



**FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ALTERAÇÕES INICIAIS DA FIBROSE SEPTAL POR  
*Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) EM RATOS**

**MANUELA DOS SANTOS CALDAS**

**Salvador - Bahia  
2014**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina**  
**Investigativa**

**ALTERAÇÕES INICIAIS DA FIBROSE SEPTAL POR**  
***Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) EM RATOS**

**MANUELA DOS SANTOS CALDAS**

Orientador: Prof. Dr. Zilton de Araújo Andrade

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

**Salvador - Bahia**  
**2014**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Caldas, Manuela dos Santos  
C145a Alterações iniciais da fibrose septal por *Capillaria Hepatica* (Bancroft, 1893)  
em ratos / Manuela dos Santos Caldas. - 2014.  
71 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Zilton de Araújo Andrade, Laboratório de Patologia  
Experimental.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)  
– Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.

1. Fibrose septal.. 2. *Capillaria hepática*. 3. Ductos biliares. I.Título.

CDU 616.995.132

"ALTERAÇÕES INICIAIS DA FIBROSE SEPTAL POR *CAPILLARIA HEPÁTICA*  
(BANCROFT, 1893) EM RATOS"

**MANUELA DOS SANTOS CALDAS**

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos  
Pesquisador Titular  
CPqGM/FIOCRUZ



---

Dr. Daniel Abensur Athanázio  
Professor Adjunto  
FAMED/UFBA



---

Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira  
Pesquisador Titular  
CPqGM/FIOCRUZ

Aos meus pais, Veraldice Caldas e Antonio José Caldas (*in memorian*) pelo amor, dedicação, exemplo e incentivo.

Aos meus irmãos, Rebeca, Maiana, Jônatas e Joabe Caldas, pelo amor, pelo carinho, pelo apoio e pelo conforto de tê-los por perto.

À querida tia Eliene Caldas, pelo cuidado, pelas suas palavras contínuas de incentivo e por sempre me impulsionar a querer mais da vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me acompanhado em mais uma etapa da minha missão.

Ao Prof. Dr. Zilton Andrade, pela paciência, por ter me feito aprender muitos valores, além dos acadêmicos e pelo carinho com o qual sempre fui tratada. Ter sido sua aluna foi uma honra e uma experiência enriquecedora.

A Yánnick Fonseca, pela amizade, pelo apoio ao longo do mestrado e por ter compartilhado comigo tantos conhecimentos.

A Dra. Márcia Souza, pelas contribuições, por ter disponibilizado parte do seu tempo em meu auxílio e por todo apoio.

A Ana Cristina Gonzalez, pela realização das técnicas de imunohistoquímica, pelo carinho e por sempre me contagiar com seu bom-humor e alegria.

A Carine Azevedo, pela amizade, pela compreensão e pelo apoio desde a minha entrada na Fiocruz-Ba.

A Antonio Carlos, pelas palavras de incentivo e pela sua disponibilidade sempre.

A Elisângela Trindade, pela amizade, por toda colaboração e pelo carinho.

A Thiago Pereira, pelo apoio, pelas dicas e discussões.

Aos meus colegas do LAPEX (Laboratório da Patologia Experimental), Filipi Polli, Samaly Souza, Delsilene Borges, Ana Flávia Gottschall, João Miranda, particularmente a Everton Batista e a Florisvaldo Ramos, pelo apoio nos momentos de intranquilidade, pelo carinho e pela agradável convivência.

Aos colegas do LACEI (Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular), em especial à Dra. Sônia Gumes Andrade, à Lorena Magalhães e a Márcio Almeida pelo apoio e pela disponibilidade em vários momentos.

À Dra. Lúcia Moreno, à Dra. Andriana Lanfredi e ao Dr. Cláudio Figueira, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM), pela ajuda e cooperação imprescindíveis no desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Histotecnologia (CPqGM), pelos cortes em micrótomo e pelas colorações de rotina.

Aos colegas do Biotério (CPqGM), por toda ajuda e cooperação.

Às funcionárias da Biblioteca do CPqGM, pelo suporte e colaboração na pesquisa e na busca de artigos científicos.

À coordenação de ensino, pelos esclarecimentos solicitados e ajuda nas questões de ordem administrativa, especialmente a Taíse Cayres.

Às secretárias Jaqueline e Miralva, do LAPEX e do LACEI, respectivamente, pela cooperação e gentilezas.

A Zaira Onofre, por ter suscitado em mim o interesse inicial pela pesquisa e por toda atenção dispensada na fase de ambientação ao LAPEX.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, pelo apoio financeiro e pela permissão para o uso de seus equipamentos.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar  
seria menor se lhe faltasse uma gota.

*Madre Teresa de Calcutá.*



CALDAS, Manuela dos Santos. Alterações iniciais da fibrose septal por *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) em ratos. 71 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## RESUMO

O espaço-porta é o local de origem da fibrose em muitas doenças crônicas hepáticas. Essa área do fígado participa da drenagem linfática hepática e abriga diversos elementos celulares potencialmente fibrogênicos. Estudos sobre a fibrose hepática relacionados à infecção experimental de ratos pelo helminto *Capillaria hepatica* têm demonstrado que a fibrose começa em áreas portais com a distribuição de septos que sulcam o parênquima hepático se desenvolvendo em áreas próximas ao espaço de Disse. Entretanto, apesar de esta fibrose ocorrer de forma paralela aos sinusóides, estudos têm revelado que não apenas as células estreladas hepáticas participam da fibrose septal, mas também outros tipos celulares residentes nos espaços-porta. Diante destes aspectos, o presente estudo desenvolveu-se com o intuito de investigar a contribuição das células potencialmente fibrogênicas dos espaços-porta, nas fases iniciais da infecção, onde a fibrose se concentra. Para isso, foram utilizados fragmentos de fígado, em blocos parafinados, disponíveis nos arquivos do Laboratório de Patologia Experimental (CPqGM/Fiocruz) provenientes de ratos infectados com 800 ovos de *Capillaria hepatica* e foi possível observar que ocorreu a proliferação de colangiócitos e a concentração de miofibroblastos em áreas portais, além da ativação de células estreladas hepáticas, sendo todos os resultados vistos por meio da coloração de rotina HE, Picro-sírius vermelho e imunohistoquímica para  $\alpha$ -actina de músculo liso, CD31 e GFAP.

**Palavras-chave:** Fibrose septal, *Capillaria hepática*, Espaço-porta, Ductos biliares.

CALDAS, Manuela dos Santos. Initial alterations of Septal fibrosis by *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) in rats. 71 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## ABSTRACT

Portal space is the local of origin for fibrosis in many chronic liver diseases. This area is involved with lymph drainage and contains several cell types, potentially fibrogenic. Experimental studies related to hepatic fibrosis during *Capillaria hepatica* infection in rats have suggested that the septal fibrosis indeed takes origin from portal spaces, with the distribution of the septa in the parenchymal region in proximity areas of Disse space. However, despite this fibrosis occurs in parallel to sinusoids, studies have revealed that not only the hepatic stellate cells participate in septal fibrosis, but also other resident cell types in the portal spaces. In face these aspects, the goal of present study was investigate the contribution of the cells potentially fibrogenic in the portal space, in the early phases of the infection. For this, blocks in paraffin available of the liver of rats infected with 800 eggs of *Capillaria hepatica* archived in the Laboratory of Experimental Pathology (Research Center Gonçalo Moniz, Fiocruz - BA), were utilized and it was observed that proliferation of colangiocytes and concentration of myofibroblasts occurred portal areas, in addition to the activation of hepatic stellate cells. All results were analysed by routine staining HE, Sirius red and immunohistochemistry for  $\alpha$ -SMA, GFAP and CD31.

**Keywords:** Septal fibrosis, *Capillaria hepatica*, Portal space, Bile ducts.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Desenho Experimental.....	30
Figura 2	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas - HE - 12 dias.....	35
Figura 3	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas - HE - 14 dias.....	36
Figura 4	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas - HE - 16 dias.....	37
Figura 5	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas - HE - 18 dias.....	38
Figura 6	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas – Picro-sírius vermelho- 12 dias .....	39
Figura 7	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas – Picro-sírius vermelho -14 dias .....	40
Figura 8	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas – Picro-sírius vermelho - 16 dias .....	41
Figura 9	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas – Picro-sírius vermelho - 18 dias .....	42
Figura 10	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas - $\alpha$ -Actina de músculo liso - 12 dias .....	43
Figura 11	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas - $\alpha$ -Actina de músculo liso - 14 dias .....	44

Figura 12	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas - $\alpha$ -Actina de músculo liso - 16 dias .....	45
Figura 13	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas - $\alpha$ -Actina de músculo liso - 18 dias .....	46
Figura 14	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas - CD- 31- 12 dias.....	47
Figura 15	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas - CD- 31 - 14 dias .....	48
Figura 16	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas - CD- 31 - 16 dias .....	49
Figura 17	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas - CD- 31 - 18 dias .....	50
Figura 18	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas - GFAP - 12 dias .....	51
Figura 19	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas - GFAP - 14 dias .....	52
Figura 20	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas - GFAP -16 dias.....	53
Figura 21	Fotomicrografias ópticas de secções hepáticas - GFAP - 18 dias .....	54
Quadro 1	Análise histológica semiquantitativa – HE.....	57
Quadro 2	Análise histológica semiquantitativa – Picro-sírius vermelho .....	57
Quadro 3	Análise histológica semiquantitativa - $\alpha$ - Actina do músculo liso.....	57
Quadro 4	Análise histológica semiquantitativa - CD-31 .....	57

Quadro 5 Análise histológica semiquantitativa - GFAP ..... 57

TABELA 1 Lista de anticorpos e suas referências ..... 29

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>C.HEPATICA</i>	<i>Capillaria hepatica</i>
CCL4	Tetracloroeto de carbono
CD-31	Grupo de diferenciação - 31
CEHs	Células estreladas hepáticas
FATOR VIII	Fator de Von Willebrand
FPs	Fibroblastos portais
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
HE	Hematoxilina e Eosina
IL-13	Interleucina - 13
IL-6	Interleucina - 6
MMPs	Metaloproteinases
NTPD2	Ecto-ATPase nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase- 2
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
TE-7	Marcador específico de fibroblastos
TEM	Transição epitélio-mesênquima
TGF- $\beta$ 1	Fator de crescimento transformador beta - 1
TIMPs	Inibidores teciduais de Metaloproteinases
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1	JUSTIFICATIVA.....	17
1.2	PROBLEMA.....	18
1.3	HIPÓTESE.....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1	FIBROSE HEPÁTICA.....	18
2.2	CÉLULAS HEPÁTICAS POTENCIALMENTE FIBROGÊNICAS.....	21
2.3	MODELO DE INDUÇÃO DE FIBROSE SEPTAL PELA <i>Capillaria hepatica</i> EM RATOS.....	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
4.1	HISTOLOGIA.....	28
4.2	IMUNOHISTOQUÍMICA.....	28
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	31
5.1	HE.....	31
5.2	PICRO-SÍRIUS VERMELHO.....	31
5.3	$\alpha$ -ACTINA DO MÚSCULO LISO.....	32
5.4	CD-31.....	33

5.5 GFAP .....	33
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>64</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização no fígado afeta áreas distintas de acordo com diferentes etiologias, sendo que em muitas doenças este processo se desenvolve a partir dos espaços-porta, levantando questões sobre qual o papel que os vários constituintes desta estrutura adquirem (ou assumem) durante o desenvolvimento da fibrose (RAMADORI e SAILE, 2004).

