

Modelos experimentais para indução de cirrose hepática em animais: Revisão de literatura

Cristiane Carlin Passos^{1*}

Amanda Olivotti Ferreira¹

Francisco Javier Hernandez Blazquez¹

Ricardo Romão Guerra²

¹Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Departamento de Cirurgia
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo
Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-270
Cidade Universitária – São Paulo – SP, Brasil

²Departamento de Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias
Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58397-000 Areia – PB, Brasil

*Autor para correspondência
criscarlin@usp.br

Submetido em 08/09/2009
Aceito para publicação em 26/01/2010

Resumo

O fígado desempenha papel homeostático fundamental no equilíbrio de numerosos processos biológicos. Cirrose hepática é uma síndrome, na qual convergem algumas doenças hepáticas crônicas, ocorrendo lesão hepatocelular seguida de deposição exacerbada de tecido fibroso ocasionando desorganização da arquitetura tecidual. O fígado está sujeito à lesão potencial por uma grande quantidade de agentes farmacológicos, tóxicos e/ou microbiológicos. Para o estudo de possíveis tratamentos para a cirrose, é necessário o estabelecimento de modelos animais de indução de cirrose, principalmente em roedores de laboratório que mimetizem o processo cirrótico encontrado em animais e homem, que tenham alta reprodutibilidade, homogeneidade e baixa mortalidade. Sendo assim, a indução de cirrose hepática torna-se primordial para investigar doenças hepáticas crônicas, como também para testar possíveis tratamentos terapêuticos para posterior utilização na clínica veterinária e humana. Tetracloreto de Carbono- CCl_4 , Tioacetamida – TAA e Dimetilnitrosamina – DMN têm sido as drogas de eleição para a indução da cirrose experimental em ratos, e são os modelos analisados neste trabalho. O modelo cirrótico com a TAA se mostrou ser o mais promissor pelos seguintes motivos: produz padrão histológico mais próximo ao da cirrose humana, com menor mortalidade, maior reprodutibilidade e segurança, apesar do período de indução ser maior (14 semanas).

Unitermos: cirrose hepática, indução, modelos experimentais, rato, tioacetamida

Abstract

Experimental models for induction of liver cirrhosis in animals: a review. The liver plays a key role in the homeostatic balance of many biological processes. Cirrhosis is a syndrome in which chronic liver diseases converge, leading to hepatocellular injury, the exacerbated deposition of fibrous tissue, and eventually the disruption of the tissue architecture. The liver is subject to potential injury by a large quantity of pharmacological

agents, toxic and/or microbiological. For the study of possible treatments for cirrhosis, it is necessary to establish animal models of induction of cirrhosis, especially in laboratory rodents which mimic the cirrhotic process found in animals and humans, that have high reproducibility and uniformity, with a low mortality rate. Thus, the induction of liver cirrhosis becomes essential to the investigation of chronic liver diseases, as well as to test possible therapeutic treatments for subsequent use in human and veterinary clinics. Currently, experimental studies have been conducted to collect data about the various hepatotoxic drug effects. Carbon tetrachloride -CCl₄, Thioacetamide -TAA and dimethylnitrosamine -DMN were the drugs of choice for cirrhosis induction in experimental models in this study. The model using cirrhotic TAA seems to be the best model for the reason that it produces a histological pattern closest to that of human cirrhosis, leading to lower mortality with higher reproducibility and security, despite the longer period of induction (14 weeks).

Key words: experimental models, induction, liver cirrhosis, rats, thioacetamide

Introdução

O fígado é o principal órgão de detoxificação do corpo (Pouton e Hayanes, 2005). O fígado cirrótico é caracterizado por deformação nodular do parênquima, fibrose e hiperplasia de ductos biliares. A cirrose é um processo difuso de fibrose e conversão da arquitetura normal do fígado em lóbulos estruturalmente anormais (Carlton e McGavin, 1998; Stalker e Hayes, 2007). A fibrose hepática caracteriza-se por um aumento no acúmulo de proteínas na matriz extracelular, excesso de colágeno, ativação e aumento do número de células estreladas hepáticas (Garcia et al., 2002).

A cirrose hepática é a sétima causa de morte no mundo nos EUA, causando mais de 25.000 óbitos a cada ano. No Brasil, são notificadas em média 12.800 mortes/ano (Ministério da saúde do Brasil, 2000). Nos cães a incidência desta doença é de 15% (Stravitz et al., 2009).

