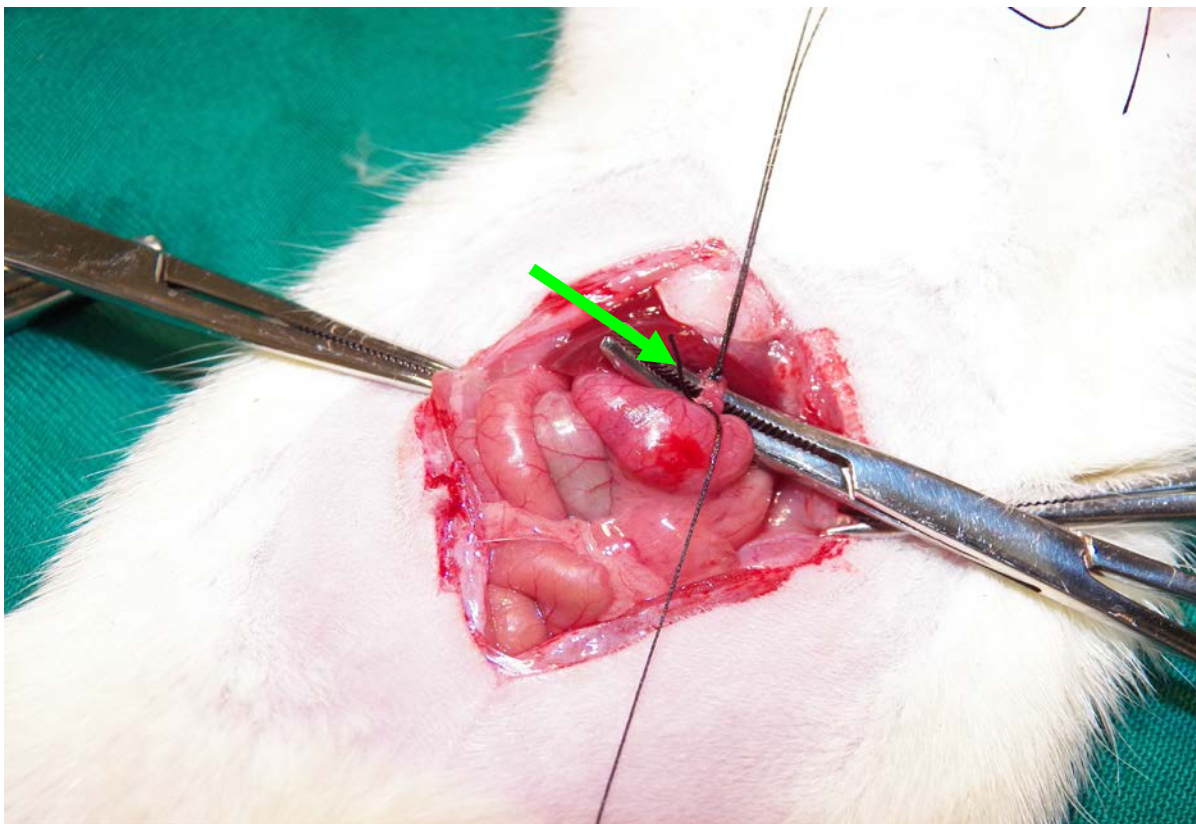


Figura 2. Ligadura do ducto hepático comum com fio de seda 4-0 (Bioline - Anápolis, GO) (seta verde).

Derivação biliodigestiva (Grupos 2, 3 e 4):

Laparotomia mediana.

Localização do coto proximal do ducto hepático e do duodeno.

Abertura do coto do ducto hepático e passagem de cateter de nelaton 4 Fr (Mark Med - Bragança Paulista, SP) e sua fixação dupla com fio de seda 4-0 (Bioline - Anápolis, GO).

Sutura em bolsa na parede duodenal com fio de poliglactina 910 5-0 (Bioline - Anápolis, GO).

Duodenotomia e introdução no duodeno da outra extremidade do cateter de nelaton 4 Fr ((Mark Med - Bragança Paulista, SP).

Fixação do cateter de nelaton ao duodeno, por meio da sutura em bolsa.

Laparorrafia (plano musculoaponeurótico) com fio de náilon 2-0 (Bioline - Anápolis, GO).

Sutura de pele com fio de náilon 2-0 (Bioline - Anápolis, GO), figuras 3 e 4.

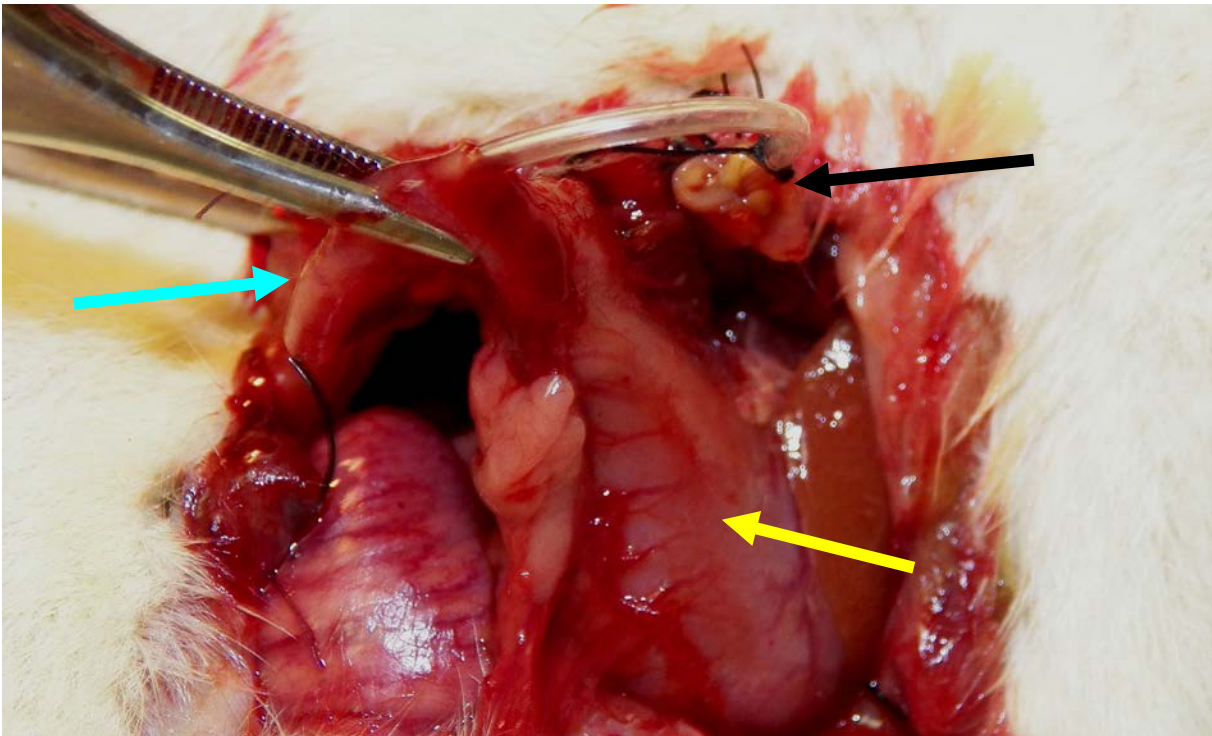


Figura 3. Derivação biliodigestiva. Posicionamento e fixação de cateter de nelaton 4 Fr no coto do ducto hepático (seta preta) e duodeno (seta azul). Estômago (seta amarela).



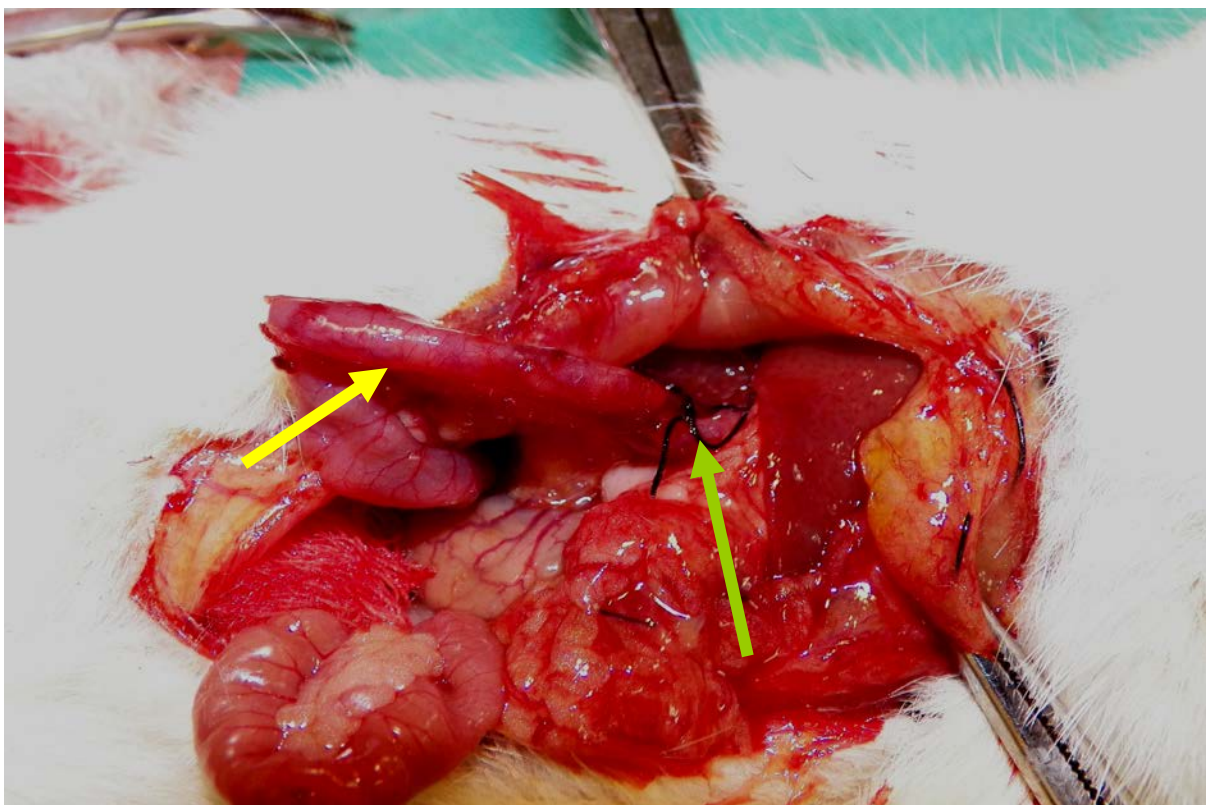


Figura 4. Resultado final da derivação biliodigestiva. Duodeno (seta amarela), derivação biliodigestiva (seta verde).

Derivação biliodigestiva e anastomose ileocólica laterolateral (Grupo 3)

Antissepsia.

Laparotomia mediana.

Realizada derivação biliodigestiva, como descrito acima;

Identificado o íleo terminal e medidos 10 cm a partir da papila ileocecal;

Confeccionada anastomose do íleo com o cólon ascendente, laterolateral, de 1 cm de extensão em plano único com fio de poliglactina 910 5-0 (Bioline - Anápolis, GO).

Laparorrafia com fio de náilon 2-0 (Bioline - Anápolis, GO).

Sutura de pele com fio de náilon 2-0 (Bioline - Anápolis, GO), Figura 5.