Estudos sobre fibrose hepática associada à infecção experimental de ratos pelo helminto *Capillaria hepatica* têm revelado que a fibrose começa em áreas portais (SOUZA et al., 2006b; LEMOS e ANDRADE, 2010). O laboratório de Patologia Experimental (CPqGM/Fiocruz-Ba) tem utilizado ratos como modelo experimental da fibrose hepática causada pela infecção com a *Capillaria hepática*. Este roedor tem permitido a exploração de diversos aspectos relacionados com a fibrogênese dependente da Capilariase hepática, contudo grande parte dos experimentos têm sido desenvolvidos nas fases crônicas da infecção.

A partir disto, existe interesse do nosso grupo de pesquisa em entender o que acontece nas fases iniciais da infecção e quais são os tipos celulares implicados na fibrose septal hepática.

### 1.1 JUSTIFICATIVA

Estudos sobre a fibrose hepática com a infecção experimental de ratos pelo helminto *Capillaria hepatica* têm demonstrado que a fibrose começa em áreas portais com a distribuição de septos que sulcam o parênquima hepático, desenvolvendo-se em áreas próximas ao espaço de Disse. Entretanto, apesar de tal fibrose ocorrer de forma paralela aos sinusóides, os estudos têm trazido sugestões de que não apenas células estreladas hepáticas participam da fibrose septal, mas sim outros tipos celulares residentes nos espaços-porta.

Este tipo de fibrose se desenvolve de forma peculiar em um curto período de tempo, sem perturbação estrutural aparente ou funcional dos sinusóides hepáticos, e sem o desenvolvimento de cirrose.

Diante destes aspectos, a investigação das células que estão envolvidas com a produção da fibrose septal por *Capillaria hepatica* em ratos, em fases iniciais da

infecção, pode colaborar no esclarecimento da patogenia da fibrose septal, a qual cursa com um mau prognóstico em algumas doenças crônicas do fígado.

## 1.2 PROBLEMA

Quais são as células que participam da formação inicial da fibrose septal hepática no modelo da Capilaríase do rato?

## 1.3 HIPÓTESE

Células originárias dos espaços-porta participam da formação da fibrose septal hepática, em fases iniciais, no modelo da Capilaríase do rato.

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 FIBROSE HEPÁTICA

A fibrose é o resultado de reações inflamatórias crônicas induzidas por uma variedade de estímulos tóxicos, infecciosos, metabólicos e imunológicos, caracterizada pela formação em excesso de componentes da matriz extracelular. No fígado, a fibrose é tradicionalmente vista como um processo de cicatrização progressivo que envolve múltiplos eventos celulares e moleculares em resposta à lesão tecidual contínua, promovendo uma resposta cicatricial fora do controle que pode comprometer a arquitetura e as funções do órgão (IREDALE et al., 1998; ARTHUR, 2000; WYNN, 2008; POVERO et al., 2010).

A matriz extracelular contém uma substância fundamental secretada por células do tecido conjuntivo, onde se encontra uma enorme variedade de moléculas que funcionam como ligantes ou receptores para fatores de crescimento, hormônios e citocinas, dando à matriz a função de reservatório. Além desta função, a matriz extracelular também funciona como uma “plataforma”, dando suporte à migração de células endoteliais na formação de novos capilares durante o reparo tecidual (RUOSLAHTI et al., 1991; ANDRADE, 2005).

No fígado normal, a matriz extracelular é composta por uma série de macromoléculas incluindo colágenos (I, III, IV, V e VI), glicoproteínas e proteoglicanos, mas, em consequência de agressões, a matriz extracelular hepática sofre alterações quantitativas e qualitativas, aumentando a quantidade do colágeno fibrilar

(predominantemente colágeno I e III), além da laminina, elastina, fibronectina e proteoglicanos (ARTHUR, 2000; WYNN, 2008; IREDALE et al., 2012).

O reparo tecidual hepático pode ser considerado como benéfico, contudo este mecanismo torna-se patogênico quando não ocorre de forma equilibrada, resultando no depósito substancial de proteínas da matriz, o que leva a substituição do tecido de origem por tecido fibroso. A regulação deste processo se dá a partir da interação dinâmica entre a síntese e a degradação da fibrose que ocorre através das metaloproteinases (MMPs) e dos seus inibidores (SCHUPPAN et al., 2001; IREDALE et al., 2012).

As metaloproteinases são enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular. Estas enzimas podem ser produzidas por células, como hepatócitos, células de Kupffer, neutrófilos e pelas células estreladas hepáticas. As suas principais representantes no fígado são MMP-2 (gelatinase A) expressa por células estreladas hepáticas, MMP-9 (gelatinase B) expressa pelas células de Kupffer e estromelisina que é secretada por células inflamatórias (IREDALE, 1997; ARTHUR, 2000; WYNN, 2007).

Dentre as células secretoras das enzimas de degradação, estão as células estreladas hepáticas, pericitos específicos do fígado, residentes do espaço subendotelial de Disse que têm importante papel na regulação da fibrogênese e da fibrólise, pois participam ativamente destes mecanismos biológicos, produzindo tanto as enzimas de degradação da matriz (MMPs), quanto seus inibidores teciduais (TIMPs – Tissue inhibitors of metalloproteinases) (FRIEDMAN, 2008; IREDALE et al., 2012).

A fibrose é precedida por reações inflamatórias persistentes, em que uma gama de células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos produzem mediadores solúveis que amplificam a resposta cicatricial pelo recrutamento de células T. As células inflamatórias também são capazes de produzir citocinas, como fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ 1) e IL-13 (Interleucina-13), ativando os fibroblastos a se diferenciarem em miofibroblastos produtores de matriz fibrótica durante o reparo das lesões (BATALLER e BRENNER, 2009; DUFFIELD et al., 2012).

A família das citocinas possui um papel chave na regulação da fibrose, sendo composta de quimiocinas, interleucinas, interferons, fatores de crescimento, fatores

angiogênicos, substâncias vasoativas, receptores e proteases solúveis (BORTHWICK et al., 2012).

Entre as citocinas pró-fibrogênicas, encontra-se o TGF- $\beta$ 1 que é relatado como fator de crescimento indutor de fibrose. Esta citocina é produzida principalmente por monócitos e macrófagos, sendo a principal isoforma implicada na fibrose hepática, ativando fibroblastos *in vitro* e *in vivo* (HERNANDEZ-GEA e FRIEDMAN, 2011).

Modelos de indução da fibrose por Tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>), ligadura do ducto biliar, *Schistosoma mansoni*, *Capillaria hepatica*, ou por soro de porco têm demonstrado que a formação de novos vasos (angiogênese) está intensamente ligada ao desenvolvimento da fibrose. A angiogênese é a etapa fundamental do processo de cicatrização, em que novos vasos sanguíneos são formados a partir de outro pré-existente (FOLKMAN, 1992; CARMELIET, 2003; SOUZA et al., 2006a; LEMOS e ANDRADE, 2010).

A literatura tem discutido a íntima relação que existe entre a angiogênese e a formação da fibrose. Estudos têm chamado a atenção para tendência que os pericitos têm a se destacar da membrana dos capilares proliferados, diferenciando-se em miofibroblastos. Os pericitos são células presentes na parede dos vasos que estão mergulhadas na membrana basal, em contato com as células endoteliais e detêm propriedades contráteis, assim como as células do músculo liso (BERGERS e SONG, 2005; LEE et al., 2007).

A formação dos novos capilares é regulada por citocinas angiogênicas. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é considerado o mediador central da angiogênese, com ação mitógena sobre células endoteliais derivadas de artérias, veias e vasos linfáticos. Este fator estimula a angiogênese, induzindo a modulação da matriz extracelular para facilitar a migração e o brotamento dos novos vasos formados através do estroma (FERRARA e DAVIS-SMITH, 1997). Assim como o VEGF, o CD31(“Cluster of differentiation- 31”) e o Fator VIII têm sido estreitamente correlacionados com a angiogênese no fígado e podem ser demonstrados através da técnica de imunohistoquímica (LEMOS e ANDRADE, 2010; LEE et al., 2013).

Foi relatado por Souza e colaboradores (2006a) que a angiogênese precede a síntese do colágeno durante a formação da fibrose septal em ratos infectados por *Capillaria hepatica*. Além deste, estudos da reversão de lesões esquistossomóticas, após tratamento com quimioterapia específica, têm demonstrado que a angiogênese tem

participação na fibrogênese e na regressão da fibrose, sugerindo que este mecanismo é uma via de ação de mão dupla (ANDRADE e SANTANA, 2010).

## 2.2 CÉLULAS HEPÁTICAS POTENCIALMENTE FIBROGÊNICAS

No processo de cicatrização das lesões hepáticas, a matriz extracelular é produzida por células chamadas de miofibroblastos (KISSELEVA e BRENNER, 2008). O miofibroblasto é o elemento chave da síntese de colágeno no fígado e, segundo Hinz e colaboradores (2007), eles são derivados de uma população celular heterogênea, são imunorreativos a  $\alpha$ -actina do músculo liso, possuem características ultraestruturais e moleculares semelhantes, mas exibem alguns aspectos específicos de acordo com o padrão de fibrose na qual estão inseridos. Além destas características, os miofibroblastos demonstram grande capacidade de migração, sendo encontrados nos focos de fibrose (GALLI et al., 2005; GUYOT et al., 2006).

A origem dos miofibroblastos no fígado tem sido bastante discutida, contudo a maioria dos autores sugere que esta célula origina-se de diferentes tipos celulares, como células estreladas hepáticas, fibroblastos do trato portal, células originadas da transição epitélio-mesênquima, células da segunda camada da veia central, células originadas da medula óssea, entre outras (HINZ et al., 2007; NOVO et al., 2009; IWASAKO et al., 2012).

As células estreladas hepáticas são descritas como as principais células responsáveis pela formação da fibrose. Estes lipócitos ou células de Ito, como também são chamadas as células estreladas hepáticas, são caracterizados como células mesenquimais, localizadas no espaço perisinusoidal, em contato com os hepatócitos e com as células endoteliais dos sinusóides hepáticos. Estas células desempenham funções no fígado como a homeostase e a armazenagem de grande parte da vitamina A do corpo (ROCKEY, 2001; SAREM et al., 2006; HELLERBRAND, 2013).

Por muito tempo, os estudos sobre fibrose ficaram baseados nas células estreladas hepáticas como origem fundamental dos miofibroblastos no fígado, entretanto outras células mesenquimais distintas também podem converter-se em células miofibroblásticas com participação relevante na fibrogênese hepática. Este enfoque nas células estreladas hepáticas se deve à descoberta da técnica de isolamento e cultivo *in vitro* das células de Ito, o que justifica em parte o sucesso das pesquisas e a

supervalorização das células estreladas hepáticas como elemento principal da fibrose (KNOOK et al., 1982; FRIEDMAN e ROLL, 1987; GUYOT et al., 2006; BEAUSSIER et al., 2007).

A ativação das células estreladas hepáticas é deflagrada por agressões ao tecido hepático, sendo esta ação vista como um passo crítico para fibrogênese, que é promovida por citocinas pró-fibrogênicas secretadas por hepatócitos danificados, células de Kupffer e células inflamatórias. Quando sensibilizadas, as células estreladas hepáticas perdem seu estoque de gordura, transdiferenciam-se em miofibroblastos e tornam-se secretoras de componentes anormais da matriz extracelular (FRIEDMAN, 2000; GRESSNER et al., 2002; BATALLER e BRENNER, 2009; SNOWDON e FALLOWFIELD, 2011).