Várias drogas afetam o fígado por estresse oxidativo. A exposição do tecido hepático a tais agentes químicos constitui um importante risco a saúde, causando injúria pela produção de radicais livres que iniciam o processo de lipoperoxidação ou por depleção de componentes endógenos de antioxidantes glutatiônicos (Pawa e Ali, 2004).

Uma variedade de medicamentos é suspeita ou confirmada por causar hepatotoxicidade. A doença hepática crônica induzida por medicamentos pode resultar em cirrose, fibrose, esteatose, neoplasia ou hepatite crônica-ativa (Johnson, 1997 apud Laleman et al., 2006).

O principal objetivo do presente trabalho foi, obter por meio de revisão da literatura, um modelo de

cirrose hepática intenso, com alteração significativa da morfologia parenquimal e dos marcadores sanguíneos de lesão hepática. Neste estudo, analisaram-se as principais drogas utilizadas para indução de cirrose hepática, são elas: tetracloreto de carbono (CCl₄), tiocetamida (TAA) e dimetilnitrosamina (DMN) (Pawa e Ali, 2004). Através destas análises será possível avaliar de forma fidedigna os efeitos dos tratamentos anticirróticos a serem testados, enfatizando os riscos e efeitos que essas drogas podem ocasionar na saúde do homem.

Material e Métodos

Os dados obtidos são referentes à pesquisa e consulta ao tema por levantamento bibliográfico em artigos científicos, revistas especializadas e livros. A cirrose hepática está entre as dez causas de morte mais comuns no mundo, sendo seu estudo essencial para a saúde humana e animal (Laleman et al., 2006).

Considerações éticas limitam procedimentos em seres humanos, sendo necessários modelos animais que reproduzam o quadro patológico da cirrose (Laleman et al., 2006).

Nos experimentos analisados ratos foram submetidos à indução das seguintes drogas: CCl₄, DMN, TAA, em diferentes doses e frequências, sendo eutanasiados, necropsiados e seus aspectos macroscópios, microscópicos e bioquímicos mensurados, avaliados e comparados. Alguns trabalhos empregam, ainda, a ligação de ductos biliares, como método de indução, porém, em virtude da invasividade do procedimento e da alta mortalidade, esse modelo não será abordado nesta revisão.

Modelos cirróticos experimentais

As diferentes substâncias utilizadas para a indução da cirrose agem sob variáveis de tempo, dosagens e condições ambientais que, experimentalmente, devem ser controladas a fim de se otimizar os estudos em laboratório. Os modelos experimentais procuram, de maneira rápida e eficiente, reproduzir as consequências do quadro patológico.

Cirrose experimental induzida por tetracloreto de carbono

A hepatotoxicidade do CCl_4 depende do seu metabolismo pelo citocromo P450 dos hepatócitos. A metabolização da molécula de CCl_4 produz radicais livres que lesionam o tecido, levando à peroxidação lipídica e lesão de membrana. (Shi et al., 1998; Sun et al., 2001). Díaz-Gil et al. (1999), em modelo de cirrose experimental induzido por CCl_4 , verificaram aumento significativo da atividade das transaminases (ALT, AST) e fosfatase alcalina (FA). Observaram também, diminuição dos níveis séricos de proteína total, albumina e hematócrito (Díaz-Gil et al., 2009). Macroscopicamente, verifica-se a presença de nódulos fibróticos pós cicatriciais com distribuição difusa e microscopicamente infiltrado inflamatório (Kanno et al., 2003), esteatose, necrose, fibrose, proliferação de ductos biliares e reorganização parenquimal nodular (Stalker e Hayes, 2007).

A indução da cirrose com CCl_4 se dá por via intraperitoneal, em geral, três aplicações por semana, na concentração de 0,15ml/100g de peso vivo, durante períodos variáveis. Li et al. (2002), após administração de CCl_4 por oito semanas em ratos, conseguiram fibrose. No entanto, Simile et al. (2001) e Díaz-Gil et al. (1999) administraram CCl_4 por 14 e 11 semanas respectivamente e diferente do estudo anterior que obtiveram apenas fibrose, estes conseguiram cirrose.

Cremonese et al. (2001) observaram que quando animais são submetidos à inalação de CCl_4 em diferentes intervalos de administração (5^a, 7^a, 9^a, 12^a e 15^a semana), verificaram o estabelecimento de cirrose em 100% dos animais entre a 12^a e 15^a semanas de inalação. A

partir da 5^a semana, houve o aparecimento de necrose hepática difusa associada à esteatose hepatocelular, havendo deposição progressiva de colágeno e fibrose subsequente, atingindo-se o estágio de cirrose hepática micronodular na 15^a semana de inalação.