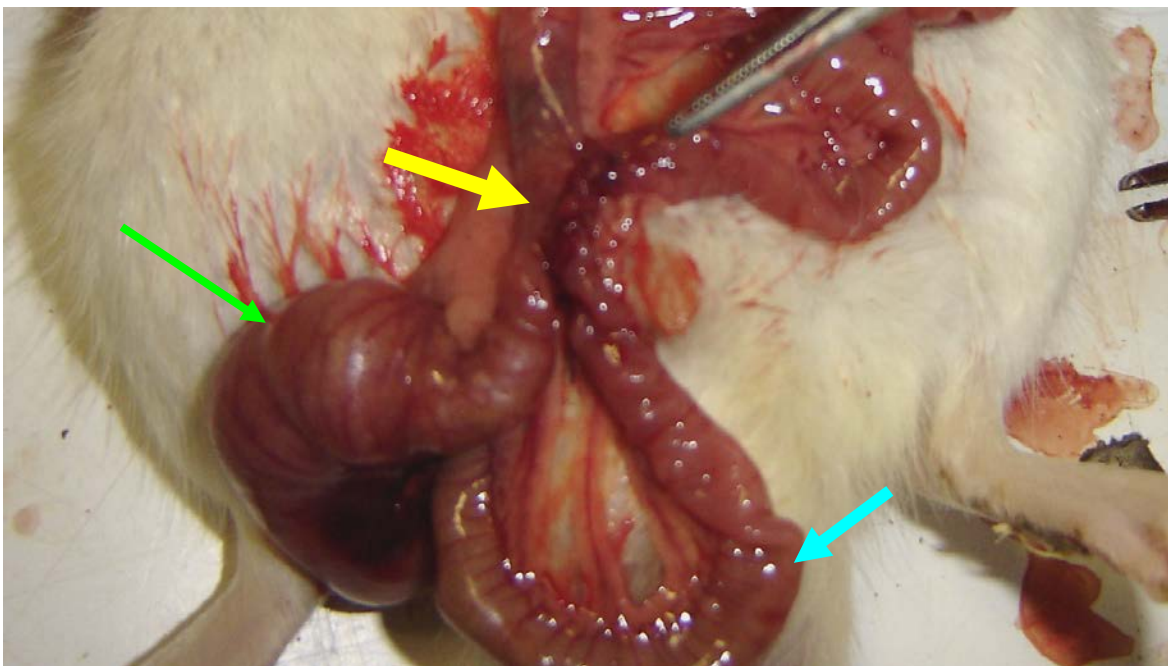


Figura 5. Anastomose ileocólica laterolateral entre o íleo a 10 cm da papila ileocecal e o cólon ascendente (seta amarela). Ceco (seta verde), íleo terminal (seta azul).

Derivação biliodigestiva e anastomose ileocólica, com exclusão ileal (Grupo 4):

Antissepsia.

Laparotomia mediana.

Realizada derivação biliodigestiva, conforme descrito anteriormente.

Identificado o íleo terminal e medidos 10 cm a partir da papila ileocecal;

Ligadura dos vasos do mesentério com seda 4-0 (Bioline - Anápolis, GO), secção do íleo terminal a 10 cm do íleo terminal e ligadura dupla desse segmento, com fio de seda 4-0 (Bioline - Anápolis, GO).

Realizada anastomose terminolateral do segmento proximal do íleo com o cólon ascendente, em plano único com fio de poliglactina 910 5-0 (Bioline - Anápolis, GO).

Laparorrafia com fio de náilon 2-0 (Bioline - Anápolis, GO).

Sutura de pele com fio de náilon 2-0 (Bioline - Anápolis, GO). Figuras 6.

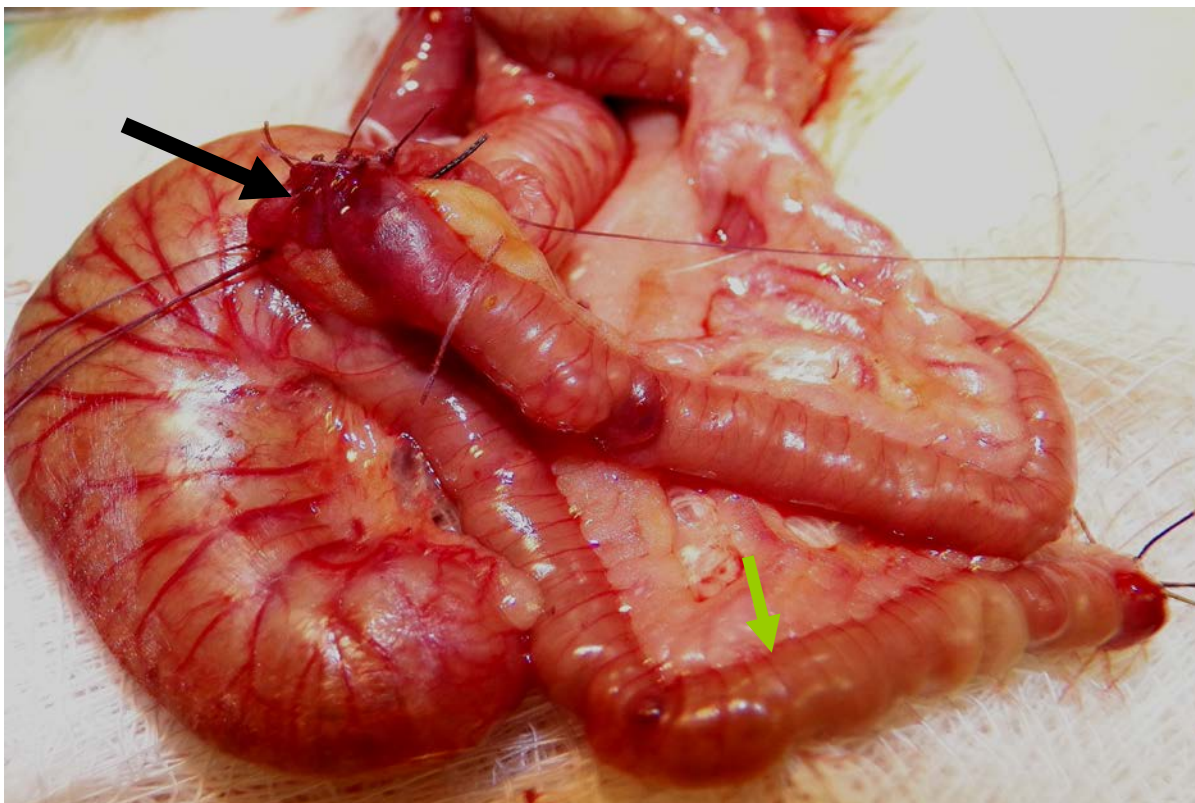


Figura 6. Anastomose ileocólica, com exclusão do íleo terminal. Anastomose ileocólica terminolateral (seta preta). Íleo terminal excluído (seta verde).

6.3 Coletas das amostras de tecidos e morte dos animais

Ao final de oito semanas, todos os animais do estudo foram mortos. Antes da morte, procedeu-se a coleta de sangue, fígado, rins e íleo terminal, para exames. Estes procedimentos foram simultâneos.

A morte dos animais seguiu as normas do CETEA UFMG. Os ratos foram anestesiados com xilasina a 2% (Virbac do Brasil - Jurubatuba SP) e quetamina a 10% (Ceva - Paulínea, SP), por via intramuscular e submetidos a laparotomia em cruz, para melhor exposição da cavidade abdominal. A morte se deu por hipovolemia, provocada pela retirada de 6 ml de sangue por punção cardíaca e drenagem do sangue remanescente através de abertura da veia cava caudal infrarrenal. Este sangue foi recolhido para exames bioquímicos.

Em todos os animais, puncionou-se o coração, com agulha 25/7 G (subxifoidea) e foram colhidos 6 ml de sangue, imediatamente transferidos para tubos plástico sem anticoagulante (Eppendorf do Brasil[®] - São Paulo, SP) e protegidos da luz, por papel alumínio.

A seguir, inventariou-se a cavidade, observando aspectos macroscópicos do fígado, da hepaticoduodenostomia, a presença da cânula na derivação biliodigestiva, além do aspecto macroscópico dos rins, íleo terminal e da anastomose ileocólica.

Foram retirados o fígado, ambos os rins e segmento distal do íleo terminal de todos os animais, para estudo histológico. Esses espécimes foram lavados com água corrente e colocados em recipientes com solução aquosa de formaldeído a 10 %, tamponada com fosfato de sódio (Analab - Juiz de Fora, MG).

6.4 Análise bioquímica

As amostras de sangue coletadas, foram encaminhadas, imediatamente ao mesmo laboratório de patologia clínica, para processamento e realização dos seguintes exames: albumina, bilirrubina direta, e indireta, AST, ALT, fosfatase alcalina, γ GT, ureia e

creatinina. Todos esses exames foram feitos no mesmo aparelho - *Cobas Mira Plus*® (*Roche Diagnostic Systems* - Nutley –New Jersey).

O valor de cada variável bioquímica foi medido automaticamente pelo aparelho *Cobas Mira Plus*® (*Roche Diagnostic Systems* - Nutley –New Jersey), no soro, obedecendo às reações e os métodos de leitura pré-estabelecidos pelo fabricante do aparelho. As leituras foram feitas pelas reações abaixo:

- _ Albumina – colorimétrico – verde de bromocresol;
- _ AST – cinético ultravioleta;
- _ ALT – cinético ultravioleta;
- _ Bilirrubinas – Sims-Horn;
- _ Fosfatase alcalina – cinético;
- _ γ GT – cinético;
- _ Creatinina – cinético;
- _ Ureia – cinético ultravioleta.

6.5 Análise histológica

Foi realizada análise macroscópica dos órgãos buscando-se detectar alterações estruturais. A seguir, o fígado, os rins e o íleo terminal de cada animal de todos os grupos foram cortados e devidamente processados para análise histológica.

Após a fixação em parafina (Inlab - São Paulo, SP), realizaram-se cortes de 5 μ m com micrômetro (Koch - São Paulo, SP). Os tecidos fixados foram corados com hematoxilina e eosina (Inlab - São Paulo, SP), tricrômico de Gomori (Inlab - São Paulo, SP) e PAS (ácido periódico de Shiff - Inlab - São Paulo, SP).

A avaliação histológica foi feita por um único patologista, que desconhecia o grupo a que pertencia cada tecido.

Verificaram-se o grau de fibrose hepática e alterações da histologia renal e do íleo terminal. Em relação à fibrose hepática, utilizou-se classificação semiquantitativa, de acordo com a intensidade e o acometimento difuso em cada amostra. Foi adotada a seguinte escala de fibrose hepática de Ishak *et al* (39,40):

- 0 _____ ausência de fibrose
- 1 _____ pouca fibrose
- 2 _____ fibrose entre pouca e moderada
- 3 _____ fibrose moderada
- 4 _____ fibrose entre moderada e intensa
- 5 _____ fibrose intensa
- 6 _____ cirrose.

Na avaliação histológica de rim e íleo terminal buscaram-se alterações qualitativas, pois não há na literatura escore específico para quantificar tais alterações.

6.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa *SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)*, versão 15.0. Foram utilizados os testes de análise de variância ANOVA e de Kruskal-Wallis, para comparação de medianas dos exames bioquímicos, por serem testes que podem comparar dois ou mais grupos. Para valores paramétricos utilizou-se a análise de variância ANOVA e para os não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis. Utilizaram-se testes como os de Levene, Kolmogorov-Simonov, Shapiro-Wilk, para

determinar se os valores eram ou não paramétricos e dessa forma aplicar o teste estatístico mais adequado, como pode ser visto na Tabela 1. Para variáveis categóricas, como a intensidade da fibrose hepática utilizou-se os testes de Pearson e de Fisher (qui ao quadrado). O intervalo de confiança foi de 95 % e o nível de significância considerado foi de 5 % ($p < 0,05$).

Os valores identificados como *outlayers* foram estudados em gráficos e avaliados se poderiam alterar a análise global dos dados e significância dos resultados.

Tabela 1 – Análise da normalidade dos dados (valores paramétricos e não paramétricos)

Resultados	Teste de homogeneidade das variâncias		Teste de Normalidade dos dados			Teste
	Levene	Kolmogorov-Smirnov	Shapiro-Wilk	Simetria	Mesocúrtica	
Albumina (g/dl)	0,22	0,200	0,694	0,27	0,12	ANOVA
Fosfatase alcalina (U/l)	0,50	0,200	0,018	2,92	2,71	ANOVA
AST (U/l)	0,02	0,001	< 0,001	4,71	5,50	KW
ALT (U/l)	0,01	0,001	< 0,001	3,77	3,74	KW
γ GT (U/l)	0,10	< 0,001	< 0,001	7,94	13,91	KW
Bilirrubina direta (mg/dl)	0,19	< 0,001	< 0,001	7,11	9,17	KW
Bilirrubina indireta (mg/dl)	0,09	< 0,001	< 0,001	7,18	14,54	KW
Ureia (mg/dl)	< 0,001	< 0,001	< 0,001	7,07	10,9	KW
Creatinina (mg/dl)	0,90	0,051	0,235	-1,53	0,54	ANOVA

AST: aspartatoaminotransferas; ALT: alanina-aminotransferase;
 γ GT: gamaglutamiltransferas; KW: Kruskal-Wallys

7. Resultados

Após a coleta e processamento dos dados, os mesmos foram submetidos a análise estatística com os testes mais adequados e obtiveram-se os resultados, que serão descritos a seguir.