Nas últimas décadas, muitos marcadores têm sido testados nas células estreladas hepáticas. Estas células expressam marcadores neurais como sinaptofisina, nestina e proteína glial fibrilar ácida (GFAP), sendo esta detectada em células estreladas hepáticas de ratos e humanos. A GFAP é comumente encontrada em astrócitos do sistema nervoso central e é expressa *in vivo* no fígado por uma população de células estreladas hepáticas quiescentes. No sistema nervoso central, a expressão de GFAP é essencial ao reparo da barreira hematoencefálica, após agressão. Assim como no cérebro, a expressão do GFAP aumenta na fase aguda da lesão hepática em ratos e torna-se reduzida na fase crônica, sendo empregado com um indicador precoce de fibrose hepática (KNITTEL et al., 1996; LEVY et al., 1999; ROSKAMS et al., 2004; CARROTI et al., 2008).

O espaço-porta é o centro do desenvolvimento da fibrose em muitas doenças crônicas hepáticas. Além da fibrose relacionada com doenças do sistema biliar, algumas doenças crônicas virais e alcoólicas igualmente podem ter o trato portal como sítio principal da resposta fibrogênica no fígado. Estruturalmente o espaço-porta contém vasos, veia-porta e artéria, além do ducto biliar e do vaso linfático. Enquanto a veia-porta, assim como a artéria, possui paredes próprias com células do músculo liso potencialmente fibrogênicas, o ducto biliar possui uma membrana basal rodeada por fibroblastos periductulares. Fibroblastos também são encontrados em torno dos vasos portais, bem como no tecido conjuntivo portal adjacente (CASSIMAN et al., 2002; MAGNESS et al., 2004; BATALLER e BRENNER, 2005; MCCUSKEY, 2008; DRANOFF e WELLS, 2010).

Esses aspectos ressaltam o papel de importância que as células pro-fibrogênicas do trato portal exercem na formação da fibrose. A população celular residente do espaço-porta que pode induzir fibrose é diversificada e abarca elementos, como fibroblastos portais, colangiócitos (células epiteliais dos ductos biliares) que podem se transformar em miofibroblastos através da transição epitélio-mesênquima, pericitos vasculares, além das células musculares das paredes das veias e das artérias (RAMADORI e SAILE, 2002, 2004; MICHALAK et al., 2003; CLOUSTON et al., 2005; LEMOS e ANDRADE, 2010; FORBES, 2011).

A fibrose hepática que ocorre em doenças que comprometem o sistema biliar traz evidências sobre a participação das células mesenquimais do espaço-porta, que incluem fibroblastos localizados em torno de ductos biliares como fonte de miofibroblastos no fígado. Os fibroblastos portais são células mesenquimais, fusiformes e, como outros fibroblastos, são caracterizados por dois aspectos-chave: retículo endoplasmático rugoso proeminente e longas projeções citoplasmáticas (PHAN, 2008; CARRUTHERS et al., 1962 apud DRANNOF e WEELS, 2010; IWASAKO, 2012).

No fígado normal, os fibroblastos portais (FPs) participam da manutenção fisiológica da matriz, além de possuir um aspecto morfológico e um repertório antigênico similar aos fibroblastos de outros órgãos. Em condições normais, estas células não expressam  $\alpha$ -actina do músculo liso e são distinguidas das células estreladas hepáticas por não expressarem citoglobina, desmina ou GFAP, que são marcadores utilizados para identificar miofibroblastos derivados de células estreladas hepáticas (TOMASEK et al., 2002; BOSSELUT et al., 2010).

Os fibroblastos portais expressam TE-7 (marcador fibroblástico específico), além de marcadores específicos como elastina, IL-6 (interleucina-6), Fibulina-2 e NTPD2 (“*ecto-atpase nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2*”) (HENDERSON e FORBES, 2008).

A transição epitélio-mesênquima é sugerida como possível origem de miofibroblastos no processo de reparo no fígado. Este é um mecanismo que ocorre durante a fase embrionária e se desenvolve quando o tecido está sendo construído ou remodelado, levando células epiteliais, geralmente expostas a membros da superfamília do TGF- $\beta$ , a se diferenciarem em células mesenquimais (SHOI e DIEHL, 2009; ZEISBERG e NEILSON, 2009)

As células epiteliais (como hepatócitos e colangiócitos) são aquelas que expressam marcadores epiteliais (ex. E-caderina), além de proteínas que medeiam o contato célula-célula e célula-matriz. Possuem um citoesqueleto organizado, que é o aspecto responsável pela polaridade ápico-basal das células epiteliais normais, são justapostas e formam camadas aderentes (KALLURI e WEINBERG, 2009).

Ao passar pela transição epitélio-mesênquima, as células epiteliais perdem suas características de origem, com perda de polaridade, perda das ligações intercelulares, expressão de marcadores mesenquimais (ex.  $\alpha$ -actina do músculo liso e MMP-2) e ganho de motilidade, o que faz com que estas células se comportem como células migratórias após o rearranjo do citoesqueleto com o aparecimento dos filamentos intermediários (ACLOQUE et al., 2009; KALLURI e WEINBERG, 2009).

Evidências recentes sustentam o conceito de que células epiteliais podem se transformar em células mesenquimais. Estudo feito em ratos cirróticos tratados com CCL4, além de experimentos realizados *in vitro*, tem trazido aportes para que a transição epitélio-mesênquima seja considerada como fator de contribuição para a fibrose hepática (OMENETTI et al., 2007, 2008; NITTA et al., 2008; RYGIEL et al., 2008).

A membrana basal dos vasos contém células que desempenham funções, como a estabilização dos vasos, regulação do tônus vascular, manutenção da homeostase tecidual e, entre outras atribuições, a síntese de componentes da matriz extracelular. Estas células são nomeadas como pericitos ou células murais e fazem parte da distinta população de células que são consideradas como origem dos miofibroblastos (DIÁZ-FLORES et al., 2009; DRANOFF e WELLS, 2010).

O fígado detém um pericito específico, as células estreladas hepáticas (localizadas no espaço de Disse) que possuem alta capacidade de formação de tecido fibroso; entretanto os pericitos presentes na parede dos vasos portais têm despertado grande interesse dos pesquisadores pela sua capacidade de indução de fibrose. Os pericitos se comportam como células de fenótipo intermediário, entre as células musculares e os fibroblastos, e fazem contato focal com o endotélio no interior dos vasos, além de serem reguladores obrigatórios do desenvolvimento vascular (ALLT e LAWRENSON, 2001; SATO et al., 2003; LEE et al., 2007).

Assim como os pericitos, as células musculares são ditas como potencialmente fibrogênicas. Estas células possuem função relevante na manutenção vascular, além de



desempenharem atividade de reparo nos processos patológicos da parede dos vasos (ADRIANA et al., 1999; HAO et al., 2006 )

Em particular, os vasos do espaço-porta têm sido descritos por gerar miofibroblastos portais derivados das células musculares da parede da veia-porta e da artéria hepática, sendo sugeridos na fibrose periportal causada pelo *Schistosoma mansoni*, bem como na fibrose que acomete o sistema biliar, como células que podem gerar fibrose (MIYAZAKI et al., 1993; ANDRADE et al., 1999; KINMMAN e HOUSSET, 2002).

### 2.3 MODELO DE INDUÇÃO DE FIBROSE SEPTAL PELA *Capillaria hepatica* EM RATOS

A fibrose septal é um tipo peculiar de fibrose, em que septos fazem ligações no parênquima hepático entre espaços-porta e conexões entre espaços-porta e veias centrais. Esta fibrose é um achado comum de doenças crônicas do fígado como nas hepatites virais, cirrose septal incompleta e na esquistossomose, sendo considerada como mau prognóstico de doenças crônicas hepáticas que podem levar à cirrose (ANDRADE, 1991; SCHINONI et al., 2004; ANDRADE, 2005).

O estudo da fibrose hepática tem avançado e os modelos experimentais de indução desta doença têm colaborado para o entendimento de aspectos ainda obscuros da fibrogênese hepática (SNOWDON e FALLOWFIELD, 2011).

A fibrose septal experimental pode ser induzida por injeções intraperitoneais de soro heterólogo (ex. soro de porco) em ratos. Nesta circunstância, a fibrose se desenvolve em apenas uma proporção dos animais, sem episódios repetidos de necrose hepatocelular e é chamada de fibrose septal “pura” (PARONETO e POPPER, 1966; BHUNCHET e WAKE, 1992).

A fibrose septal induzida pela *Capillaria hepatica* foi caracterizada como modelo experimental de fibrose hepática quando Ferreira e Andrade (1993) estudavam fígado de ratos urbanos e relataram a presença deste tipo de fibrose em ratos infectados pela *Capillaria hepatica*. Foi observado que a Capilaríase hepática, como é nomeada a doença causada pela *Capillaria hepatica*, funcionava como excelente modelo de reprodução da fibrose por se desenvolver nos animais de forma regular, em um curto período de tempo e em 100% dos ratos infectados. Além disso, neste modelo a fibrose

também se desenvolve na ausência de necrose hepatocelular repetida (BARBOSA e ANDRADE, 2010).

Freqüentemente encontrada em roedores, a *Capillaria hepatica* é um helminto cosmopolita que necessita de apenas um hospedeiro suscetível para o desenvolvimento de seu ciclo. Os ovos embrionados (larva diferenciada) que são ingeridos pelo hospedeiro eclodem no ceco (infecção verdadeira), liberando larvas que vão migrar para o fígado através da veia-porta. A partir daí, as larvas amadurecem e começam o processo de oviposição no parênquima hepático. Já os ovos não-embriados encontrados nas fezes de alguns animais decorrem de infecções espúrias, sendo originados da ingestão acidental de materiais contaminados ou através do consumo de fígado parasitado. Neste contexto, os ovos não passam pelo processo de diferenciação e percorrem o tubo digestivo, sendo liberados no meio externo através das fezes. Depois de dispersos no meio ambiente, estes ovos necessitam de cerca de 30 dias para embrionar, considerando as condições adequadas de temperatura, luminosidade e umidade (RUAS et al., 2003; CAMARGO et al., 2010; LI et al., 2010 e FUEHRER et al., 2011).

Apesar de os roedores serem considerados como reservatórios naturais da *C. hepatica*, nem todos desenvolvem fibrose septal proeminente. Diferentemente da fibrose septal que se desenvolve nos ratos, a infecção em camundongos se limita ao desenvolvimento de lesões multifocais, sem o aparecimento regular de septos fibrosos (GALVÃO, 1981; GOTARDO et al., 2000; ANDRADE e ANDRADE, 2004).

A fibrose septal originada da infecção com *Capillaria hepatica* se desenvolve em torno da terceira semana pós-infecção e é distinguida por originar septos longos e finos e por formar reações granulomatosas compostas de eosinófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos e células gigantes. Neste modelo de fibrose hepática, a resposta inicial começa nos espaços-porta, com a mobilização de células mesenquimais, e se irradia em direção ao parênquima, formando vasos sanguíneos paralelos aos septos que aparecem precedendo a formação do colágeno. Além destes aspectos, foi revelado por Santos e colaboradores (2001) que a formação da fibrose septal é dependente da presença de vermes adultos e dos ovos e que a sua progressão está relacionada com a permanência de ovos vivos no tecido hepático, já que com a evolução da infecção, no primeiro mês pós-infecção, os vermes já estão mortos. Na presença de apenas um fator

parasitário (vermes ou ovos), a fibrose septal não se desenvolve completamente (SOUZA et al., 2006b; BARBOSA e ANDRADE, 2010).