Contudo Pawa e Ali (2004), induziram cirrose hepática em ratos pela associação entre CCl_4 e CHCl_3 por via intraperitoneal nas dosagens de 1,5ml/kg e 1,0ml/kg, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram que ambas as drogas foram hepatotóxicas, tendo ocorrido aumento das enzimas hepáticas, necrose hepatocelular e falência hepática fulminante. A necrose hepatocelular foi a principal lesão ocasionada pela indução por CHCl_3 . A hepatotoxicidade induzida pelo CCl_4 em ratos gerou nódulos hepáticos e aumento significativo das provas de função hepatobiliar.

Yongping et al. (2009) utilizaram o CCl_4 na dosagem de 3ml/kg intradermicamente na primeira aplicação, seguida de duas aplicações semanais de 2ml/kg por 12 semanas e induziram cirrose em 80% dos ratos estudados.

Cirrose experimental induzida por dimetilnitrosamina

A dimetilnitrosamina (DMN) também conhecida como N-metil-N-nitrosometilamina ou N-Nitrosodimetilamina é um composto hepatotóxico, mutagênico e carcinogênico, com aspecto líquido oleoso de cor amarela, podendo ser absorvido por ingestão ou inalação (Keiichi et al., 2005). Usado em modelos de lesão hepática, causa grande taxa de mortalidade quando fornecido em altas doses. Doses menores, em intervalos de aplicação prolongados não induzem cirrose hepática de modo eficaz. DMN causa ascite nos animais, assim como a elevação da quantidade de bilirrubina, FA, γ -glutamiltransferase, ALT, e redução dos níveis de proteína total, albumina e globulina plasmática. Normalmente a cirrose hepática com DMN é induzida por aplicações intraperitoneais em 3 dias consecutivos durante quatro semanas na dosagem de 10 μ g/kg (Tanaka et al., 2009).

Embora a DMN seja classicamente usada para a indução de cirrose hepática em ratos, sua alta

mortalidade, necrose e inflamação grave com sinais evidentes, induzem a um quadro que não reflete a maioria dos casos de cirrose em humanos e animais (Schuppan et al., 1998; Sato et al., 2000; Watson, 2004).

Cirrose experimental induzida por tioacetamida

Em 1948, descobriu-se que a administração crônica da TAA levava à cirrose hepática e hepatocarcinomas (David et al., 2002). A TAA reduz a atividade antioxidante e acentua a peroxidação lipídica no fígado, estabelecendo uma condição de estresse oxidativo que leva à necrose celular (Túnez et al., 2005). A toxicidade da TAA leva à destruição do parênquima com rompimento de endomembranas e perda da matriz citoplasmática (Muñoz et al., 1991; Karantonis et al., 2009).

O modelo de cirrose hepática experimental pela administração de TAA é amplamente utilizado para o estudo do desenvolvimento do processo patológico e para a pesquisa de alternativas para o seu tratamento. As formas de administração mais empregadas são: a oral (através da água), por inalação, injeções intraperitoneais ou subcutâneas. O método de administração oral não é invasivo, sendo de fácil indução da cirrose para um grande número de animais, porém o inconveniente está na falta de controle na dosagem do fármaco administrada por animal, tendo como consequência a grande variação individual nas lesões resultantes e resultados heterogêneos durante o desenvolvimento do quadro patológico, caracterizando-se como um fator desfavorável para a utilização deste modelo. A administração de TAA oral limita a toxicidade extra-hepática em contraste com aplicação de TAA por inalação, injeções intraperitoneais ou subcutâneas. Contudo, a adoção da injeção intraperitoneal de TAA uniformiza a quantidade de toxina que o animal receberá, diminuindo a variabilidade observada na administração oral (Moreira et al., 1995; Fontana et al., 1996; George et al., 2001; Li et al., 2003).