Na avaliação macroscópica não foram identificadas alterações no fígado, nos rins e no íleo terminal, dos animais do Grupo 1 (controle). Não foi identificada sinais macroscópicos de cirrose hepática nos ratos dos grupos 2, 3 e 4, apesar de ser observado aumento de volume do fígado e alteração da cor desses fígados (pardacentos). Também não se observaram alterações macroscópicas importantes nos rins e segmentos de íleo terminal dos ratos dos quatro grupos do estudo.

Não houve relação entre intensidade da fibrose hepática e alterações nas provas de função hepática e na bioquímica renal.

7.1 Avaliação dos resultados dos valores bioquímicos hepáticos e renais

Os valores dos testes bioquímicos de função hepática e renal foram submetidos aos testes estatísticos, segundo o padrão de normalidade (variáveis paramétricas e não paramétricas), como fora explicado no método. Foram obtidos os valores estatísticos básicos, que aparecem nas tabelas 2,3,4 e 5. Assim, estão anotados os valores da média, mediana, valor mínimo e máximo dos grupos 1, 2, 3 e 4. No Apêndice 2 estão discriminados os valores encontrados por animal e por grupo (tabelas A1 a A4).

Tabela 2 - Valores mínimo, média, mediana e máximo das variáveis bioquímicas do Grupo 1 (Controle)

Variável	Mínimo	Média	Mediana	Máximo
Albumina (g/dl)	2,0	2,3	2,3	2,4
ALT(U/l)	73,0	87,8	90,0	93,0
AST (U/l)	151,0	213,3	188,0	356,0
BD (mg/dl)	0,01	0,1	0,07	0,13
BI (mg/dl)	0,01	0,1	0,04	0,12
γ GT (U/l)	0,0	1,1	1,0	1,9
FA (U/l)	294,8	434,7	451,7	611,4
Creatinina (mg/dl)	0,56	0,7	0,59	0,89
Ureia (mg/dl)	34,0	41,8	42,0	42,0

AST: aspartatoaminotransferase; ALT: alanina-aminotransferase;
 BD bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; FA.: fosfatase alcalina
 γ GT: gamaglutamiltransferase.

Tabela 3 - Valores mínimo, média, mediana e máximo das variáveis bioquímicas do Grupo 2 (Drenagem biliar).

Variável	Mínimo	Média	Mediana	Máximo
Albumina (g/dl)	1,9	2,2	2,1	2,7
ALT(U/l)	68,0	108,1	84,5	227,0
AST (U/l)	150,0	246,9	203,5	504,0
BD (mg/dl)	0,01	0,7	0,03	5,34
BI (mg/dl)	0,05	0,4	0,22	1,41
γ GT (U/l)	0,7	6,8	2,4	36,7
FA (U/l)	202,2	452,0	398,5	830,9
Creatinina (mg/dl)	0,21	0,6	0,59	0,77
Ureia (mg/dl)	38,0	49,1	51,5	58,0

AST: aspartatoaminotransferase; ALT: alanina-aminotransferase;
 BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; FA: fosfatase alcalina
 γ GT: gamaglutamiltransferase.

Tabela 4 - Valores mínimo, média, mediana e máximo das variáveis bioquímicas do Grupo 3 (Drenagem biliar + Anastomose ileocólica).

Variável	Mínimo	Média	Mediana	Máximo
Albumina (g/dl)	1,8	2,1	2,1	2,4
ALT(U/l)	68,0	103,4	103,5	141,0
AST (U/l)	122,0	222,4	184,5	368,0
BD (mg/dl)	0,01	0,6	0,03	4,06
BI (mg/dl)	0,01	0,3	0,30	0,55
γGT (U/l)	0,5	3,6	1,6	11,0
Fosf. Alc. (U/l)	168,8	334,0	280,7	673,2
Creatinina (mg/dl)	0,6	0,6	0,61	0,74
Ureia (mg/dl)	33,0	45,1	42,0	62,0

AST: aspartato-aminotransferase; ALT: alanina-aminotransferase;
 BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; FA: fosfatase alcalina
 γGT: gamaglutamiltransferase.

Tabela 5 - Valores mínimo, média, mediana e máximo das variáveis bioquímicas do Grupo 4 (Drenagem biliar + Exclusão do íleo terminal).

Variável	Mínimo	Média	Mediana	Máximo
Albumina (g/dl)	1,7	2,1	2,1	2,4
ALT(U/l)	69,0	123,6	134,5	170,0
AST (U/l)	106,0	360,3	277,0	780,0
BD(mg/dl)	0,03	0,9	0,21	5,23
BI (mg/dl)	0,01	0,2	0,17	0,48
γGT (U/l)	1,2	6,8	3,5	27,0
FA (U/l)	276,4	527,5	462,0	1083,0
Creatinina (mg/dl)	0,15	0,4	0,41	0,51
Ureia (mg/dl)	50,0	92,9	92,9	186,0

AST: aspartato-aminotransferase; ALT: alanina-aminotransferase;
 BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; FA: fosfatase alcalina
 γGT: gamaglutamiltransferase.

Foram comparados os valores bioquímicos hepáticos e renais, entre os grupos 2, 3 e 4 e o Grupo 1 (controle) pelos testes de análise de variância Anova e Kruskal-Wallis. Os resultados dessas comparações podem ser vistos na Tabela 6. Deve-se mencionar que foram identificados valores *outlayers* em todas as variáveis, exceto albumina e creatinina. Realizou-se a análise com e sem esses valores *outlayers*, mesmo não tendo havido diferença importante, com e sem esses valores, optou-se pela análise com os *outlayers*. Os

resultados dos cálculos, excluídos os valores *outlayers* podem ser verificados no Apêndice 3.

Tabela 6 - Análise comparativa por grupo dos resultados dos exames bioquímicos hepáticos e renais dos ratos.

Variável	1:2	1:3	1:4	Teste
Albumina (g/dl)	0,903	0,303	0,490	ANOVA
ALT (U/l)	0,598	0,245	0,035*	Kruskal-Wallis
AST (U/l)	0,636	0,916	0,074	Kruskal-Wallis
BD (mg/dl)	0,874	0,596	0,018*	Kruskal-Wallis
BI (mg/dl)	0,004*	0,056	0,056	Kruskal-Wallis
Fos. alc. (U/l)	0,996	0,619	0,674	ANOVA
γ GT (U/l)	0,018*	0,207	0,004*	Kruskal-Wallis
Creatinina (mg/dl)	0,535	0,935	0,003*	ANOVA
Ureia (mg/dl)	0,058	0,674	0,002*	Kruskal-Wallis

ALT: alanina-aminotransferase; AST: aspartato-aminotransferase; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta;

FA.: fosfatase alcalina; γ GT: gamaglutamiltransferase; * : $p < 0,05$ (significância estatística).

1: controle; 2: drenagem biliar; 3: drenagem biliar + derivação ileocólica;

4: drenagem biliar + exclusão do fêto terminal.

Verificou-se na comparação com o Grupo 1 (controle), que os animais do Grupo 3 não apresentaram diferença nas variáveis estudadas. Os animais do Grupo 2 mostraram diferença na bilirrubina indireta ($p = 0,004$) e na γ GT ($p = 0,018$) e os animais do Grupo 4 houve diferenças nos valores de ALT ($p = 0,035$), bilirrubina direta ($0,018$), γ GT ($p = 0,04$), creatinina ($p = 0,003$) e ureia ($p = 0,002$). Caso não se considerem os valores de *outlayers* (Tabela A5 - Apêndice 3), verifica-se que não houve significância da variável γ GT do Grupo 2 ($p = 0,055$) e em relação a AST do Grupo 4, houve diferença ($p = 0,037$). Comparar tabelas 6 e A5 do Apêndice 3.

Foram comparados também os grupos 2, 3 e 4, para avaliar se apresentaram diferenças entre si, como pode ser visto na tabela 7. Novamente, foi optado pela

manutenção dos *outlayers*. Os valores de p sendo desconsiderados os *outlayers* estão contidos na Tabela A6 do Apêndice 3.

Tabela 7 – Avaliação da significância estatística (p), na comparação das variáveis bioquímicas dos grupos 2, 3 e 4.

Variável	2:3	2:4	3:4	Teste
Albumina (g/dl)	0,580	0,777	0,746	ANOVA
ALT (U/l)	0,325	0,049*	0,172	Kruskal-Wallis
AST (U/l)	0,728	0,083	0,189	Kruskal-Wallis
BD(mg/dl)	0,947	0,025*	0,018*	Kruskal-Wallis
BI(mg/dl)	0,562	0,816	0,461	Kruskal-Wallis
Fos. alc. (U/l)	0,339	0,999	0,183	ANOVA
γGT (U/l)	0,817	0,371	0,355	Kruskal-Wallis
Creatinina (mg/dl)	0,647	0,001*	0,001*	ANOVA
Ureia (mg/dl)	0,371	0,014*	0,009*	Kruskal-Wallis

ALT: alanina-aminotransferase; AST: aspartatoaminotransferase; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta;

FA: fosfatase alcalina; γGT: gamaglutamiltransferase; * : p < 0,05 (significância estatística).

2: drenagem biliar; 3: drenagem biliar + derivação ileocólica;

4: drenagem biliar + exclusão do fêleo terminal.

A comparação das variáveis bioquímicas dos grupos 2, 3 e 4, mostrou que não houve diferença estatística entre as variáveis dos grupos 2 e 3. Entre os grupos 2 e 4, verificou-se diferença nos valores de ALT (p = 0,049), bilirrubina direta (p = 0,025), ureia (p = 0,014) e creatinina (p = 0,001). Se forem retirados os *outlayers*, as significâncias em relação a bilirrubina direta, ureia e creatinina são mantidas, mas o valor de p da ALT torna-se não significativo (p = 0,172), como pode ser visto na Tabela A6 do Apêndice 3.

Na comparação dos grupos 3 e 4, verificou-se diferença nas variáveis bilirrubina direta (p = 0,018), creatinina (p = 0,001) e ureia (p = 0,009). Se forem levados em conta os valores dos *outlayers*, estas significâncias persistem. Ver tabelas 7 e A6.

7.2 Avaliação da intensidade da fibrose hepática

Foi utilizado o escore preconizado por Ishak *et al* (39,40), sendo, pois, uma comparação de variável semiquantitativa. Não houve cirrose em animal algum dos quatro grupos. A intensidade da fibrose variou de pouca fibrose a fibrose intensa (ver escala - página 29). Utilizou-se o teste de Pearson para obter o resultado da significância estatística ($p < 0,05$). As figuras abaixo (7, 8 e 9) ilustram o fígado normal, com fibrose moderada e fibrose intensa, respectivamente. A Tabela 8 mostra intensidade da fibrose por animal, por grupo.