Souza e colaboradores (2006b) observaram que as células estreladas hepáticas não são as únicas células indutoras de fibrose septal na Capilaríase hepática, assim como acontece no modelo de fibrose septal induzida pelo soro de porco. Isto tem suscitado o interesse de pesquisadores por outros tipos celulares potencialmente fibrogênicos que podem fazer parte da formação da fibrose hepática (RUBIN et al., 1968; ANDRADE, 1991; BHUNCHET e WAKE, 1992).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar a contribuição das células potencialmente fibrogênicas do espaço-porta nas fases iniciais da formação da fibrose septal induzida por *Capillaria hepatica* em ratos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Investigar a dinâmica das células do espaço-porta envolvidas na formação inicial da fibrose septal, através do exame histológico de rotina (HE e Picro-sírius vermelho) e da imunohistoquímica (CD-31 e GFAP).

Investigar a presença dos miofibroblastos durante a formação da fibrose septal hepática, através da imunohistoquímica para  $\alpha$  – Actina do músculo liso.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado neste trabalho foi obtido a partir do arquivo de blocos parafinados do Laboratório de Patologia Experimental, no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fiocruz-Ba, onde fragmentos de fígado de 25 ratos Wistar - 20 animais infectados experimentalmente por via orogástrica com 800 ovos embrionados de *Capillaria hepatica* e 5 animais como controle do estudo - foram coletados, fixados em formol e armazenados.

As amostras de fígado foram retiradas de animais que foram eutanasiados em fases iniciais da formação e evolução da fibrose septal, em diferentes pontos nos dias 12º, 14º, 16º e 18º, após a infecção por *Capillaria hepatica* e divididos em grupos: grupo 1 (12 dias), grupo 2 (14 dias), grupo 3 (16 dias), grupo 4 (18 dias) e grupo 5 (controle). Em cada grupo foram utilizados 5 animais de ambos os sexos, com peso entre 250-300g, sendo manipulados ao longo do experimento, de acordo com os princípios éticos de experimentação animal. O grupo 5 recebeu salina estéril, também por via orogástrica e os animais foram eutanasiados aos 12 dias pós-ingestão da salina.

Foram feitos cinco cortes de tecido hepático por animal (bloco parafinado) de cada grupo; uma lâmina para cada coloração HE (histologia), Picro-sírius vermelho (fibras colágenas),  $\alpha$ -Actina do músculo liso (miofibroblastos), CD-31(células endoteliais) e GFAP (células estreladas hepáticas). O estudo foi considerado como experimental, retrospectivo, histológico, imunohistoquímico e descritivo.

### 4.1 HISTOLOGIA

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo em secções de 5 $\mu$ m para coloração de rotina (Hematoxilina e Eosina) e com Picro-sírius vermelho para demonstração de fibras colágenas. A observação do material foi feita em microscópio óptico.

### 4.2 IMUNOHISTOQUÍMICA

A imunomarcção foi desenvolvida através dos marcadores celulares: anti- $\alpha$ -actina de músculo liso – Dakocytomation/1:200 (para marcação de miofibroblastos), anti-CD31 – Santa Cruz Biotechnology/ 1:5000 (para marcação de células endoteliais) e

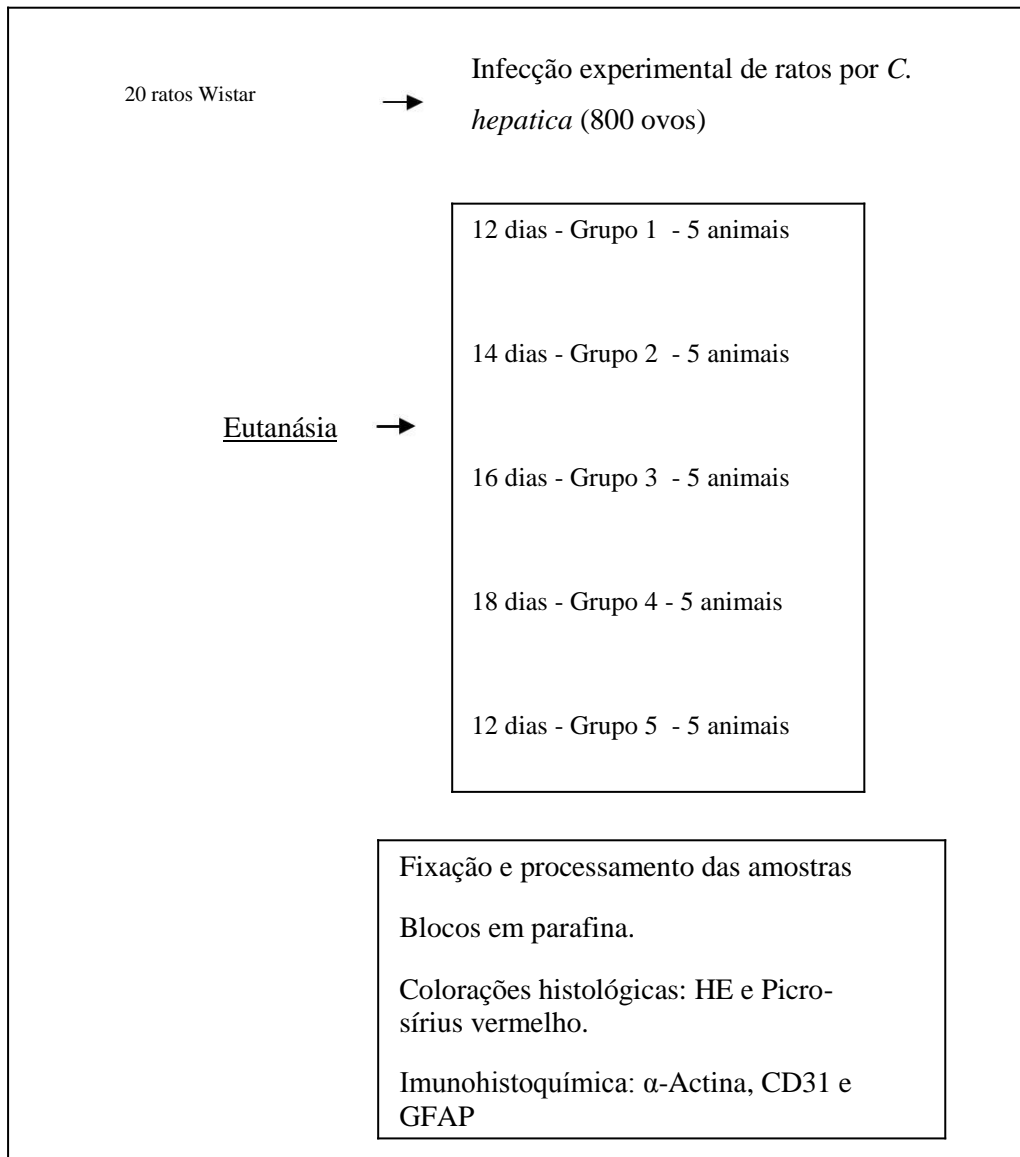
anti-GFAP – Dakocytomation/1: 2000 (para marcação de células estreladas hepáticas). Estes marcadores de células foram utilizados como anticorpos primários.

Durante o desenvolvimento da técnica, as secções de fígado foram desparafinizadas com dois banhos de xilol de 15 minutos cada e dois banhos de álcool absoluto e hidratados progressivamente. A recuperação antigênica foi realizada com o tampão Citrato 0,010M (pH 6.0) em banho-maria por trinta minutos na temperatura de 95°C. A inativação da peroxidase endógena foi feita através do Kit Dako por um período de trinta minutos. As ligações inespecíficas foram eliminadas através do Protein Block (Dako).

Os cortes foram incubados durante toda a noite com os anticorpos primários, em câmara úmida a 4°C. No dia seguinte, os cortes foram lavados três vezes com PBS pH 7,4 e incubados com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase para os anticorpos CD31 e GFAP e anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase para  $\alpha$ -actina de músculo liso em temperatura ambiente por 30 minutos. Na revelação, a solução de DAB (Diaminobenzidina/Dakocytomation) foi utilizada como cromógeno.

**TABELA 1- Lista de anticorpos e suas referências**

<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante</b>
$\alpha$ -Actina de músculo liso	1:200	Dakocytomation (Dinamarca)
CD-31	1:5000	Santa Cruz Biotechnology (Europa)
GFAP	1:2000	Dakocytomation (Dinamarca)



**Figura 1- Desenho experimental**

## 5 RESULTADOS

### 5.1 HE

Esta coloração foi utilizada para avaliação dos aspectos histológicos do fígado. As estruturas basófilas foram coradas com Hematoxilina (em azul) e as estruturas acidófilas pela Eosina (em rosa).

**G1:** O estudo histológico dos animais deste grupo revelou que aos 12 dias pós-infecção, a maioria dos animais apresentava inflamação intensa em espaços-porta, com disseminação da inflamação para o parênquima hepático, com mobilização de colangiócitos e proliferação de ductos biliares. Apenas um animal apresentou inflamação moderada (Figura 2 e Quadro 1).

**G2:** Aos 14 dias pós-infecção, todos os animais exibiram um quadro histológico de inflamação intensa em espaços-porta, além da presença de vários ductos biliares e lesões no parênquima hepático (Figura 3 e Quadro 1).

**G3:** Este grupo revelou inflamação intensa em todos os animais estudados. Aos 16 dias pós-infecção, os animais apresentaram proliferação de ductos biliares, com inflamação e a presença de vermes no parênquima hepático e septos fibrosos (Figura 4 e Quadro 1).

**G4:** Aos 18 dias pós-infecção, todos os animais apresentaram um quadro histológico de inflamação intensa, com ductos biliares proliferados e septos fibrosos distribuídos e conectados por todo o parênquima hepático, dando ao tecido hepático um aspecto pseudonodular (Figura 5 e Quadro 1).

**G5:** Os animais controle não demonstraram sinais de inflamação nos espaços-porta ou no parênquima e não evidenciaram o aumento da quantidade de ductos biliares (Quadro 1).

### 5.2 PICRO-SÍRIUS VERMELHO

Este corante foi usado para observação das fibras colágenas (em vermelho) no fígado.

**G1:** Aos 12 dias pós-infecção, as fibras colágenas apresentaram-se de forma evidente na estrutura dos espaços-porta de todos os animais (vasos e estroma), assim como nos vasos hepáticos e em projeções iniciais de septos (Figura 6 e Quadro 2).

**G2:** Todos os animais deste grupo demonstraram depósito de fibras colágenas na parede dos vasos e no estroma do espaço-porta aos 14 dias de infecção, além do acúmulo de colágeno em projeções iniciais de septos e em lesões parenquimatosas (Figura 7 e Quadro 2).

**G3:** Aos 16 dias de infecção, quatro dos cinco animais avaliados apresentaram depósito de colágeno na estrutura dos vasos hepáticos e no estroma do espaço-porta, além da presença de fibras colágenas em septos fibrosos. Um animal mostrou-se com depósito intenso de colágeno (Figura 8 e Quadro 2).

**G4:** No último ponto de análise dos animais eutanasiados (18 dias), foi possível observar que os septos fibrosos estavam distribuídos pelo parênquima, em conexão e com formação de pseudonódulos (Figura 9 e Quadro 2).

**G5:** Nos animais controle, só foi possível observar o depósito de colágeno na estrutura dos espaços-porta e em vasos hepáticos (Quadro 2).