Laleman et al. (2006) realizaram um estudo com a TAA, baseados em estudos prévios realizados por Lee e Grozmann (1999), os quais a descreveram como sendo uma hepatotoxina causadora de cirrose hepática

semelhante a que acomete humanos. Neste estudo, ratos Wistar foram intoxicados oralmente com TAA e divididos em três grupos. Em dois grupos TAA foi administrada por seis e 12 semanas, respectivamente, enquanto no terceiro grupo a TAA foi administrada por 18 semanas. No início, a concentração foi de 0,03% de TAA na água dos animais para todos os grupos. Posteriormente, as concentrações foram sendo adaptadas de acordo com o peso corpóreo. Estudo similar havia sido realizado por Li et al. (2002), tendo ambos os experimentos alcançado os mesmos resultados. Em ambos, dados histológicos comprovaram que, somente no terceiro grupo houve o aparecimento de um estado cirrótico verdadeiro e homogêneo, verificando a presença de alterações histológicas típicas, como dano e morte de células parenquimais, regeneração parênquima-nodular resultando em uma arquitetura hepática distorcida com septos fibrosos. Nos demais grupos, ratos intoxicados por seis e 12 semanas demonstraram hepatite e fibrose avançada, respectivamente. Em ratos intoxicados por seis e 12 semanas não houve mortalidade e com 18 semanas a mortalidade foi de 16%.

Assim, o modelo realizado por Laleman et al. (2006), onde houve 16% de mortalidade com 18 semanas e maior homogeneidade em relação aos parâmetros avaliados, condiz com os de Li et al. (2002), que sugerem uma administração de TAA por mais de 12 semanas na água dos animais adaptando as doses, de acordo com o peso semanal dos mesmos, resultando em um modelo homogêneo e reprodutível de cirrose. Tal protocolo está de acordo também com o verificado por Al-Bader et al. (2000), onde a TAA foi administrada em ratos Wistar na dose de 0.5g/L na água ou ração pelo período experimental de 12 semanas. Estes demonstraram que, nesta concentração a droga não causou nenhuma mortalidade, no entanto, mudanças patológicas foram manifestadas, como: aumento nos níveis de marcadores enzimáticos de funções hepáticas, diminuição nos níveis de zinco e selênio plasmático, decréscimo no peso dos animais e alterações em vários órgãos como baço e rim (Soylu et al., 2006).

Em estudo realizado por Lima (2008) utilizando ratos fêmeas Wistar, administrou-se injeção intraperitoneal de TAA em todos os animais, três vezes por semana

durante 14 semanas, nas seguintes doses: grupo A (200mg TAA/kg); grupo B (aumento de 20% aos 48 dias); grupo C (aumento de 10% a cada 24 dias); grupo D (aumento de 15% a cada 24 dias) e grupo E (solução salina-controle). Macroscopicamente, a cirrose hepática foi desenvolvida em todos os grupos, sendo os danos de função hepática verificados pelas alterações significativas dos marcadores mais específicos de lesão hepática, observados pela análise bioquímica, mais acentuados nos grupos em que houve aumento de dose. A taxa de mortalidade registrada foi 5% nos grupos A e B, 14,3% no grupo C, 44% no grupo D e zero no grupo E. A mortalidade do grupo D foi elevada (44%) com baixo rendimento do quadro patológico, ou seja, era esperado que o quadro cirrótico desenvolvido por este grupo fosse mais acentuado do que nos outros grupos, entretanto, o que se observou foram valores de ganho de peso e bioquímica sanguínea bastante próximos aos do grupo B e C, com elevada mortalidade e cirrose macroscópica pouco evidente, tendo este grupo apesar do aumento maior na dose, resultados similares aos do grupo A (dose constante) e alta mortalidade, selecionando animais resistentes à droga.

Guerra et al. (2009) induziram uma cirrose macronodular crônica em ratos Wistar, após administração intraperitoneal de TAA por 14 semanas, três vezes por semana na concentração de 200mg/kg. Neste modelo, após a sétima semana de indução, a dosagem da TAA foi acrescida em 20% para inibir o equilíbrio metabólico da droga. Os animais apresentaram elevação de transaminases hepáticas, com aumento do colágeno parenquimal, aumento da expressão gênica de colágeno $\alpha 1$, TGF $\beta 1$, TIMP1, MMP2, assim como proliferação de ductos biliares. Apesar dessas características, a mortalidade foi de apenas 4%. A baixa mortalidade, além de ser característica dos modelos utilizando-se de TAA, parece estar relacionada ao fato dos pesquisadores neste trabalho ajustarem a dose da droga individualmente para cada animal de acordo com seu peso, possibilitando uma menor mortalidade e uma maior homogeneidade. Esse modelo cirrótico também foi recomendado por Lima (2008).