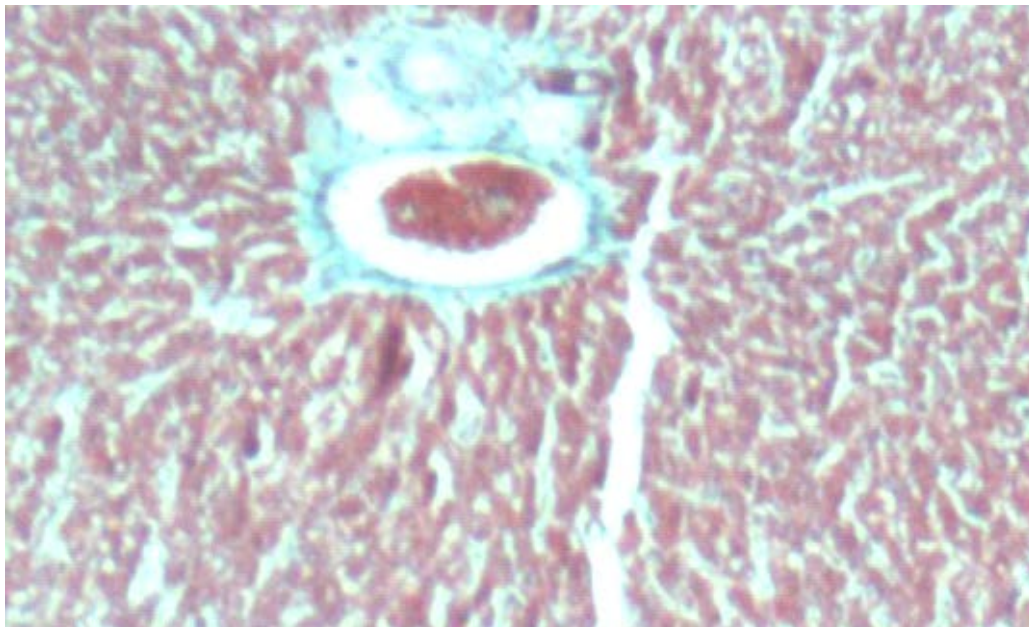


Figura 7. Fotomicrografia da histologia normal de fígado de rato do Grupo controle (coloração tricrômico de Gomori – x 400).

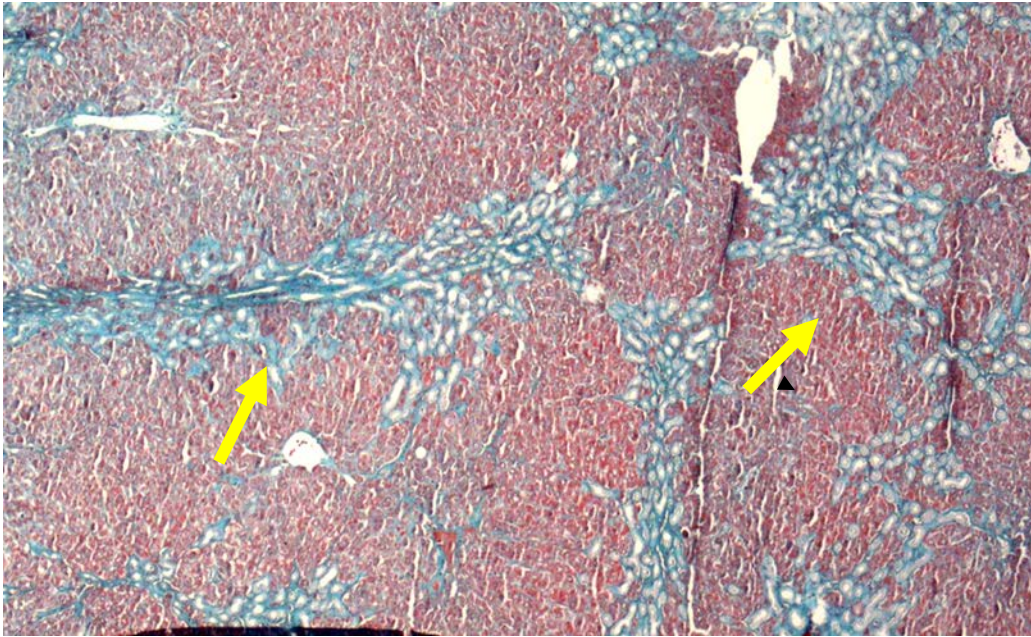


Figura 8. Fotomicrografia mostrando aspecto histológico de fibrose hepática moderada (setas amarelas) em rato do Grupo 3 (Drenagem biliar + Anastomose ileocólica). (Coloração tricrômico de Gomori – x 100).

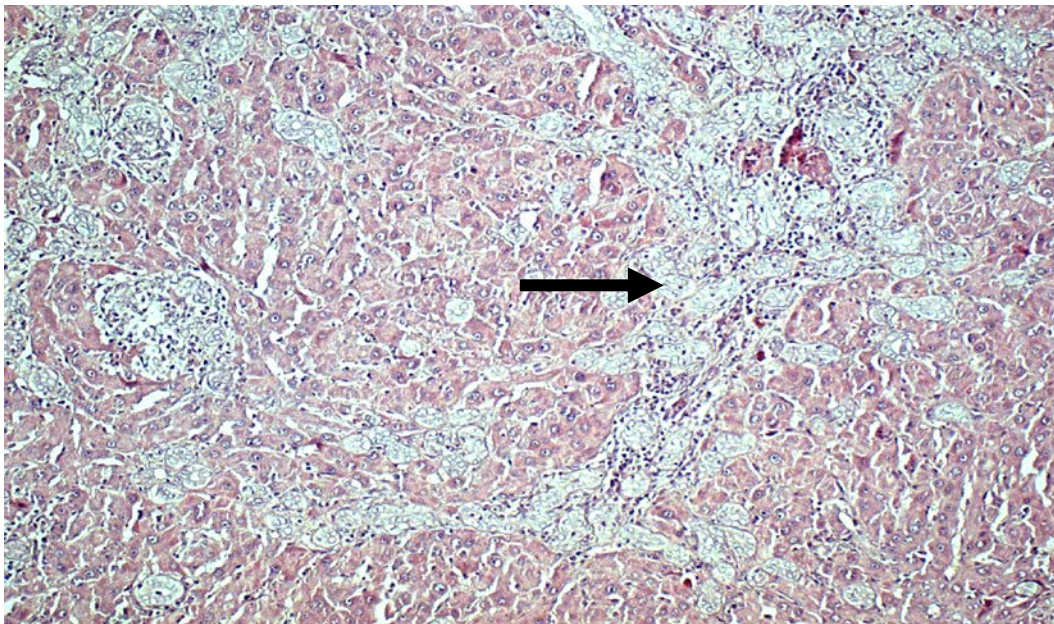


Figura 9. Fotomicrografia mostrando aspecto histológico de fígado de rato apresentando fibrose hepática intensa (seta) em rato do Grupo 2 (Drenagem biliar). Tricrômico de Gomori – x 100.

Tabela 8 - Distribuição dos animais de acordo com a intensidade da fibrose hepática

Animal	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
1	0	5	3	3
2	0	1	3	3
3	0	1	3	3
4	0	3	2	2
5	0	2	1	1
6	0	3	3	3
7	0	3	3	3
8	0	3	3	3

Escore de Ishak *et al*

0 ----- fibrose ausente

1 ----- pouca fibrose

2 ----- fibrose entre pouca e moderada

3 ----- fibrose moderada

4 ----- fibrose entre moderada e intensa

5 ----- fibrose intensa

6 ----- cirrose

Grupo 1: Controle

Grupo 2: Drenagem biliar

Grupo 3: Drenagem biliar + Derivação ileocólica

Grupo 4: Drenagem biliar + Exclusão do íleo terminal.

Ao se analisar os resultados, verificou-se que todos os grupos apresentaram significância em relação ao grupo controle. Na tabela acima, verifica-se que nenhum animal do Grupo 1 (controle) apresentou fibrose hepática, ao passo que todos os animais dos demais grupos apresentaram algum grau de fibrose. Quando foram comparados os grupos 2, 3 e 4 entre si, não foi encontrada diferença entre eles, conforme a tabela abaixo.

Tabela 9 – Avaliação da significância estatística da comparação entre os grupos, em relação a intensidade da fibrose hepática.

	1:2	1:3	1:4	2:3	2:4	3:4
Valor de p	0,003*	0,001*	0,001*	0,630	0,613	0,247

Teste de Pearson. *: $p < 0,05$

Grupo 1: Controle

Grupo 2: Drenagem biliar

Grupo 3: Drenagem biliar + Derivação ileocólica

Grupo 4: Drenagem biliar + Exclusão do íleo terminal.

7.3 Avaliação da morfologia renal

Em relação à morfologia renal, não foram encontradas diferenças à microscopia óptica entre os animais dos quatro grupos. A análise foi descritiva, não havendo elementos e meios quantitativos ou semiquantitativos suficientes para detectar diferenças. A Figura 10 representa um exemplo de histologia renal.

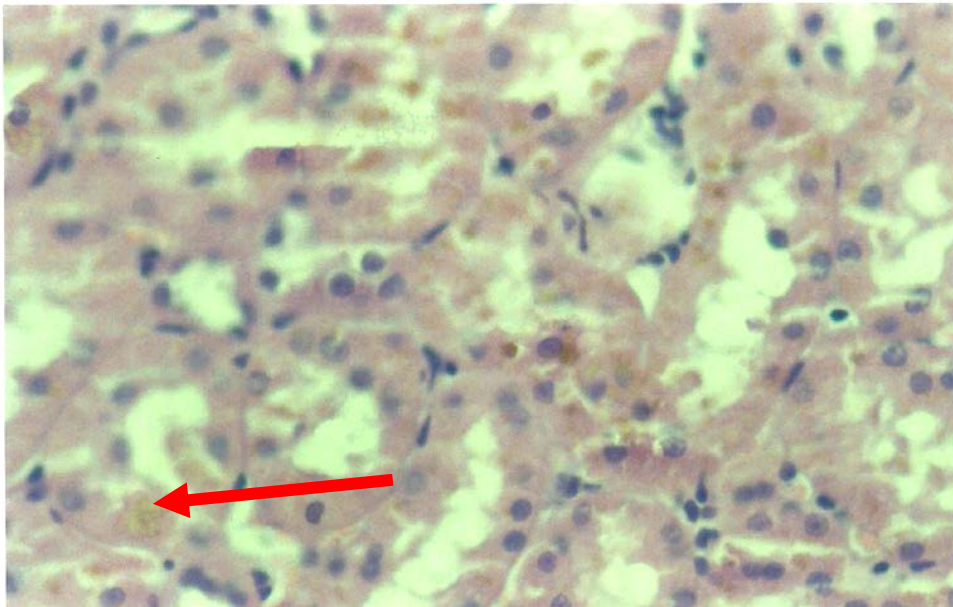


Figura 10 – Fotomicrografia de rim de rato do Grupo 4 (Drenagem biliar + exclusão do íleo terminal). Coloração PAS – 400 x. Seta vermelha: pigmento biliar.

7.4 Avaliação da morfologia do íleo terminal

Ao serem comparados os segmentos de íleo terminal não se observaram alterações em relação à estrutura histológica à microscopia óptica, nos animais dos quatro grupos.

Detectou-se que os animais do Grupo 3 apresentavam dilatação e espessamento de toda a parede intestinal, porém sem alteração na estrutura e tamanho das vilosidades e criptas, além da ausência de qualquer outro elemento anormal. Nos animais do Grupo 4, como o segmento ileal estava excluído, notou-se adelgaçamento de todas as camadas, sem, no entanto, mostrar desordem estrutural. Essa avaliação, sendo qualitativa e descritiva não tem capacidade de mostrar diferenças entre os grupos. As figuras 11, 12 e 13 trazem aspectos histológicos do íleo de animais dos grupos 1, 3 e 4.

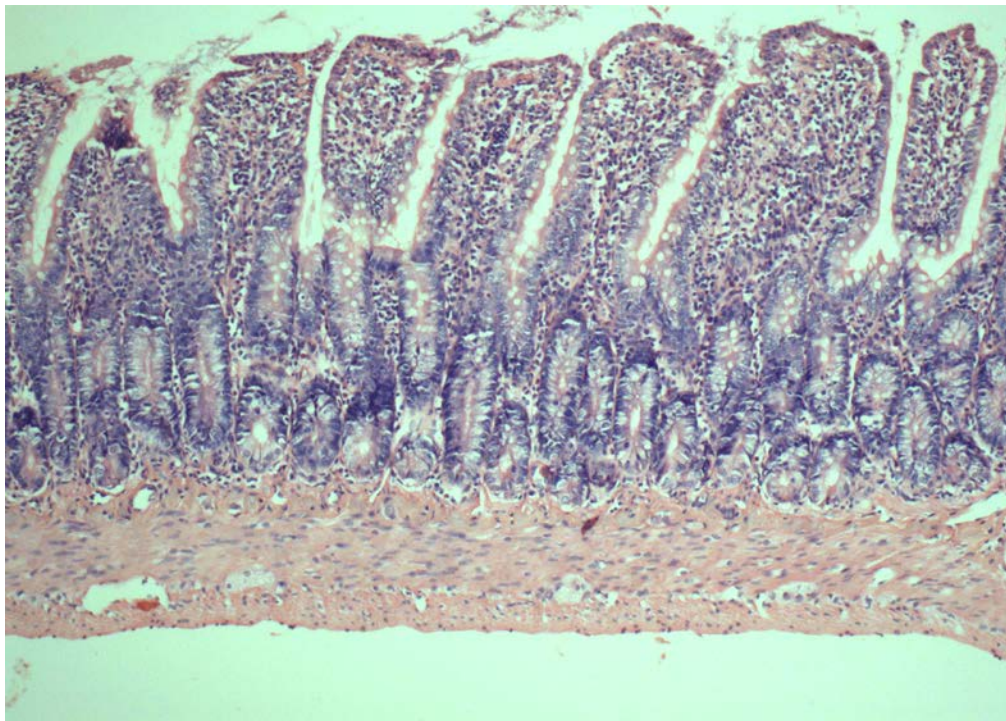


Figura 11. Fotomicrografia mostrando aspecto histológico normal de íleo terminal de rato do Grupo controle. Coloração hematoxilina e eosina – x 100.