### 5.3 $\alpha$ -ACTINA DE MÚSCULO LISO

Este marcador permite a análise de miofibroblastos e células musculares lisas, na cor castanho.

**G1:** No 12º dia de infecção, foi observado que todos os animais demonstraram marcação para  $\alpha$ -actina de músculo liso em miofibroblastos no interior dos espaços-porta, com irradiação destas células para o parênquima hepático e concentração destes elementos celulares em torno do espaço-porta (Figura 10 e Quadro3).

**G2:** Aos 14 dias pós-infecção, todos os animais demonstraram miofibroblastos concentrados nos espaços-porta, em áreas de lesão no parênquima hepático e em torno de ductos biliares (Figura 11 e Quadro3).

**G3:** Neste período da infecção, 16 dias, houve marcação positiva para  $\alpha$ -actina de músculo liso nos espaços-porta (vasos e miofibroblastos) e no interior dos septos



fibrosos distribuídos por todo parênquima hepático. Estas características apresentaram-se na maioria dos animais (Figura 12 e Quadro3).

**G4:** Ao final da infecção (18 dias), observou-se que todos os animais demonstraram marcação para  $\alpha$ -actina de músculo liso nos espaços-porta (nos miofibroblastos e nos vasos), em torno de ductos biliares e no interior dos septos fibrosos completos (Figura 13 e Quadro3).

**G5:** Nos animais controle houve marcação para  $\alpha$ -actina de músculo liso, apenas na estrutura de vasos (células do músculo liso) (Quadro 3).

#### 5.4 CD-31

As células endoteliais foram evidenciadas na cor castanho, através do CD-31.

**G1:** O marcador CD-31 foi positivo para células endoteliais. Aos 12 dias de infecção, foi observado que todos os animais demonstraram marcação de novos vasos nos espaços-porta, além da marcação dos sinusóides (Figura 14 e Quadro 4).

**G2:** No 14º dia pós-infecção, houve marcação dos vasos pré-existentes dos espaços-porta e de vasos proliferados, assim como dos sinusóides em todos os animais avaliados (Figura 15 e Quadro 4).

**G3:** Com o decorrer da infecção, aos 16 dias, todos os animais analisados revelaram marcação para CD-31, na estrutura dos vasos pré-existentes dos espaços-porta e dos vasos recém-proliferados, além da marcação dos sinusóides e dos vasos em septos fibrosos (Figura 16 e Quadro 4).

**G4:** Ao final da infecção (18 dias), foi possível observar a marcação para CD-31 em novos vasos nos espaços-porta, nos sinusóides, além da marcação de células endoteliais em septos fibrosos (Figura 17 e Quadro 4).

**G5:** Todos os animais controle demonstraram marcação para CD-31 em células endoteliais dos vasos hepáticos pré-existentes (Quadro 4).

#### 5.5 GFAP

O GFAP foi utilizado para marcação em castanho de células estreladas hepáticas.

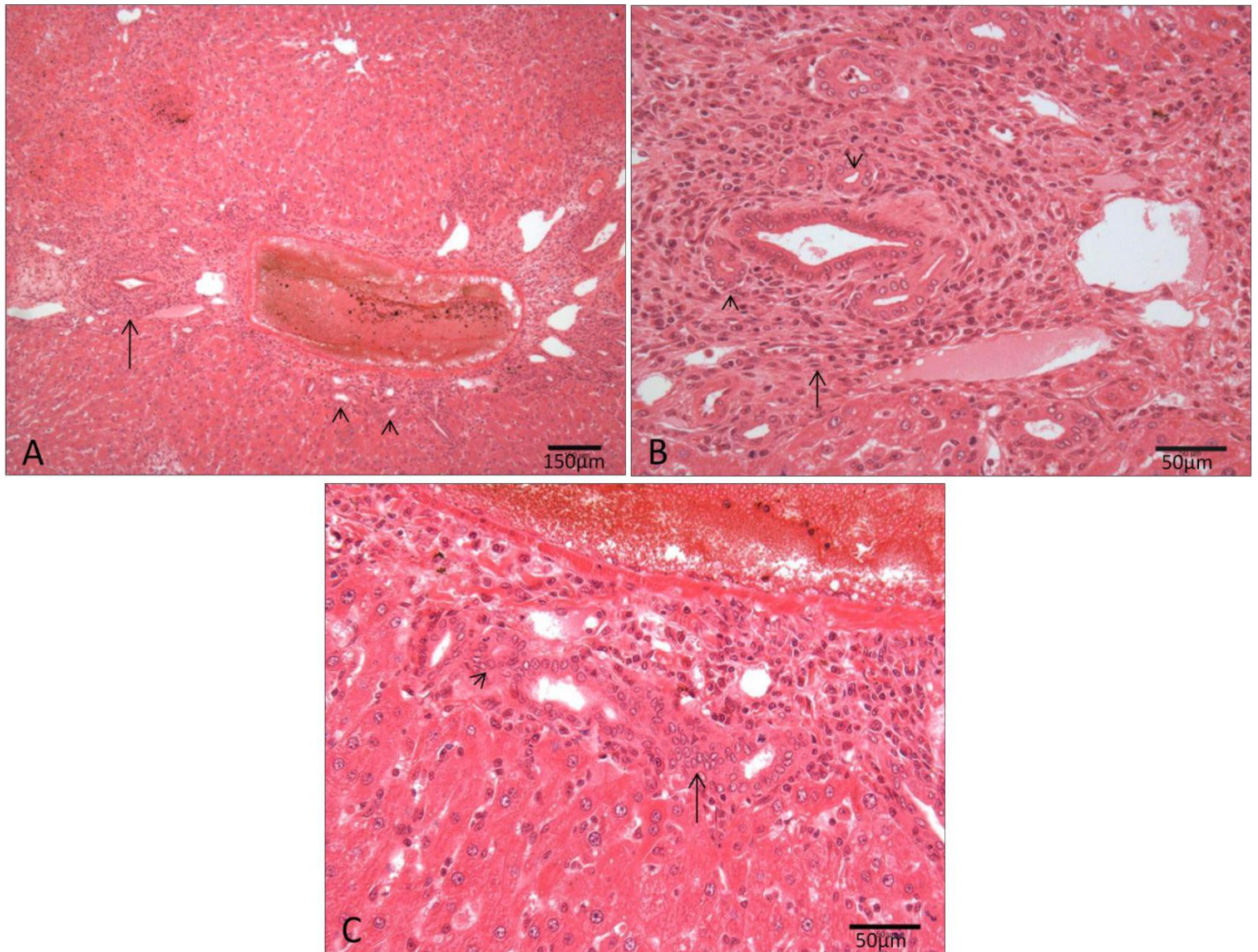
**G1:** Nesta fase da infecção (12º dia), a proteína ácida fibrilar glial foi evidenciada nos espaços-porta de todos os animais através da marcação de células estreladas hepáticas e de ductos biliares (colangiócitos), como também de Cehs do espaço de Disse (Figura 18 e Quadro 5).

**G2:** No 14º dia da infecção, a marcação foi observada em células estreladas hepáticas presentes nos espaços-porta, em ductos biliares (colangiócitos), assim como em áreas de lesão no parênquima e nos sinusóides hepáticos (Figura 19 e Quadro 5).

**G3:** Neste período da infecção (16 dias), houve marcação para GFAP em ductos biliares (colangiócitos) e em células estreladas hepáticas dos espaços-porta, do espaço de Disse e do septo fibroso (Figura 20 e Quadro 5).

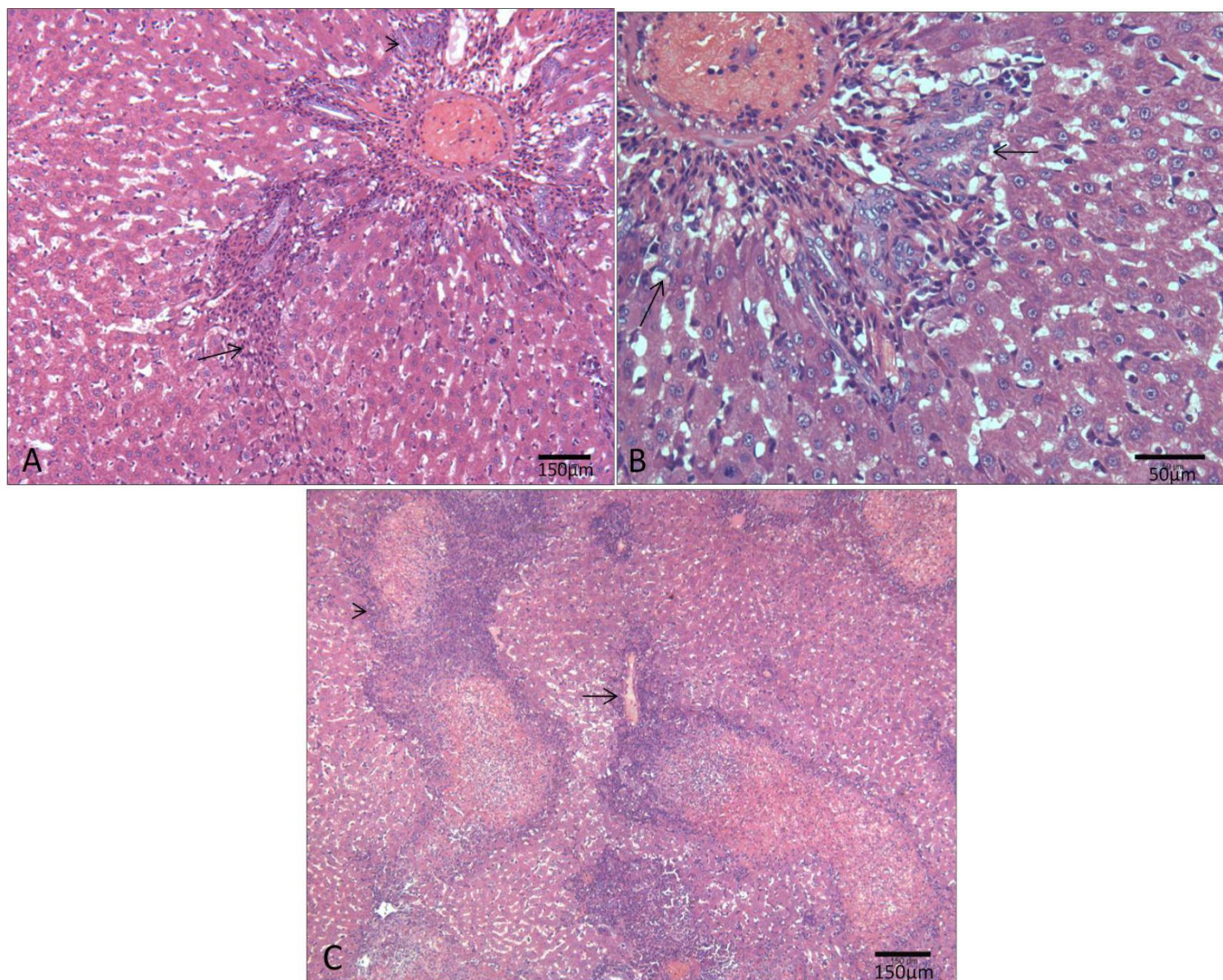
**G4:** Aos 18 dias pós-infecção, a proteína ácida fibrilar glial foi encontrada em colangiócitos, foi demonstrada em células estreladas hepáticas presentes nos sinusóides hepáticos e em células estreladas hepáticas concentradas no interior dos septos fibrosos (Figura 21 e Quadro 5).