A TAA por via intragástrica, assim como ocorre com outras hepatotoxinas, geralmente incorre em resultados heterogêneos durante o desenvolvimento do

quadro patológico, limitando a aplicação desse modelo. Há certo grau de variação na sensibilidade hepática entre os animais e, após um determinado período de administração da substância, o animal adquire resistência à droga inclusive com retorno ao ganho de peso (Li et al., 2002; Guerra et al., 2009). A sensibilidade hepática à TAA se reduz com o tempo, sugerindo que as doses sejam ajustadas para cada animal de acordo com suas variações de peso, aumentando o rendimento da indução do quadro cirrótico em maior número de animais e reduzindo a mortalidade dos mesmos (Li et al., 2002; Guerra et al., 2009).

Análise comparativa dos modelos cirróticos: vantagens e desvantagens

Sabe-se que, apesar do fígado dos ratos apresentarem uma aparência mais lobulada do que o da espécie humana, há uma correspondência entre os seus lobos e os setores hepáticos do fígado humano. Ambas as espécies pertencem à *Classe Mammalia* e, portanto, apresentam desenvolvimento embriológico semelhante (Langsch et al., 2009), podendo assim, servir de modelo experimental. Comparando os trabalhos realizados com indução de cirrose hepática em roedores de laboratório, observa-se que a cirrose induzida por TAA em ratos induz a uma mortalidade menor (máximo de 35%) (Laleman et al., 2006; Guerra et al., 2009) em relação ao CCl₄ (30-50% ou mais) (Jeong et al., 2001; Li et al., 2002) ou a DMN, a qual pode induzir a 100% de mortalidade (Jeong et al., 2001). A fibrose hepática e os nódulos regenerativos pela cirrose induzida por TAA são mais proeminentes macroscopicamente e o padrão histológico é mais próximo ao da cirrose humana (Laleman et al., 2006). Apesar da fibrose induzida com TAA se desenvolver mais lentamente do que com CCl₄, o parênquima se torna completamente dividido por septos fibrosos bem demarcados (Shea e Manseau, 1968; Al-Bader et al., 2000; Spira et al., 2002). Este desenvolvimento tardio é visto como mais uma das características da TAA em reproduzir adequadamente o estado crônico da doença hepática (Masumi et al., 1999). Geralmente, são necessários anos de exposição ao agente tóxico para que grau semelhante de cirrose hepática se desenvolva no homem.

Em uma visão geral, considera-se como vantagem na indução por CCl_4 sua correlação com a cirrose hepática em relação às questões morfofisiopatológicas, como a insuficiência hepática obtida (Zim et al., 2002; Natarajan et al., 2006). Entretanto, desvantagens, como a presença de septos fibrosos, pouca proliferação ductobiliar e rápida regressão das lesões dificultam o estudo de tratamentos anticirróticos em longo prazo (Cremonese et al., 2001; Li et al., 2002; Muriel e Escobar, 2003), devido à baixa reprodutibilidade e homogeneidade do quadro cirrótico (Laleman et al., 2006) e alto índice de mortalidade encontrados durante a indução (Jeong et al., 2001; Li et al., 2002; Laleman et al., 2006; Lee et al., 2008). Yongping et al. (2009) obtiveram uma porcentagem de 20% de ratos que não apresentaram cirrose hepática, esse dado, adicionado a outros fatos supracitados, demonstra que o CCl_4 não é totalmente eficaz na indução da cirrose. A cirrose resultante também foi pouco homogênea, levando a alta mortalidade, baixa semelhança com a que acomete humanos, e a inalação desta droga pode causar problemas de saúde ao pesquisador (Jeong et al., 2001; Laleman et al., 2006).

Analogamente à TAA, a DMN é uma hepatotóxica com a vantagem de possuir um quadro cirrótico bastante semelhante ao do ser humano, com forte correlação entre o quadro histológico e funcional, com rápida deposição de colágeno. Entretanto, possui como desvantagens a elevada toxicidade, causando, em pequenas doses necrose hepática massiva e alta mortalidade, podendo ser absorvida pela pele, mucosa, intestino e pulmão (Madden et al., 1970; Lee et al., 2008). A TAA proporciona um modelo experimental de cirrose hepática reprodutível, com menor taxa de mortalidade, sendo menos perigoso ao contato com os pesquisadores que as outras duas drogas mencionadas (Akahoshi et al., 2002; Pawa e Ali, 2004). Apesar dessas vantagens, a TAA necessita de um período maior de administração para induzir cirrose hepática e causar elevação das transaminases hepáticas do que com a administração do CCl_4 e DMN (Guerra et al., 2009).