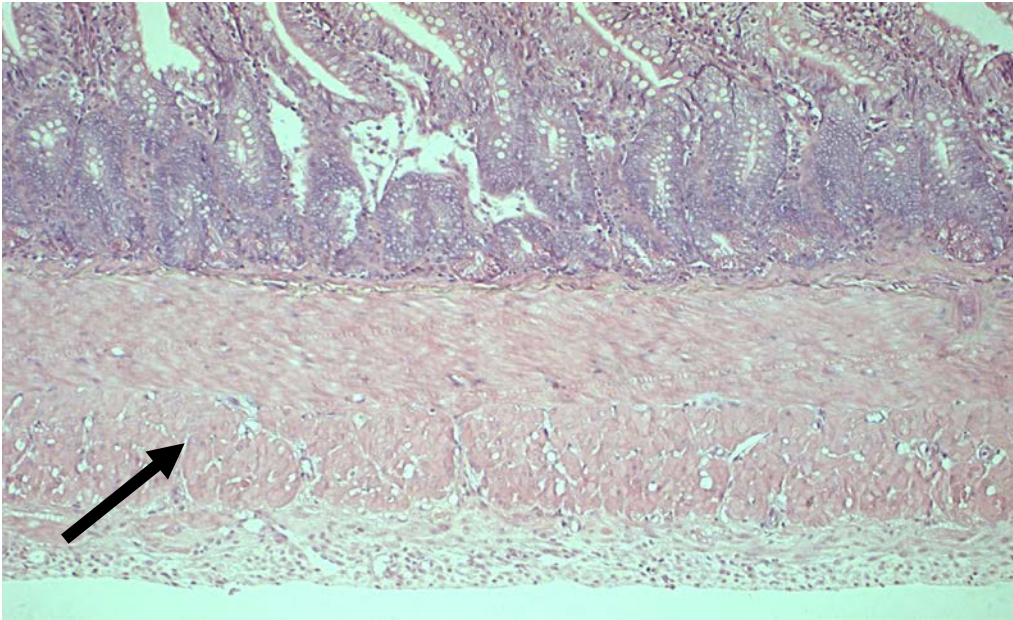


Figura 12. Fotomicrografia de aspecto histológico de fígado de rato do Grupo 3 (Drenagem biliar + Anastomose ileocólica). Observa-se espessamento das camadas (seta). Coloração hematoxilina e eosina – x 100.



Figura 13 – Fotomicrografia mostrando corte sagital de íleo terminal de rato do Grupo 4 (Drenagem biliar + Exclusão do íleo terminal). Coloração hematoxilina e eosina – x 100.

8. Discussão

Este trabalho faz parte da linha de pesquisa sobre icterícia obstrutiva, iniciada na década de 1980 e que estuda aspectos morfológicos e funcionais de diversos órgãos em presença de icterícia, em nível clínico e experimental. Novas propostas de tratamento foram comparadas com as abordagens terapêuticas existentes (4,41-50).

Em tese de mestrado defendida por nós, verificamos que a ressecção dos últimos centímetros do íleo terminal em ratas Wistar, com ligadura do ducto hepático, influencia na intensidade da fibrose hepática e nas provas de função hepática, comparando com ratas com colestase extra-hepática (4). O trabalho atual é uma continuação e apresentou diferenças marcantes em relação ao trabalho do mestrado, tanto no método, quanto nos resultados obtidos. Em relação ao método, houve três diferenças marcantes, a forma de exclusão do íleo terminal, a utilização apenas de ratos machos e a associação a procedimento de drenagem biliar.

Foram utilizadas duas formas de exclusão do íleo terminal, a primeira consistia na exclusão parcial do íleo terminal por meio de anastomose ileocólica laterolateral, a dez centímetros da papila ileal e a segunda forma de exclusão ileal consistiu na secção fechamento dos últimos dez centímetros do íleo terminal, resultando na exclusão completa desse segmento intestinal. A continuidade do trânsito intestinal deu-se pela anastomose da porção ileal proximal a ligadura, com o cólon ascendente.

Neste estudo utilizaram-se, apenas, ratos machos, a fim de evitar alterações ligadas ao ciclo menstrual ou ovulação, enquanto naquele estudo foram utilizadas apenas fêmeas (4).

A outra diferença foi a confecção de drenagem biliar interna, a fim de restituir o ciclo êntero-hepático e o fluxo biliar para o intestino, após quatro semanas de ligadura do ducto hepático. Com isso, poder-se-iam avaliar os efeitos dos procedimentos no íleo terminal, em presença da circulação bilioentérica.

Nosso primeiro trabalho deixou algumas questões a serem estudadas: menor intensidade de fibrose hepática e diminuição dos níveis de bilirrubina indireta no grupo da ressecção do íleo terminal, na ausência de fluxo biliar para o intestino (4). Essas alterações poderiam estar ligadas à diminuição da absorção de sais biliares no íleo terminal. Entretanto, não havendo fluxo biliar para o intestino, sugeriria algum processo de regulação entre fígado, rim e íleo terminal.

Não foram encontrados na literatura trabalhos experimentais ou clínicos que avaliaram a influência da exclusão parcial do íleo terminal sobre o fígado, rins e íleo terminal, na presença de colestase. Neste trabalho, procurou-se estudar a morfologia e a função de todos os componentes do ciclo êntero-hepático. Além disso, estudou-se a influência da drenagem biliar associada à exclusão ileal parcial e total. Provocou-se, em um primeiro tempo, colestase e fibrose hepática pela ligadura e secção do ducto hepático comum e, em um segundo tempo, confeccionou-se drenagem biliar interna associada ou não a procedimentos no íleo terminal, com o objetivo de provocar a exclusão parcial ou total dos últimos centímetros deste segmento do íleo e interferir na reabsorção dos sais biliares, alterando o ciclo êntero-hepático e os efeitos do acúmulo dos sais biliares no fígado, rins e íleo terminal.

Para provocar colestase e fibrose hepática, utilizou-se o modelo de Kountouras *et al*, pelo qual o ducto hepático comum é ligado e seccionado, produzindo fibrose hepática e

cirrose em quatro semanas (51). Apesar da ausência de cirrose hepática, o modelo foi adequado para a obtenção de colestase e fibrose hepática e seus efeitos.

Não há consenso na literatura se a ligadura do ducto hepático comum, em ratos, produz fibrose ou cirrose hepática. Muitos autores usam inadequadamente os dois termos como sinônimos (47,51,52). A ligadura prolongada do ducto hepático, em ratos, provoca alterações no parênquima hepático que se assemelham a nódulos, sem caracterizar nódulos verdadeiros e cirrose hepática (52). Na avaliação histológica executada no atual estudo, não se observaram nódulos hepáticos, ou fígados cirróticos, corroborando o trabalho de Vasconcellos *et al* (47), que não encontrou cirrose nos ratos após 40 dias de ligadura do ducto hepático. Pelos resultados deste trabalho, a ligadura do ducto hepático por quatro semanas, pode representar, nesse modelo murino de fibrose hepática, o período no qual a fibrose hepática pode tornar-se irreversível.

Não há acordo na literatura sobre qual o melhor procedimento de drenagem biliar interna em ratos, se hepaticoduodenostomia (53,54,55) ou hepaticojejunosomia em Y de Roux (52,56). Optou-se, então, pela hepaticoduodenostomia segundo a técnica de Ryan *et al* (41), modificada por Wen Li *et al* (55), por parecer mais segura, rápida e com menor risco de complicações.

Zimmermann *et al* avaliaram a regressão da fibrose hepática em ratos submetidos a ligadura do ducto hepático comum, por três semanas. Segundo esses autores, o período de quatro semanas de ligadura, aumentava a mortalidade pós-operatória. Nesse estudo houve melhora da arquitetura e da função hepática após três semanas de drenagem biliar, porém não houve normalização completa da histologia hepática (52). Abdel-Aziz *et al* verificaram a regressão da fibrose hepática e melhora laboratorial, após três semanas de drenagem biliar, em ratos submetidos a duas semanas de obstrução biliar (54). Wen Li *et al*

compararam a drenagem biliar interna e externa após ligadura do ducto hepático e verificaram a regressão da fibrose em ambos os tipos de drenagem, no entanto, a melhora foi mais acentuada no grupo de animais com drenagem biliar interna (55). Jalink *et al* verificaram melhora nos níveis de pressão na veia porta e da arquitetura hepática, em ratos, após a drenagem biliar interna, porém os valores da pressão na veia porta ainda persistiram alterados (56).

Marinelli Ibarreta *et al* e Aronson *et al* avaliaram a morfologia hepática e as provas bioquímicas após ligadura do ducto hepático seguida de drenagem biliar. Os primeiros autores observaram que houve progressão da lesão hepática, ao passo que os outros autores verificaram a melhora das provas de função hepática e involução, sem normalização do aspecto histológico do fígado (57,58). Duval-Araujo *et al*, nesta mesma linha de pesquisa, verificaram piora da histologia hepática em ratos submetidos a ligadura do ducto hepático que receberam sais biliares exógenos por via oral (44).

O trabalho atual verificou que, no período de quatro semanas de ligadura do ducto hepático, houve mortalidade mais elevada, principalmente após o segundo procedimento cirúrgico, no entanto, essa mortalidade não foi tão expressiva a ponto de invalidar este modelo experimental. Os resultados estão mais próximos aos de Marinelli Ibarreta *et al* (57), com a presença de fibrose hepática em todos os ratos, mesmo após a drenagem biliar. A derivação ileocólica, parcial ou total apesar de representar fator adicional para drenagem biliar e diminuição do *pool* de sais biliares, não foi vantajosa para redução da fibrose hepática. Talvez o período de quatro semanas de ligadura do ducto hepático, já tenha sido atingido um estágio de alteração estrutural do fígado, que não possa ser revertido.

Existem dois mecanismos para aumento da fibrose hepática na obstrução biliar, a proliferação ductal e a produção de matriz extracelular. A drenagem biliar parece ser mais

eficaz na redução da proliferação ductal. Segundo alguns autores, a fibrose torna-se irreversível quando há formação de pontes de fibrose entre os espaços porta (58).

Se forem comparados os resultados deste trabalho com os de nosso trabalho anterior, no que concerne à intensidade da fibrose hepática, verifica-se que no estudo atual houve tendência à redução das lesões, apesar de todos os animais ainda persistirem com algum grau de fibrose hepática. Deve-se mencionar que neste trabalho, realizou-se a drenagem biliar interna, fato relevante para a diminuição do acúmulo de sais biliares no fígado, com conseqüente, redução do dano hepático.

Medeiros *et al* observaram que em ratos jovens, a ligadura do ducto hepático evoluiu mais intensamente para fibrose hepática, ao passo que, nos ratos adultos predomina a proliferação ductal (59). Nesse trabalho utilizaram-se apenas ratos adultos, eliminando a interferência etária.

Os resultados do trabalho atual, no tocante à fibrose hepática, são corroborados pelos estudos de Marinelli Ibarreta *et al* (57) e de Kountouras *et al* (51), comprovando que a ligadura do ducto hepático, mesmo com a drenagem biliar, pode ser um modelo adequado para estudo da fibrose hepática. A associação dos procedimentos de exclusão ileal, parcial ou total, ao procedimento de drenagem biliar, não apresentou vantagem, sobre a drenagem biliar isolada, em relação à intensidade da fibrose hepática, quando aplicados a esse período de obstrução biliar.