**G5:** No grupo controle ocorreu marcação apenas em colangiócitos e células estreladas hepáticas dos sinusóides (Quadro 5).



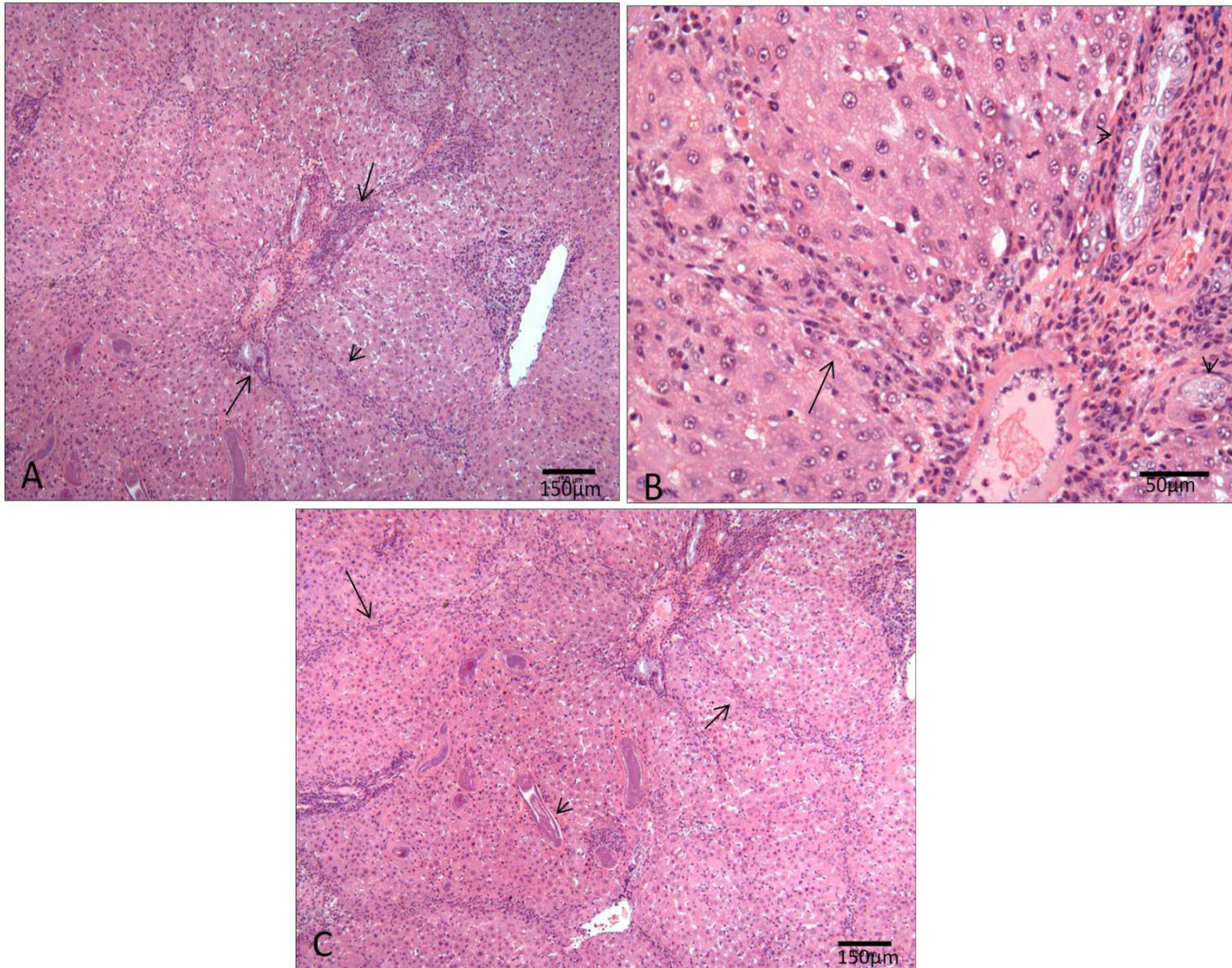
**Figura 2-** Em A, infiltrado inflamatório no espaço-porta (seta) com proliferação de ductos biliares (cabeça de seta). Em B, reação inflamatória em torno de ductos biliares, espaço-porta da figura A (seta) e ductos biliares (cabeça de seta). Em C, mobilização de colangiócitos, espaço-porta da figura A (seta) e proliferação de ducto biliar (cabeça de seta). Fotomicrografias ópticas. A - 150 µm, B - 50 µm, C - 50 µm. HE - 12 dias.





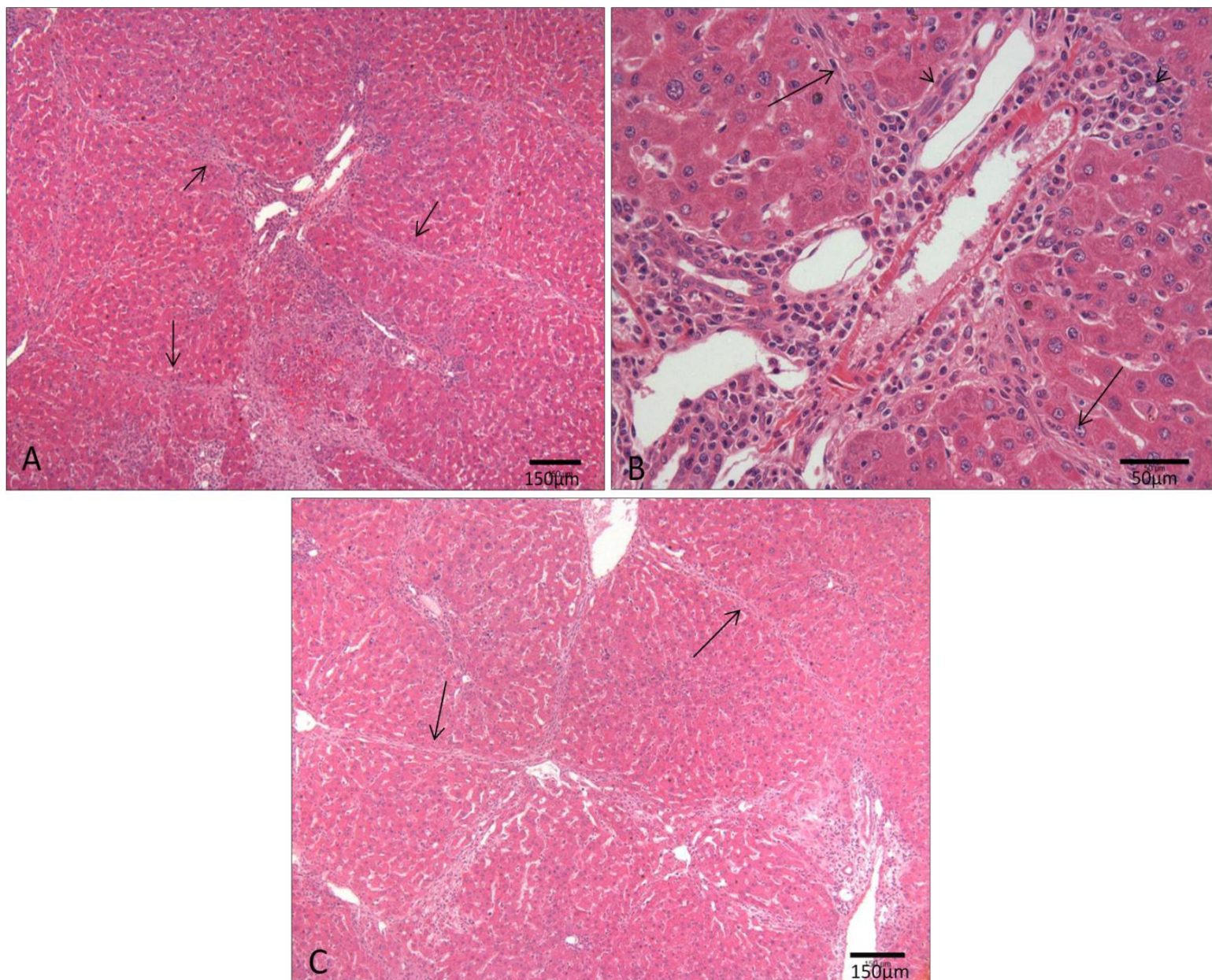
**Figura 3-** Em A, infiltrado inflamatório no espaço-porta com irradiação para o parênquima (seta) e proliferação de ductos biliares (cabeça de seta). Em B, demonstração de ductos biliares, espaço-porta da figura A (seta). Em C, reação inflamatória em torno da veia-porta (seta) e no parênquima (cabeça de seta). Fotomicrografias ópticas. A - 150 µm, B - 50 µm, C - 50 µm. HE - 14 dias.





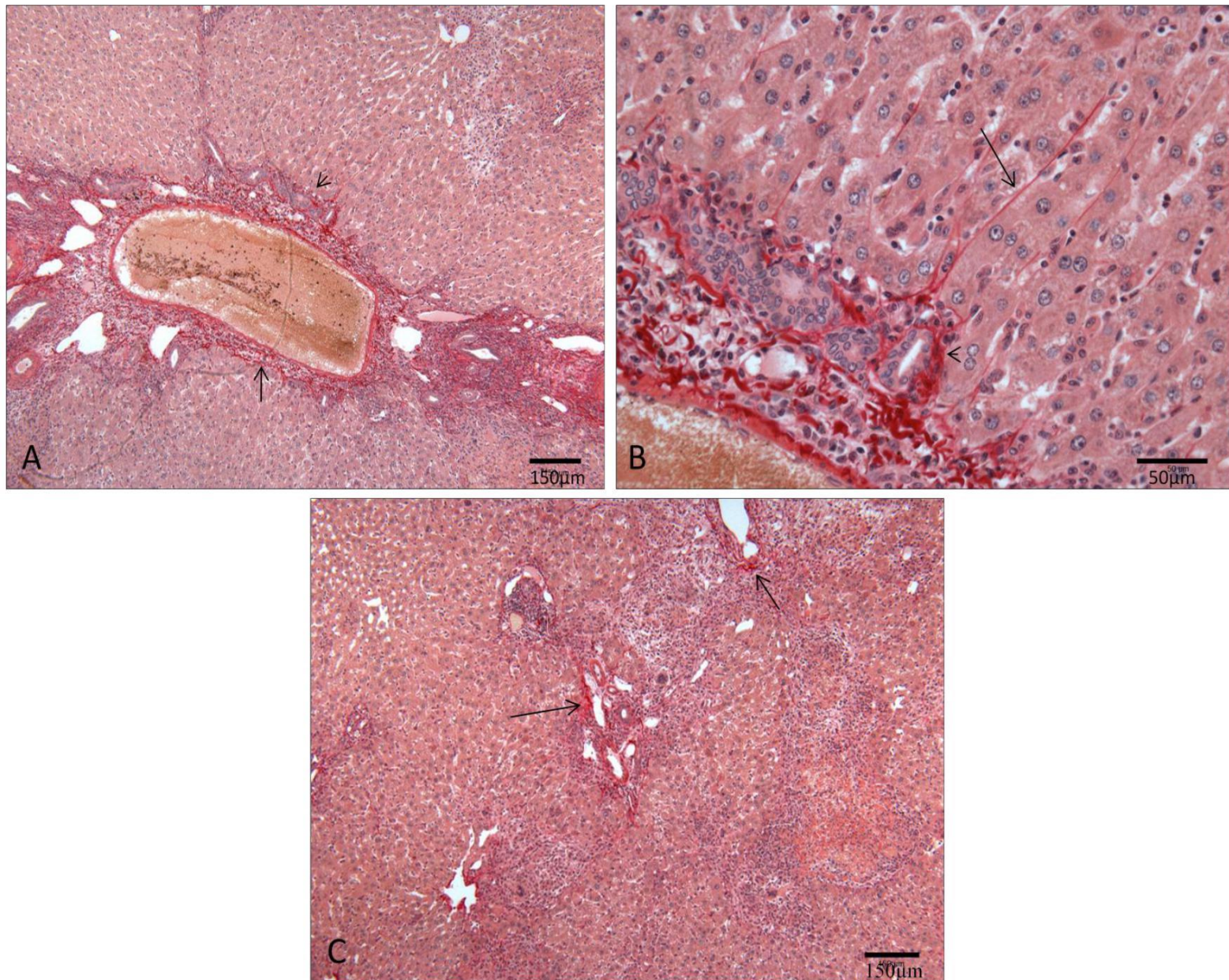
**Figura 4-** Em A, proliferação de ductos biliares (seta). Septo celuloso irradiado do espaço-porta (cabeça de seta). Em B, irradiação de septos a partir do espaço-porta, espaço-porta da figura A (seta) com demonstração de ductos biliares (cabeça de seta). Em C, septo celuloso distribuído pelo parênquima (seta), presença de vermes (cabeça de seta). Fotomicrografias. A- 150  $\mu$ m, B- 50  $\mu$ m, C- 150  $\mu$ m. HE – 16 dias.