A utilização da TAA para induzir cirrose em ratos é aconselhada, devido ao desenvolvimento de quadro patológico semelhante à cirrose hepática que

acometem humanos e animais, menor mortalidade, maior reprodutibilidade e segurança de utilização. Maior eficácia é obtida com o ajuste da dose (20%) durante indução, de acordo com o peso individual de cada animal. Estas medidas minimizam a mortalidade e proporcionam uma cirrose homogênea. Entretanto, não há alteração significativa de transaminases hepáticas, exceto a Gama Glutamil Transferase (GGT). Desta forma, se o modelo experimental necessita de avaliações sorológicas seriadas, o modelo mais indicado poderia ser o utilizando DMN.

Referências

- Akahoshi, T.; Hashizume, M.; Tanque, K.; Shimabukuro, T.; Gotoh, N.; Tomikawa, M.; Sugimachi, K. 2002. Role of the spleen in liver fibrosis in rats may be mediated by transforming growth factor β -1. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, **17** (1): 59-65.
- Al-Bader, A.; Mathew, T. C.; Khoursheed, M.; Asfar, S.; Al-Sayer, H.; Dashti, H. M. 2000. Thiocetamide toxicity and the spleen: histological and biochemical analysis. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, **29** (1): 3-8.
- Carlton, W.; McGavin. 1998. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. 2ª ed. ArtMed, Porto Alegre, Brasil, 95pp.
- Cremonese, R.; Pereira-Filho, A.; Magalhães, R.; Mattos, A.; Marroni, C.; Zettler, C. 2001. Cirrose experimental induzida pela inalação de tetracloreto de carbono: Adaptação da técnica e avaliação da peroxidação lipídica. **Arquivos de Gastroenterologia**, **38**: 40-47.
- David, P.; Alexandre, E.; Chenard-Neu, M.; Wolf, P.; Jaech, D.; Richert, L. 2002 Failure of liver cirrhosis induction by thiocetamide in Nagase albuminaemic rats. **Laboratory Animals**, **36** (2): 158-164.
- Díaz-Gil, J. J.; García-Monzón, C.; Rúa, C.; Martín-Sanz, P.; Cereceda, R. M.; Miquilena-Colina, M. E.; Machín, C.; Fernández-Martínez, A.; García-Cañero, R. 2009. Liver growth factor antifibrotic activity in vivo is associated with a decrease in activation of hepatic stellate cells. **Histology and histopathology**, **24** (4): 473-479.
- Díaz-Gil, J.; Albillos, A.; Rúa, C.; Machín, C.; Cãnero, R.; Cereceda, R.; Guijarro, M.; Trilla, C.; Escartín, P. 1999. Improvement in liver fibrosis, functionality and hemodynamics in CCl_4 – cirrhotic rats after injection of the Liver Growth Factor. **Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery**, **30** (6): 1065-1072.
- Fontana, L.; Moreira, E.; Torres, M. I.; Fernandez, M. I.; Rios, A.; Medina, F. S.; Gil, A. 1996. Serum amino acid changes in rats with thiocetamide-induced liver cirrhosis. **Toxicology**, **106** (3): 197-206.
- Garcia, L.; Hernández, I.; Sandoval, A.; Salazar, A.; Garcia, J.; Vera, J.; Grijalva, G.; Muriel, P.; Margolin, S.; Armendariz-Borunda, J. 2002. Pirfenidone effectively reverses experimental liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, **37**: 797-805.
- George, J.; Rao, K. R.; Stern, R.; Chandrakasan, G. 2001. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. **Toxicology**, **156** (3): 129-138.