Outro enfoque deste trabalho foi a avaliação do comportamento das provas de função hepática após os procedimentos de drenagem biliar e derivação ileocolônica. Vários estudos experimentais avaliaram o efeito da ligadura do ducto hepático nas provas de função hepática. Eles descrevem o aumento de AST, ALT, fosfatase alcalina, γ GT e bilirrubinas ao longo das três primeiras semanas, com sua queda gradual, secundária a

deterioração da função hepática (60-64). Quaresma *et al* verificaram que a oclusão parcial do ducto hepático, em ratos, não altera essas provas bioquímicas (64). Marinelli Ibarreta *et al* (57) e Younes *et al* (65) observaram a normalização das enzimas hepáticas após derivação biliar, exceto dos valores de albumina, que persistiram mais baixos.

No trabalho atual, seria de se esperar, que os valores das bilirrubinas, albumina, AST, ALT, fosfatase alcalina e γ GT fossem mais próximos dos valores do Grupo controle, pois a obstrução biliar fora resolvida e os principais agente tóxicos passaram a ser eliminados, diminuindo a agressão hepática. Nos grupos 3 e 4, submetidos, respectivamente a derivação ileocólica laterolateral e exclusão total do íleo terminal, seria de se esperar menor reabsorção de sais biliares e sua maior eliminação nas fezes. Estes procedimentos diminuiriam a absorção de sais biliares no íleo terminal, aumentariam a excreção fecal desses compostos, diminuindo a circulação êntero-hepática dos sais biliares e consequente, diminuição do dano hepático. No entanto, pelos resultados das provas bioquímicas, verifica-se que no Grupo 4 (exclusão total do íleo) as provas bioquímicas ALT, bilirrubina direta e γ GT permaneceram alteradas em relação ao grupo controle, com provável persistência do dano hepático, ou disfunção do fígado. Os grupos 2 e 3 não apresentaram, a grosso modo, indícios de piora ou persistência de dano hepático, mesmo com valores alterados de γ GT e bilirrubina indireta do Grupo 2, que não representa, em si perfil bioquímico de disfunção hepática. Verifica-se também que o valor de γ GT do Grupo 2 é a única variável bioquímica, cujo resultado é influenciado por valor de *outlayer* (tabela 7 e A6). Na comparação entre os grupos 2, 3 e 4, parece não ter havido superioridade de um procedimento sobre o outro, em relação as provas bioquímicas de função hepática.

Não houve diferença nas medidas de albumina entre os quatro grupos, esse resultado contrapõe os de Marinelli Ibarreta *et al* (57) e Younes *et al* (65), que evidenciaram hipoalbuminemia mesmo após a drenagem biliar.

Relatos de alterações da absorção de sais biliares no íleo terminal, em pacientes com ileítes, doença de Crohn e ressecções intestinais, comprovam a influência dessa parte do intestino delgado na circulação êntero-hepática (66), o que também justifica a análise desses procedimentos de exclusão ileal, como forma de tratamento para doenças colestáticas. Entretanto, pelos resultados aqui obtidos, não se justifica a exclusão do íleo terminal, em presença de fibrose hepática.

Outros aspectos levantados neste trabalho dizem respeito à morfologia e à bioquímica renal. Sabe-se que doenças colestáticas e a cirrose complicam-se com alterações renais (67). Retenção de sódio e água, piora na filtração e na excreção renais são encontrados em pacientes ictericos e cirróticos (67).

A hepatopatia crônica acompanha-se de alterações renais, que podem ser secundárias à etiologia (cirrose pós-viral C, nefropatia da cirrose etanólica, etc), à doença renal concomitante (nefropatia do diabetes e da hipertensão arterial), resultante de medicamentos nefrotóxicos (aminoglicosídeos e anti-inflamatórios não esteroides), ou a “síndrome hepatorenal”. Esta última de grande importância, pela alta morbidade e letalidade (68-71).

A “síndrome hepatorenal” é definida como insuficiência renal que ocorre em hepatopatas crônicos e cirróticos em estágio avançado, provocada por alterações hemodinâmicas, tais como vasodilatação esplâncnica, vasoconstrição renal e diminuição do débito cardíaco. Nesses casos não foram descritas alterações histológicas renais características, portanto, devem-se excluir lesões renais ligadas à própria hepatopatia ou

alterações renais pré-existentes (68-71). Além das alterações hemodinâmicas citadas, a ativação do sistema renina-angiotensina, ação do sistema nervoso simpático (tentativa de aumentar o fluxo sanguíneo para o rim em resposta à vasodilatação sistêmica), a produção de substâncias vasoativas renais como endotelina 1, prostaglandina E₂ e estresse oxidativo compõem os fatores que favorecem o dano renal na colestase (72).

Fígado e rim são os dois principais órgãos responsáveis pela excreção de substâncias tóxicas do organismo. Quando ocorre dano hepático, o rim passa ser a principal via de excreção, mas torna-se alvo da ação deletéria de substâncias tóxicas, normalmente removidas pelo fígado (63,72).

Entre os agentes responsáveis pela disfunção renal na hepatopatia, destacam-se a nefrotoxicidade das bilirrubinas, tanto direta quanto indireta e dos sais biliares, efeitos hemodinâmicos, como a vasodilatação esplâncnica, diminuição da resistência vascular periférica e vasoconstrição renal, a ativação de substâncias vasoativas no parênquima renal, em especial, angiotensina II, endotelina 1 e catecolaminas, e a ativação da cascata lipoperoxidativa, denominada estresse oxidativo, que é resultado da geração de radicais livres e da diminuição da concentração de glutatona (72-82).

Em estudos experimentais de ligadura do ducto hepático, as alterações funcionais e os danos renais são precoces e predominam nos túbulos renais, porém não se identifica padrão de lesão característico (83-87). Laky *et al* verificaram que os danos renais na oclusão parcial do ducto hepático são mais brandos que na oclusão total, nessa última, há aumento do tamanho renal em resposta a acúmulo de material nefrotóxico (88). Lima *et al* não encontraram alterações na morfologia renal, em ratos submetidos a nefrectomia e ligadura do ducto hepático comum, entretanto verificaram piora da função hepática nesses animais (48).

Os achados resultados da análise histológica deste trabalho não diferem dos achados da literatura. Não foram encontradas lesões renais ou infiltrados inflamatório, à microscopia óptica. Únicos achados histológicos foram depósitos de pigmentos biliares no parênquima, nos grupos 2, 3 e 4.

Muitos autores questionam o efeito citotóxico dos sais biliares no rim. Segundo Kaler *et al* os efeitos dos sais biliares no rim são indiretos e estariam envolvidos na ativação da cascata de eventos inflamatórios e hormonais, que culmina com a isquemia renal (89). Outros autores, como Israeli & Bogin (63), Green *et al* (74) e Bomzon *et al* (79), defendem a ação citotóxica direta dos sais biliares no tecido renal além da ação sistêmica na produção de radicais livres e contribuição na vasodilatação esplâncnica e vasoconstrição renal.

Vários estudos atribuem efeitos tóxicos do acúmulo de bilirrubina direta e bilirrubina indireta no rim. Akerman *et al* observaram em ratos submetidos à ligadura do ducto hepático, proporcionalidade nos níveis séricos de bilirrubina, com a toxicidade renal a gentamicina (90).

Call e Tisher determinaram os efeitos renais da hiperbilirrubinemia indireta como, interferência no transporte ativo de solutos na alça de Henle, alteração da fosforilação oxidativa das mitocôndrias das células do parênquima renal, além de distensão do parênquima renal, necrose papilar e fibrose medular e cortical (91). Apesar da capacidade renal de excretar bilirrubina direta, alguns autores acreditam que na presença de isquemia renal, a bilirrubina direta pode ter efeitos tóxicos, principalmente, se houver hipoxia associada (63,76).

Nos animais dos grupos 2 e 3 não foram identificadas alterações na bioquímica renal, já nos animais do Grupo 4, no qual a bilirrubina direta está aumentada, verifica-se aumento e significância dos valores de ureia e creatinina em relação ao Grupo controle e

também aos grupos 2 e 3. No modelo utilizado neste trabalho, a exclusão total do íleo terminal, piorou a função renal, apesar de não terem sido identificadas alterações estruturais nos rins.

Ainda que alguns autores, como Amodio *et al* (92) e Francoz *et al* (93), tivessem questionado o valor das dosagens de ureia e creatinina e suas respectivas depurações, nas hepatopatias, deve-se ressaltar que a utilização desses parâmetros bioquímicos é válida, tanto pela tentativa de reprodução da prática clínica, como pela comparabilidade entre os quatro grupos estudados. Existe possibilidade de os valores de ureia e creatinina serem subestimados na hepatopatia (94), porém os achados clínicos e laboratoriais desta pesquisa não desqualificam essas medidas, como parâmetros da função renal.

Outro foco do estudo foi a avaliação histológica do íleo terminal, o principal local de reabsorção de sais biliares no intestino, sendo parte fundamental do ciclo êntero-hepático. É importante avaliar se houve alterações nesse segmento intestinal, decorrente da exclusão parcial ou total do fluxo entérico e desbloqueio do fluxo biliar. Verificou-se, apenas, dilatação do íleo terminal dos ratos com derivação ileocólica e diminuição da espessura de todas as camadas da parede ileal, nos animais com exclusão ileal total. Não foram observadas alterações morfológicas nas criptas e vilosidades, provavelmente mantendo a função intestinal, apesar da intervenção sofrida.

Muitos autores avaliaram os efeitos da icterícia obstrutiva e da cirrose hepática no tubo digestório. As relações ultrapassam o ciclo êntero-hepático e estão ligadas a efeitos metabólicos, hormonais, inflamatórios e imunitários. As principais alterações são supercrescimento bacteriano, aumento da permeabilidade intestinal e endotoxemia (95,96,97). Os achados histológicos mais relevantes são atrofia de vilosidades e infiltrado inflamatório na lâmina própria (99,100). No modelo experimental de ligadura do ducto

hepático, as lesões predominam no íleo e a morfologia normal é restabelecida após a drenagem biliar interna (97-100).

A diminuição dos sais biliares na luz intestinal, a redução da concentração de IgA secretora e alterações de isquemia e reperfusão são responsáveis por modificações da barreira mucosa intestinal e translocação bacteriana (99-103). Recentemente, alguns autores defenderam que o estresse oxidativo, isto é, peroxidação de lipídios e geração de radicais livres seja resultado do supercrescimento bacteriano, da ação de células inflamatórias e das endotoxinas, causando aumento da permeabilidade intestinal (104,105,106). Duval-Araujo *et al* verificaram, na mesma linha de pesquisa, alterações na motilidade intestinal e supercrescimento bacteriano, resultando em maior produção de endotoxinas, após a ligadura do ducto hepático (42,43).

Neste trabalho, após a drenagem biliar isolada ou associada à derivação ileocólica laterolateral ou a exclusão do íleo terminal, não foram observadas alterações no íleo terminal, o que sugere ter havido recuperação da morfologia e da função intestinal, apesar de os ratos ainda permanecerem com algum grau de fibrose hepática. Esse fato é corroborado pela literatura, que descreve o retorno da arquitetura e da função do intestino após a drenagem biliar interna (97-100).

As proteínas de transporte de sais biliares e íons orgânicos presentes na bile são expressas nas membranas de hepatócitos, colangiócitos, enterócitos do íleo terminal e células dos túbulos renais, participando ativamente do processo de absorção, excreção e reabsorção dos sais biliares, tanto em situações fisiológicas, quanto na colestase, como a empregada neste estudo (ligadura do ducto hepático). Durante a obstrução do ducto hepático, os receptores de membrana são regulados para diminuir a absorção dos sais biliares pelos hepatócitos, aumentar o refluxo para os sinusoides hepáticos e aumentar a

excreção pelos colangiócitos. No rim, a absorção dos sais biliares no túbulo renal é menor. Procura-se reduzir o acúmulo dos sais biliares nos hepatócitos e aumentar sua excreção renal. Caso persista a colestase, a excreção renal não é suficiente para eliminar o seu acúmulo (107,108).