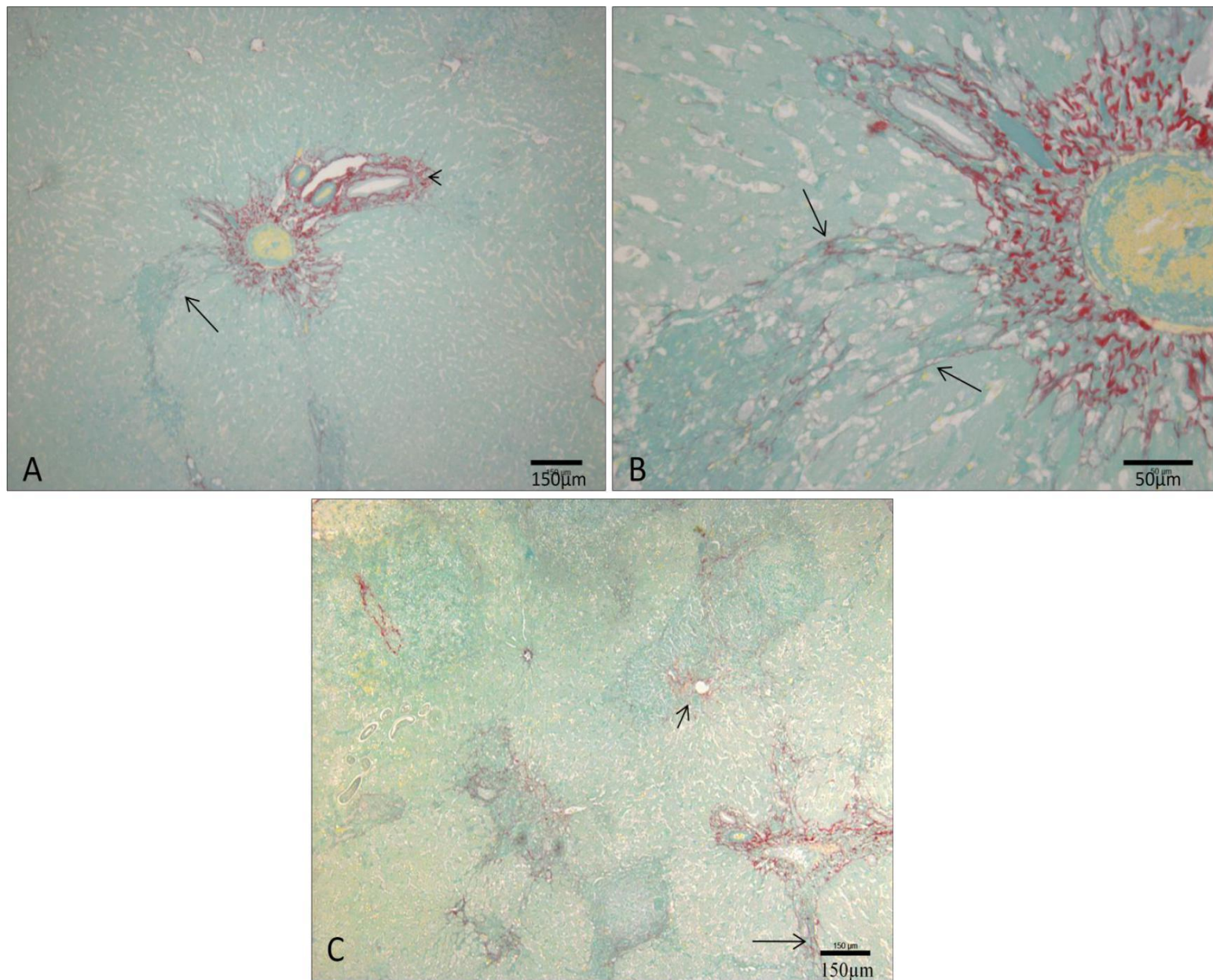
**Figura 5-** Em A, septos celulosos distribuídos pelo parênquima (seta). Em B, septos irradiados da área portal, espaço-porta da figura A (seta) e demonstração de ductos biliares (cabeça de seta). Em C, septos fibrosos completos (seta), conectados por espaços-porta e veias centrais. Fotomicrografias ópticas. A - 150 μm, B - 50 μm, C - 150 μm. HE - 18 dias.





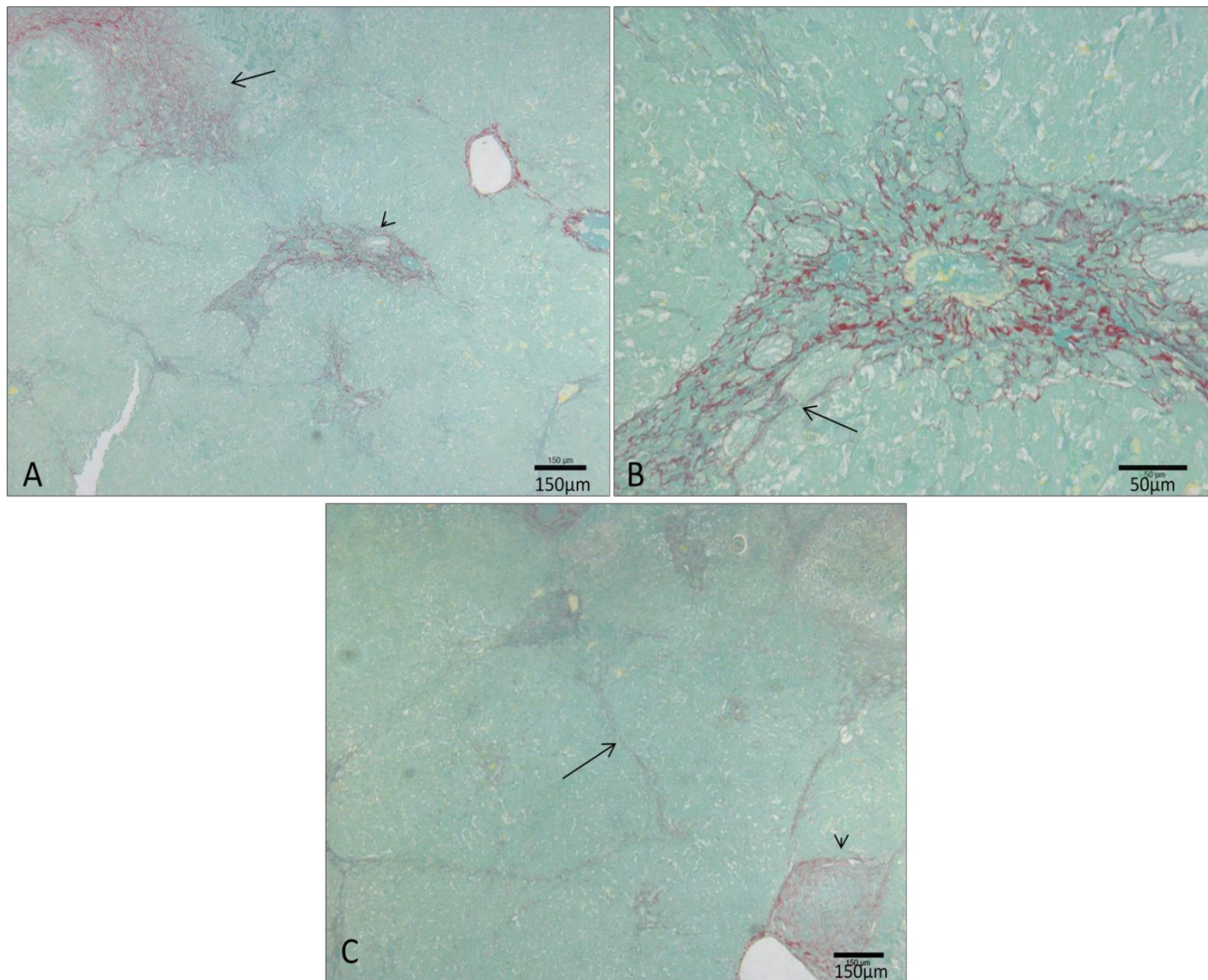
**Figura 6-** Em A, depósito de colágeno em torno do espaço-porta (seta) e em torno de ductos biliares (cabeça de seta). Em B, depósito de colágeno em projeção inicial de septo irradiado da área portal, espaço-porta da figura A (seta) e em torno dos ductos biliares (cabeça de seta). Em C, depósito de colágeno na estrutura dos vasos hepáticos (seta). Fotomicrografias ópticas. A - 150 µm, B - 50 µm, C - 150 µm. Picro-sírius vermelho – 12 dias.