- Guerra, R. R. 2006. **Efeito do tratamento com fatores hepatotróficos em ratos (Wistar) induzidas experimentalmente à cirrose por tiocetamida.** Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil, 185pp.
- Guerra, R. R.; Trotta, M. R.; Parra, O. M.; Avanzo, J. L.; Bateman, A.; Aloia, T. P. A.; Dagli, M. L. Z.; Hernandez-Blazquez, F. J. 2009. Modulation of extracellular matrix by nutritional hepatotrophic factors in thioacetamide-induced liver cirrhosis in the rat. **Brazilian Journal Medical and Biological Research.** Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2009005000027&lng=en&nrm=iso&tlng=en DOI:10.1590/S0100-879X2009005000027. Acesso em 15 de outubro de 2009.
- Jeong, D. H.; Jang, J. J.; Lee, S. J.; Lee, J. H.; Lim, I. K.; Lee, M. J.; Lee, V. S. 2001. Expression patterns of cell cycle-related proteins in a rat cirrhotic model induced by CCl₄ or thioacetamide. **Journal of Gastroenterology**, **36** (1): 24-32.
- Kanno, K.; Tazuma, S.; Chayama, K. 2003. AT1A- deficient mice show less severe progression of liver fibrosis induced by CCl₄. **Biochemical Biophysical Research Communications**, **308** (1): 177-183.
- Karantonis, H. C.; Gribilas, G.; Stamoulis, I.; Giaginis, C.; Spiliopoulou, C.; Kouraklis, G.; Demopoulos, C.; Theocharis, S. E. 2009. Platelet-Activating Factor Involvement in Thioacetamide-Induced Experimental Liver Fibrosis and Cirrhosis. **Digestive Diseases and Sciences.** Disponível em <http://www.springerlink.com/content/hh02143q0n324600/> DOI: 10.1007/s10620-009-0745-0. Acesso em 15 de outubro de 2009.
- Keiichi, M.; Toshiro, S.; Masatoshi, N.; Hiroyuki, T.; Hirokazu, K.; Hisashi, S.; Miki, K.; Miki, N.; Tsuyoshi, Y. 2005. Relationship between Hepatic Gene Expression Profiles and Hepatotoxicity in Five Typical Hepatotoxicant-Administered Rats. **Toxicological Sciences**, **87** (1): 296-305.
- Laleman, W.; Elst I.; Zeegers, M.; Servaes, R.; Libbrecht, L.; Roskams, T.; Fevery, J.; Nevens, F. 2006. A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: Thioacetamide revisited. **European Journal of Clinical Investigation**, **36** (4): 242-249.
- Langsch, A.; Giri, S.; Acikgöz, A.; Jasmund, I.; Frericks, B.; Bader, A. 2009. Interspecies difference in liver-specific functions and biotransformation of testosterone of primary rat, porcine and human hepatocyte in an organotypical sandwich culture. **Toxicology letters**, **188** (3): 173-179
- Lee, F. Y.; Groszmann, R. J. 1999. Experimental models in the investigation of portal hypertension. **Ascites Renal Dysfunct Liver Diseases Pathology Diagnosis Treatment**, **1**: 365-378.
- Lee, S. M.; Park, S. Y.; Jang, G. S.; Ly, S. Y. 2008. The protective effects of ethanol extract of wild simulated ginseng on carbon tetrachloride induced acute hepatic injury in mouse. **Korean Journal of Nutrition**, **41** (8): 701-710.
- Li, H.; Hou, S.; Wang, W.; Yang, L.; Li, Y.; Tan, J. 2003. In vitro effects of metal ions on lipid peroxidation induced by alcohol in mice liver homogenate. **Journal of Environmental Biology**, **24** (4): 423-428.
- Li, X.; Benjamin, I. S.; Alexander, B. 2002. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. **Journal of Hepato-Biliary Pancreatic Surgery**, **36** (4): 488-493.
- Lima, T. C. 2008. **Cirrose hepática induzida por tiocetamida: Estudo do modelo por injeção intraperitoneal a longo prazo em ratos Wistar.** Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 140pp.
- Loiola, A. 2000. Ministério da Saúde do Brasil – Planilhas e estatísticas online. Disponível em <http://www.saude.gov.br/>
- Madden, J. W.; Gertman, P. M.; Peacock, E. E. 1970. Dimethylnitrosamine-induced hepatic cirrhosis: a new canine model of an ancient human disease. **Surgery**, **68** (1): 260-268.
- Masumi, S.; Moriyama, M.; Kannan, Y.; Ohta, M.; Koshitani, O.; Sawamoto, O.; Sugano, T. 1999. Changes in hepatic nitrogen metabolism in isolated perfused livers during the development of thioacetamide-induced cirrhosis in rats. **Toxicology**, **135** (11): 21-31.
- Moreira, E.; Fontana, L.; Torres, M. I.; Fernández, I.; Ríos, A.; Sánchez de Medina, F.; Gil, A. 1995. Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids influence the recovery of thioacetamide-induced livers cirrhosis in rats. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, **19** (6): 461-469.
- Muñoz, T. E.; Paz, B. J. I.; López, B. A.; Abad, H. M. M.; Carrascal, M. E. 1991. Experimental thioacetamide- induced cirrhosis of the liver. **Histology and Histopathology**, **6** (1): 95-100.
- Muriel, P.; Escobar, Y. 2003. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. **Journal of Applied Toxicology**, **23** (2): 103-108.
- Natarajan, S. N.; Thomas, S.; Ramamoorthy, P.; Balasubramanian, K. 2006. Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, **21** (6): 947-957.
- Pawa, S.; Ali, S. 2004. Liver necrosis and fulminant hepatic failure in rats: protection by oxyanionic form of tungsten. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1688** (3): 210-222.
- Pouton, C. W.; Haynes, J. M. 2005. Pharmaceutical applications of embryonic stem cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **57** (13): 1918-1934.
- Sato, M.; Makubari, M.; Kawamura, M.; Sugimoto, J.; Matsumoto, K.; Ishii, T. 2000. The decrease in total collagen fibers in the liver by hepatocyte growth factor after formation of cirrhosis induced by thioacetamide. **Biochemical Pharmacology**, **56** (6): 681-690.
- Schuppan, D.; Strobel, D.; Han, E. G. 1998. Hepatic fibrosis – Therapeutic strategies. **Digestion**, **59**: 385-390.
- Shea, S. M.; Manseau, E. J. 1968. Experimental toxic cirrhosis in the rat. II. Kinetics of hepatocyte proliferation during intermittent thioacetamide intoxication. **The American Journal of Pathology**, **52** (1): 55-68.
- Shi, J.; Aisaki, K.; Ikama, Y.; Wake, K. 1998. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. **The American Journal of Pathology**, **153** (2): 515-525.
- Simile, M. M.; Banni, S.; Angioni, E.; Carta, G.; De Miglio, M. R.; Muroli, M. R.; Calvisi, D. F.; Carru, A.; Pascale, R. M.; Feo, F. 2001. 5'- Methylthioadenosine administration prevents lipid peroxidation and fibrogenesis induced in rat liver by carbon-tetrachloride intoxication. **Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery**, **34** (3): 386-394.
- Soylu, A.; Aydogdu, N.; Basaran, U.; Altaner, S.; Tarcin, O.; Gedik, N.; Umit, H.; Tezel, A.; Dockmeci, G.; Baloglu, H.; Ture,