No íleo terminal, proteínas de transporte de sais biliares estão presentes na membrana dos enterócitos, garantindo absorção dos sais biliares da luz intestinal (109). Na colestase, a regulação da expressão dessas proteínas na membrana dos enterócitos é controversa, variando conforme a concentração dos sais biliares na circulação sistêmica ou na luz intestinal (108,109,110).

Outra forma de regulação se faz pela diminuição da conversão do colesterol em sais biliares no hepatócito, por meio da inibição da enzima colesterol 7α -hidroxilase, sensível à concentração dos sais biliares nos hepatócitos e no sangue. Esse é um mecanismo de regulação, principalmente ligado à ativação de receptores nucleares como o FXR (receptor de farnesoide X) (111). Há importância dos receptores nucleares, no que concerne ao ciclo êntero-hepático, ao ciclo do colesterol e à doenças colestáticas, além da fibrose e da cirrose hepática. Esses receptores regulam a expressão de genes envolvidos em todos os processos fisiológicos ou não, do ciclo êntero-hepático, em especial dos sais biliares (112,113).

A colestase, induzida pela ligadura do ducto hepático comum, a reconstrução do fluxo biliar, mediante anastomose hepaticoduodenal e a exclusão parcial do íleo terminal (derivação ileocolônica) podem ter alterado o complexo de proteínas de transporte de íons orgânicos e de receptores nucleares. Mesmo que nosso trabalho não tenha abordado as proteínas de transporte de membranas e os receptores nucleares, os trabalhos futuros terão necessariamente que abordar esses tópicos, pois, talvez o melhor conhecimento desses

agentes e o uso de determinadas formas de interferir nesses elementos sejam a chave para tratamento mais adequado das afecções colestáticas e da reversão da fibrose hepática.

Pelos resultados obtidos, em modelo murino de colestase e fibrose, a exclusão parcial ou total do íleo terminal não reduz a fibrose hepática. A exclusão total do íleo terminal apresentou efeitos adversos nos exames da função hepática e renal.

Neste trabalho foram investigados, em modelo experimental de ligadura do ducto hepático, os achados de Hollands *et al* (3). Pelos resultados encontrados, refuta-se, no modelo murino de colestase e fibrose hepática por meio da ligadura do ducto hepático, a exclusão do íleo terminal como tratamento para prevenir ou melhorar fibrose hepática e a disfunção hepática e renal.

9. Conclusões

A derivação parcial do íleo terminal e a exclusão total dos últimos centímetros do íleo terminal, associadas à drenagem biliar não apresentaram diferenças na intensidade da fibrose hepática, comparadas à drenagem biliar isolada, em ratos submetidos a ligadura prévia do ducto hepático comum.

A exclusão do íleo terminal, em modelo de ligadura do ducto hepático associou-se a piora das provas bioquímicas do fígado. Não houve benefício na derivação ileocólica nas alterações morfológicas e na função do fígado e dos rins. A exclusão total do íleo terminal, associada a derivação biliodigestiva pós-colestase, piorou os valores das provas bioquímicas renais.

10. Referências Bibliográficas*

1. POUPON R, CHAZOUILLÈRES O, POUPON RE. Chronic cholestatic diseases. *J Hepatol*. 2000 Fev;32(Suppl 1):129-40.
2. PUSL T, BEUERS U. Extrahepatic manifestations of cholestatic liver diseases, pathogenesis and therapy. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2005 Abr;28(2):147-57.
3. HOLLANDS CM, RIVERA-PEDROGO FJ, GONZALEZ-VALLINA R, *et al*. Ileal exclusion for Byler's disease: an alternative surgical approach with promising early results for pruritus. *J Pediatr Surg*. 1998 Fev;33(2):220-4.
4. COSTA ELO, AZEVEDO JR GM, PETROIANU A. Influence of terminal ileum resection on hepatic fibrosis provoked by ligation of common bile duct in female rats. *Rev Col Bras Cir*. 2006 Jan-Fev;33(1):19--23.
5. TOMER G, SHNEIDER BL. Disorders of bile formation and biliary transport. *Gastroenterol Clin North Am*. 2003 Set;32(3):839-55.
6. PAULI-MAGNUS C, MEIER PJ. Hepatocellular transporters and cholestasis. *J Clin Gastroenterol*. 2005 Abr;39(4 Suppl 2):S103-10.
7. DESMET VJ. Histopathology of cholestasis. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1995 Jan;79(1):233-40.
8. GLASOVA H, BEUERS U. Extrahepatic manifestations of cholestasis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002 Set;17(9):938-48.
9. ESTELLER A. Physiology of bile secretion. *World J Gastroenterol*. 2008 Out;14(37):5641-9.
10. FERENCI P, ZOLLNER G, TRAUNER M. Hepatic, transport systems. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002 Fev;17(Suppl S1):S105-12.
11. PAUMGARTNER G. Medical treatment of cholestatic liver diseases: from pathobiology to pharmacological targets. *World J Gastroenterol*. 2006 Jul;12(28):4445-51.

* Referências normalizadas pelas regras de Vancouver.

12. HOFMANN AL. The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions. *Front Biosci.* 2009 Jan;14(7):2584-98.
13. ELFERINK RO. Cholestasis. *Gut.* 2003 Mai;52(Suppl 2):ii42-8.
14. ROBERTS MS, MAGNUSSON BM, BURCZYNSKI FJ, WEISS M. Enterohepatic circulation – physical, pharmacokinetic and clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 2002 Out;41(10):751-90.
15. HOFMANN, AF; HAGEY, LR. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Ago;65(16):2461-83.
16. O'LEARY JG, PRATT DS. Cholestasis and cholestatic syndromes. *Curr Opin Gastroenterol.* *Curr Opin Gastroenterol.* 2007 Mai;23(3):232-6.
17. KULLAK-UBLICK GA, MEIER PJ. Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis.* 2000 Mai;4(2):357-85.
18. KRELL H, ENDERLE JG. Cholestasis: pathophysiology and pathobiochemistry. *Z Gastroenterol.* 1993 Fev;31(Suppl 2):11-5.
19. RODRÍGUEZ-GARAY EA. Cholestasis: human disease and experimental animal models. *Ann Hepatol.* 2003 Out-Dez;2(4):150-8.
20. REAU NS, JENSEN DM. Vanishing bile duct syndrome. *Clin Liver Dis.* 2008 Fev;12(1):203-17.
21. PINZANI M. Liver fibrosis. *Springer Semin Immunopathol.* 2000 Jun;21(4):475-90.
22. BATALLER R, BRENNER DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005 Fev;115(2):209-18.
23. MALHI H, GORES GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology.* 2008 Mai;134(6):1641-54.
24. FRIEDMAN SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008 Mai;134(6):1655-69.
25. ALCOLADO R, ARTHUR JP, IREDALE JP. Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin Sci(Lond).* 1997 Jan;92(1):103-12.

26. NEUBAUER K, SAILE B, RAMADORI G. Liver fibrosis and altered matrix synthesis. *Can J Gastroenterol.* 2001 Mar;15(3):187-93.
27. CAMBAY A, FRIEDMAN S, GOES GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology.* 2004 Feb;39(2):273-8.
28. HIGUCHI H, GORES GJ. Mechanisms of liver injury: an overview. *Curr Mol Med.* 2003 Set;3(6):483-90.
29. PEREZ MJ, BRIZ O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol.* 2009 Abr;15(14):1677-89.
30. MARRA. F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front Biosci.* 2002 Set; 7(9):d1899-914.
31. MORENO M, BATALLER R. Cytokines and renin-angiotensin system signaling in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis.* 2008 Nov;12(4):825-52.
32. HENDERSON NC, FORBES SJ, Hepatic fibrogenesis: from within and outwith. *Toxicology.* 2008 Dez;254(3):130-5.
33. KINNMANN N, HOUSSET C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. *Front Biosci.* 2002 Fev;7(2):d496-503.
34. FRIEDMAN SL. Hepatic fibrosis – overview. *Toxicology.* 2008 Dez;254(3):120-9.
35. FRIEDMAN SL, BANSAL MB. Reversal of hepatic fibrosis – fact or fantasy? *Hepatology.* 2006 Jan; 43(suppl S1):S82-8.
36. PINZANI M, VIZZUTTI F. Fibrosis and cirrhosis reversibility: clinical features and implications. *Clin Liver Dis.* 2008 Nov;12(4):901-13.
37. GIELING RG, BURT AD, MANN DA. Fibrosis and cirrhosis reversibility – molecular mechanisms. *Clin Liver Dis.* 2008 Nov;12(4):915-37.
38. BENYON RC, IREDALE JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut.* 2000 Abr;46(4):443-6.
39. ISHAK K, BAPTISTA A, BIANCHI L, *et al.* Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol.* 1995 Jun;22(6):696-9.

40. STANDISH RA, CHOLONGITAS E, DHILLON A, *et al.* An appraisal of the histopathological assessment of liver fibrosis. *Gut.* 2006 Abr;55(4):569-78.
41. LAZARO DA SILVA A, PETROIANU A. Alterações das vias biliares em pacientes portadores de úlcera cloridropéptica. *Rev Col Bras Cir.* 1990 Jul-Ago;17(4):72-5.
42. DUVAL-ARAÚJO I, PETROIANU A, OLIVEIRA NETO JE, SABINO LO. Influência dos sais biliares na resposta motora de alças isoladas a acetilcolina, em ratos. *Rev Ass Med Bras.* 1995 Set-Out;41(5):325-8.
43. DUVAL-ARAÚJO I, PETROIANU A, OLIVEIRA NETO JE, SABINO LO. Endotoxin-induced enteric hypomotility in jaundiced loops *in vitro*. *Braz Med Biol Res.* 1996 Ago;29(8):995-999.
44. DUVAL-ARAÚJO I, ALVES-SILVA A, OKAWA RY, PETROIANU A. Alterações histológicas em fígado de ratos ictericos após uso de sais biliares exógenos por via oral. *Rev Bras Cir.* 1997 Mar-Abr;87(2):79-81.
45. ARANTES VN, OKAWA RY, FAGUNDES-PEREYRA WJ, *et al.* Influência da icterícia obstrutiva na cicatrização da pele e de anastomose jejunal em ratos. *Rev Col Bras Cir.* 1999 Set-Out;26(5):269-73.
46. PEREYRA WJF, CAVALCANTI AMT, PEREIRA LR, PETROIANU A. Resistência das diferentes partes do tubo digestivo em presença ou não de hiperbilirrubinemia. *Rev Med Minas Gerais.* 2000 Jan-Fev-Mar;10(1):18-21.
47. VASCONCELLOS LS, ALBERTI LR, ROMEIRO JR, PETROIANU A. Alterações da morfologia hepática após a ligadura do ducto biliopancreático em ratos. *An Fac Med Univ Fed Pernamb.* 2005 Jul;50(2):81-7.
48. LIMA DX, PETROIANU A, RODRIGUES KCL, SALLES PGO. Efeito da colestase nos aspectos funcionais e morfológicos renais após nefrectomia. *Rev Assoc Med Bras.* 2008 Nov-Dez;54(6):513-6.
49. RESENDE V, PETROIANU A, ALVES MSD, ALBERTI LR. Efeito da icterícia obstrutiva na fertilidade, morfologia ovariana e desenvolvimento fetal em ratas. *Arq Gastroenterol.* 2008 Jul-set;45(3):249-51.
50. RESENDE V, PETROIANU A, ALVES MSD, ALBERTI LR. Influência da icterícia obstrutiva na capacidade reprodutiva, desenvolvimento fetal e morfologia ovariana em ratas. *Rev Col Bras Cir.* 2009 Jul-Ago;36(4):339-46.

51. KOUNTOURAS J, BILLING BH, SCEUER PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Path.* 1984 Dez;65(6):305-11.
52. ZIMMERMANN H, REICHEN J, ZIMMERMANN A, *et al.* Reversibility of secondary biliary fibrosis by biliodigestive anastomosis in the rat. *Gastroenterology.* 1992 Ago;103(2):579-89.
53. RYAN CJ, THAN T, BLUMGART LH. Choledochoduodenostomy in the rat with obstructive jaundice. *J Surg Res.* 1977 Nov;23(5):321-31.
54. ABDEL-AZIZ G, LEBEAU G, RESCAN PY, *et al.* Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat. *Am J Pathol.* 1990 Dez;137(6):1333-42.
55. LI W, CHUNG CS. An improved rat model of obstructive jaundice and its reversal by internal and external drainage. *J Surg Res.* 2001 Nov;101(1):4-15.
56. JALINK D, URBANSKI SJ, LEE SS. Bilioenteric anastomosis reverses hyperkinetic circulation in bile duct-ligated cirrhotic rats. *J Hepatol.* 1996 Dez;25(6):924-31.
57. MARINELLI IBARRETA A, SÁNCHEZ MOVILLA A, IZQUIERDO F, *et al.* Cambios morfológicos pre y postderivación biliodigestiva en cirrosis experimental por ligadura de via biliar em rata. *Rev Esp Enferm Digest.* 1995 Jan;87(1):25-31.
58. ARONSON DC, CHAMULEAU RA, FREDERIKS WM, *et al.* Reversibility of cholestatic changes following experimental common bile duct obstruction: fact or fantasy? *J Hepatol.* 1993 Mar;18(3):85-95.
59. MEDEIROS MVMJ, FREITAS LAR, ANDRADE ZA. Differences in hepatic pathology resulting from bile duct obstruction in young and old rats. *Brazilian J Med Biol Res.* 1988 Jan;21(1):75-83.
60. STEIN TA, BURNS GP, WISE L. Diagnostic value of liver function tests in bile duct obstruction. *J Sur Res.* 1989 Mar;46(3):226-9.
61. CENTER SA, BALDWIN BH, KING JM, TENNANT BC. Hematologic and biochemical abnormalities associated with induced extrahepatic bile duct obstruction in the cat. *Am J Vet Res.* 1983 Out;44(10):1822-29.
62. HINZ S, FRANKE H, MACHNIK G, *et al.* Histological and biochemical changes induced by total bile duct ligation in the rat. *Exp Toxicol Pathol.* 1997 Ago;49(3-4):281-8.

63. ISRAELI BA, BOGIN E. Biochemical changes in liver, kidney and blood associated with common bile duct ligation. *Clin Chim Acta*. 1986 Out;160(2):211-21.
64. QUARESMA AB, D'ACAMPORA AJ, TRAMONTE R, *et al*. Histological study of the liver and biochemistry of the blood of Wistar rats following ligation of the right hepatic duct. *Acta Cir Bras*. 2007 Jan-Fev;22(1):68-78.
65. YOUNES RN, VYDELINGUN NA, DEROOIJ P, *et al*. Metabolic alterations in obstructive jaundice: effect of duration of jaundice and bile-duct decompression. *HPB Surg*. 1991 Mai;5(1):35-48.
66. HOFMANN AF. Inappropriate ileal conservation of bile acids in cholestatic liver disease: homeostasis gone awry. *Gut*. 2003 Set;52(9):1239-41.
67. OZTURK H, TERZI A, OZTURK H, KUKNER A. Effect of sirulimus on renal injury by bile duct ligation in rats. *Acta Cir Bras*. 2010 Out;25(5):401-6.
68. SCHEPKE M. Hepatorenal syndrome: current diagnosis and therapeutic concepts. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Set;22(suppl 8):viii2-4.
69. ARROYO V, FERNANDEZ J, GINÈS P. Pathogenesis and treatment of hepatorenal syndrome. *Semin Liver Dis*. 2008 Feb;28(1):81-95.
70. MUNOZ SJ. The hepatorenal syndrome. *Med Clin North Am*. 2008 Jul;92(4):813-37.
71. GINÈS P, SCHRIER RW. Renal failure in cirrhosis. *N Engl J Med*. 2009 Sep;361(13):1279-90.
72. GENTILINI P, LA VILLA G. Liver-kidney pathophysiological interrelationships in liver diseases. *Dig Liver Dis*. 2008 Dec;40(12):909-19.
73. FOGARTY BJ, PARKS RW, ROWLANDS BJ, DIAMOND T. Renal dysfunction in obstructive jaundice. *Br J Surg*. 1995 Jul;82(7):877-84.
74. GREEN J, BEYAR R, BOMZON L, *et al*. Jaundice, the circulation and the kidney. *Nephron*. 1984 Jun;37(3):145-52.
75. CORATELLI P, PASSAVANTI G. Pathophysiology of renal failure in obstructive jaundice. *Miner Electrolyte Metab*. 1990 Jan-Fev;16(1):61-5.

76. BETJES MGH, BAJEMA I. The pathology of jaundice-related renal insufficiency: cholemic nephrosis revisited. *J Nephrol*. 2006 Mar-Apr;19(2):229-33.
77. SARAC AM, AKTAN AO, MOINI H, *et al*. Role of endothelin in obstructive jaundice. *Dig Dis Sci*. 1999 Feb;44(2):356-63.
78. TORRES AM. Renal elimination of organic anions in cholestasis. *World J Gastroenterol*. 2008 Nov;14(43):6616-21.
79. BOMZON A, HOLT S, MOORE K. Bile acids, oxidative stress, and renal function in biliary obstruction. *Semin Nephrol*. 1997 Nov;17(6):549-62.
80. PANOZZO MP, BASSO D, BALINT L, *et al*. Renal functional alterations in extrahepatic cholestasis: can oxidative stress be involved? *Eur Surg Res*. 1995 Set-Out;27(5):332-9.
81. ORTIZ MC, MANRIQUEZ MC, NATH KA, *et al*. Vitamin E prevents renal dysfunction induced by experimental chronic bile duct ligation. *Kidney Int*. 2003 Set;64(3):950-61.
82. OZTURK H, EKEN H, OZTURK H, BUYUKBAYRAM H. Effects of dexamethasone on small bowel and kidney oxidative stress and histological alterations in bile duct-ligated rats. *Pediatr Surg Int*. 2006 Set;22(9):709-18.
83. RODRIGO R, AVALOS N, ORELLANA M, *et al*. Renal effects of experimental obstructive jaundice; morphological and functional assessment. *Arch Med Res*. 1999 Jul-Ago;30(4):275-85.
84. MONASTEROLO L, PEIRETTI A, ELÍAS M. Rat renal functions during the first days post-bile duct ligation. *Ren Fail*. 1993 Jan;15(4):461-7.
85. RIVERA-HUIZAR S, RINCÓN-SÁNCHEZ AR, COVARRUBIAS-PINEDO A, *et al*. Renal dysfunction as a consequence of acute liver damage by bile duct ligation in cirrhotic rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2006 Nov;58(2-3):185-95.
86. PERREIRA RM, SANTOS RAS, OLIVEIRA EA, *et al*. Development of hepatorenal syndrome in bile duct ligated rats. *World J Gastroenterol*. 2008 Jul;14(28):4505-11.
87. ASSIMAKOPOULOS SF, VAGUIANOS CE. Bile duct ligation in rats: a reliable model of hepatorenal syndrome? *World J Gastroenterol*. 2009 Jan;15(1):121-23.

88. LAKY D, BACIU Z, ZĂLARU M. Renal pathologic lesions in experimental chronic cholestasis. *Morphol Embryol (Bucur)*. 1986 Abr-Jun;32(2):123-7.
89. KALER B, KARRAM T, MORGAN WA, *et al*. Are bile acids involved in the renal dysfunction of obstructive jaundice? An experimental study in bile duct ligated rats. *Ren Fail*. 2004 Set;26(5):507-16.
90. ZVI ACKERMAN, KERMELI F, PIZOV G, *et al*. Renal effects of gentamicin in chronic bile duct ligated rats. *Dig Dis Sci*. 2006 Fev;51(2):406-15.
91. CALL NB, TISHER CC. The urinary concentrating defect in gunn strain of rat. Role of bilirubin. *J Clin Invest*. 1975 Fev;55(2):319-29.
92. AMODIO P, RIGOTTI P, BAZZERLA G, *et al*. Are urinary enzymes useful markers of kidney damage in obstructive jaundice? An experimental study on Sprague-Dawley rats. *Nephron*. 1985 Abr;39(4):377-81.
93. FRANCOZ C, GLOTZ D, MOREAU R, DURAND F. The evaluation of renal function and disease in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 2010 Abr;52(4):605-13.
94. PEREZ G, RIETBERG B, OWENS B, *et al*. Urea synthesis by perfused rat liver in experimental uremia. *Nutr Metab*. 1980 Fev;24(6):409-16.
95. NORMAN K, PIRLICH M. Gastrointestinal tract in liver disease: which organ is sick? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008 Set;11(5):613-9.
96. PARKS RW, STUART CAMERON CH, GANNON CD, *et al*. Changes in gastrointestinal morphology associated with obstructive jaundice. *J Pathol*. 2000 Dez;192(4):526-32.
97. CLEMENTS WD, PARKS R, ERWIN P, *et al*. Role of the gut in the pathophysiology of extrahepatic biliary obstruction. *Gut*. 1996 Out;39(4):587-93.
98. DING JW, ANDERSON R, SOLTESZ V, *et al*. The effect of biliary decompression on bacterial translocation in jaundice rats. *HPB Surg*. 1993 Fev;7(1):99-110.
99. BALZAN S, ALMEIDA QUADROS C, CLEVA R, *et al*. Bacterial translocation: overview and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007 Abr;22(4):464-471.
100. WIEST R, GARCIA-TSAO G. Bacterial translocation in cirrhosis. *Hepatology*. 2005 Mar;41(3):422-33.

101. GENCAY C, KILICOGU SS, KISMET K, *et al.* Effect of honey on bacterial translocation and intestinal morphology in obstructive jaundice. *World J Gastroenterol.* 2008 Jun;14(21):3410-15.
102. MARGARITIS VG, FILOS KS, MICHALAKI MA, *et al.* Effect of oral glutamine administration on bacterial translocation, endotoxemia, liver and ileal morphology, and apoptosis in rats with obstructive jaundice. *World J Surg.* 2005 Oct;29(10):1329-34.
103. OGATA Y, NISHI M, NAKAYAMA H, *et al.* Role of bile in intestinal barrier function and its inhibitory effect on bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *J Surg Res.* 2003 Nov;115(1):18-23.
104. ASSIMAKOPOLOS SF, VAGIANOS CE, CHARONIS A, *et al.* Intestinal failure in obstructive jaundice. *World J Gastroenterol.* 2005 Jun;11(24):3806-7.
105. ASSIMAKOPOULOS SF, THORMOPOULOS KC, PATSOUKIS CD, *et al.* Evidence for intestinal oxidative stress in patients with obstructive jaundice. *Eur J Clin Invest.* 2006 Mar;36(3):181-7.
106. ASSIMAKOPOULOS SF, SCOPA CD, VAGIANOS CE. Pathophysiology of increased intestinal permeability in obstructive jaundice. *World J Gastroenterol.* 2007 Dec;13(48):6458-64.
107. SLITT AL, ALLEN K, MORRONE J, *et al.* Regulation of transport expression in mouse liver, kidney and intestine during extrahepatic cholestasis. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Mar;1768(3):637-47.
108. SOKOL RJ, DEVEREAUX M, DAHL R, GUMPRICHT E. "Let there be bile" – understanding hepatic injury in cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006 Jul;43 (Suppl 1):S4-9.
109. MARTINEZ-AUGUSTIN O, MEDINA FS. Intestinal bile acid physiology and pathophysiology. *World J Gastroenterol.* 2008 Oct;14(37):5630-40.
110. HRUZ P, ZIMMERMANN C, GUTMANN H, *et al.* Adaptive regulation of the ileal apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT) in patients with obstructive cholestasis. *Gut.* 2006 Mar;55(3):395-402.
111. NAGANO M, KUROKI S, MIZUTA A, *et al.* Regulation of bile acid synthesis under reconstructed enterohepatic circulation in rats. *Steroids.* 2004 Sep;69(10):701-9.
112. DOWNES M, LIDDLE C. Look who's talking: nuclear receptors in the liver and gastrointestinal tract. *Cell Metab.* 2008 Mar;7(3):195-9.

113. SCHMIDT DR, MANGELSDORF DJ. Nuclear receptors of the enteric tract: guarding the frontier. *Nutr Rev.* 2008 Oct;66(10 Suppl 2):S88-97.