- M., Kutlu, K.; Kaymak, K. 2006. Antioxidants vitamin E and C attenuate hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats. **World Journal of Gastroenterology**, **42** (12): 6835-6841.
- Spira, G.; Mawasi, N.; Paizi, M.; Anbinder, N.; Genina, O.; Alexiev, R.; Pines, M. 2002. Halofuginone, a collagen type I inhibitor improves liver regeneration in cirrhotic rats. **Journal of Hepato-Biliary Pancreatic Surgery**, **37** (3): 331-339.
- Stalker M. J.; Hayes, M. A. 2007. Liver and biliary system. **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**, **2**: 297-388.
- Stravitz, R. T.; Kramer, D. J.; Medscape. 2009. Management of acute liver failure. **Nature reviews. Gastroenterology & Hepatology**, **6**: 542-553.
- Sun, A. Y.; Ingelman-Sundberg, M.; Neve, E.; Matsumoto, H.; Nishitani, Y.; Minowa, Y.; Fukui, Y.; Bailey, S. M.; Patel, V. B.; Cunningham, C. C.; Zima, T.; Fialova, L.; Mikulikova, L.; Popov, P.; Malbohan, I.; Janebova, M.; Nespork, K.; Sun, G. Y. 2001. Etanol and oxidative stress. **Clinical & Experimental Research**, **25** (5): 237-243.
- Tanaka, H.; Ueda, H.; Fukuchi, H.; Ichinose, M. 2009. Antifibrotic effect of edaravone in rat liver cirrhosis induced by dimethylnitrosamine. **Clinical and Experimental Medicine**, **9** (3): 229-233.
- Túnez, I.; Muñoz, M. C.; Villavivencio, M. A.; Medina, F. J.; Prado, E. P.; Espejo, I.; Barcos, M.; Salcedo, M.; Feijóo, M.; Montilla, P. 2005. Hepato- and neurotoxicity induced by thiocetamide: protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide. **Pharmaceutical Research**, **52** (3): 223-228.
- Watson, P. J. 2004. Chronic hepatitis in dogs: a review of current understanding of the aetiology, progression and treatment. **The Veterinary Journal**, **167**: 238-241.
- Yongping, M.; Ping, L.; Guangli, D.; Jinxing, D.; Gaoqiang, W.; Aihua L.; Lei, W.; Fenghua, L. 2009. Action mechanism of Yi Guan Jian Decoction on CCl₄ induced cirrhosis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, **121** (1): 35-42.
- Zim, M. C.; Silveira, T. R.; Schwartzmann, G.; Cerski, T.; Motta, A. 2002. Potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity by pentosan polysulfate in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **35** (11): 1339-1346.