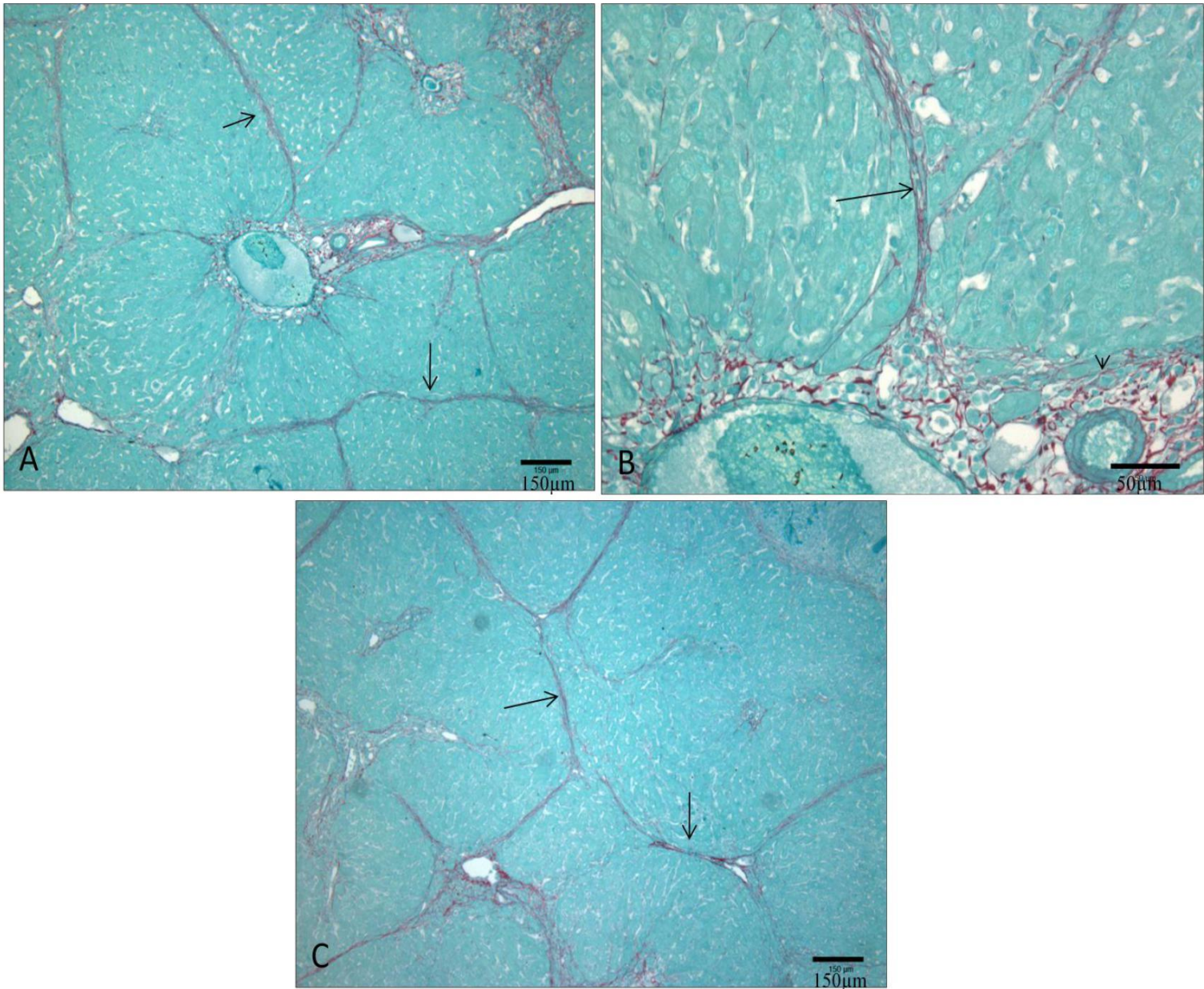


**Figura 7-** Em A, depósito de colágeno em um septo inicial (seta) e em torno do espaço-porta (cabeça de seta). Em B, colágeno em projeções de septos irradiados da área portal, espaço-porta da figura A (seta). Em C, depósito de colágeno em uma projeção inicial de um septo fibroso (seta) e na estrutura do vaso hepático (seta menor). Fotomicrografias ópticas. A - 150 μm, B - 50 μm, C - 150 μm. Picro-sírius vermelho – 14 dias.



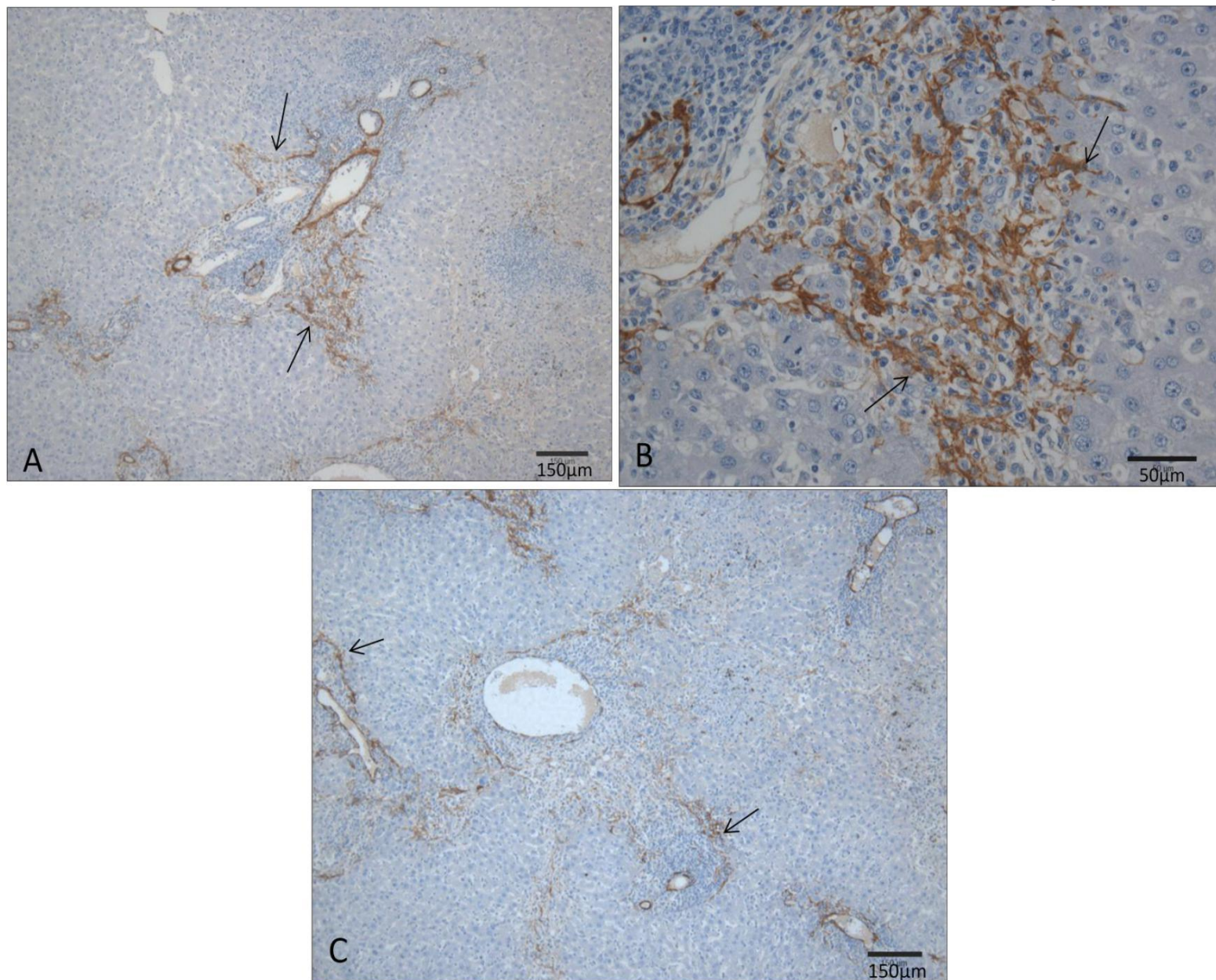


**Figura 8-** Em A, depósito de colágeno em torno de uma lesão no parênquima (seta) e em torno do espaço-porta (cabeça de seta). Em B, colágeno em septo fibroso irradiado da área portal, espaço-porta da figura A (seta). Em C, depósito de colágeno em um septo fibroso (seta) e em torno de uma lesão no parênquima. Fotomicrografias ópticas. A - 150  $\mu\text{m}$ , B - 50  $\mu\text{m}$ , C - 150  $\mu\text{m}$ . Picro-sírius vermelho – 16 dias.



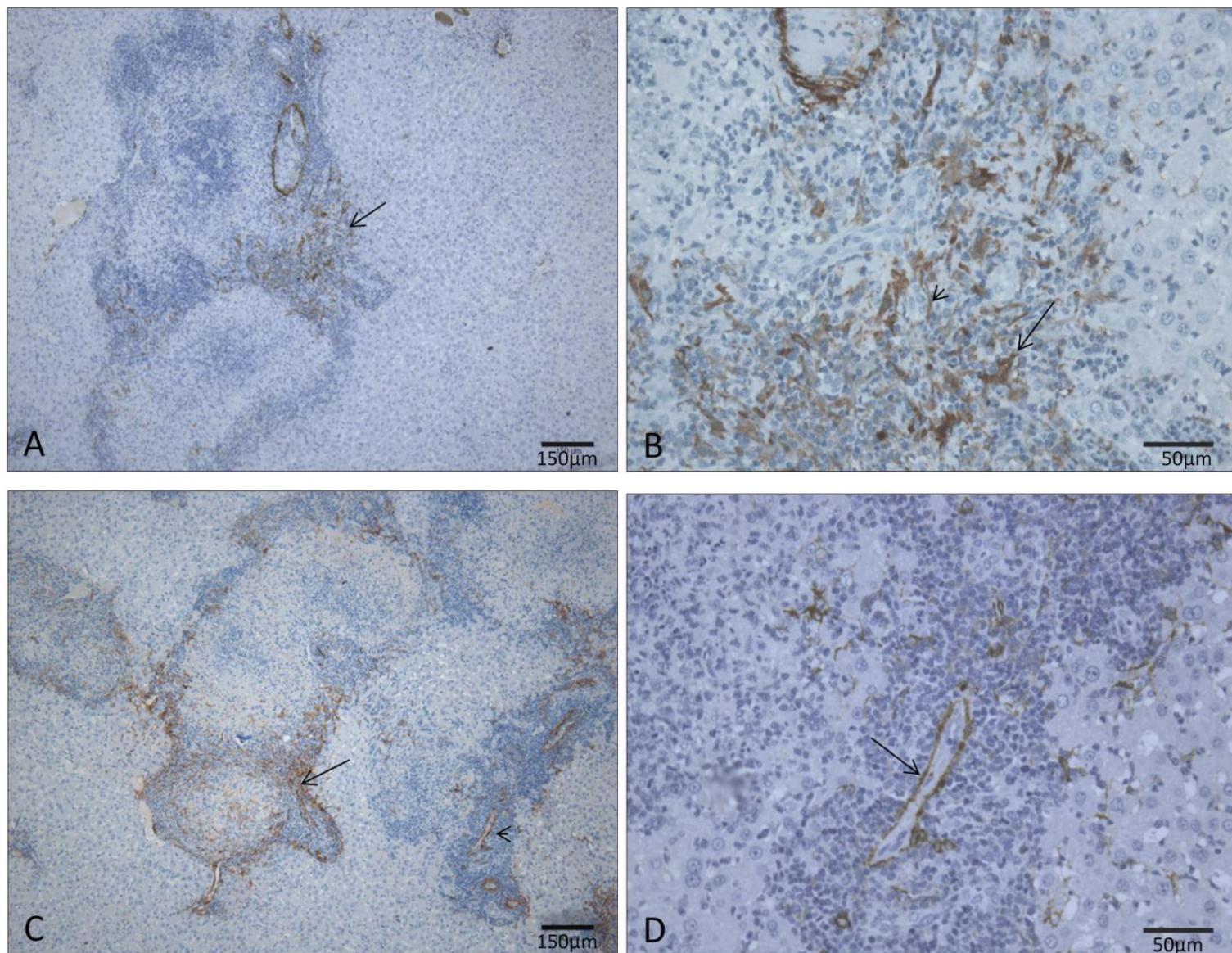
**Figura 9-** Em A, depósito de colágeno no parênquima hepático (septos fibrosos), aspecto pseudonodular, (seta). Em B, colágeno no interior do septo completo irradiado da área portal, espaço-porta da figura A (seta) e em torno do espaço-porta (cabeça de seta). Em C, septos fibrosos completos distribuídos pelo parênquima hepático, aspecto pseudonodular (seta). Fotomicrografias ópticas. A - 150  $\mu\text{m}$ , B - 50  $\mu\text{m}$ , C - 150  $\mu\text{m}$ . Picro-sírius vermelho – 18 dias.





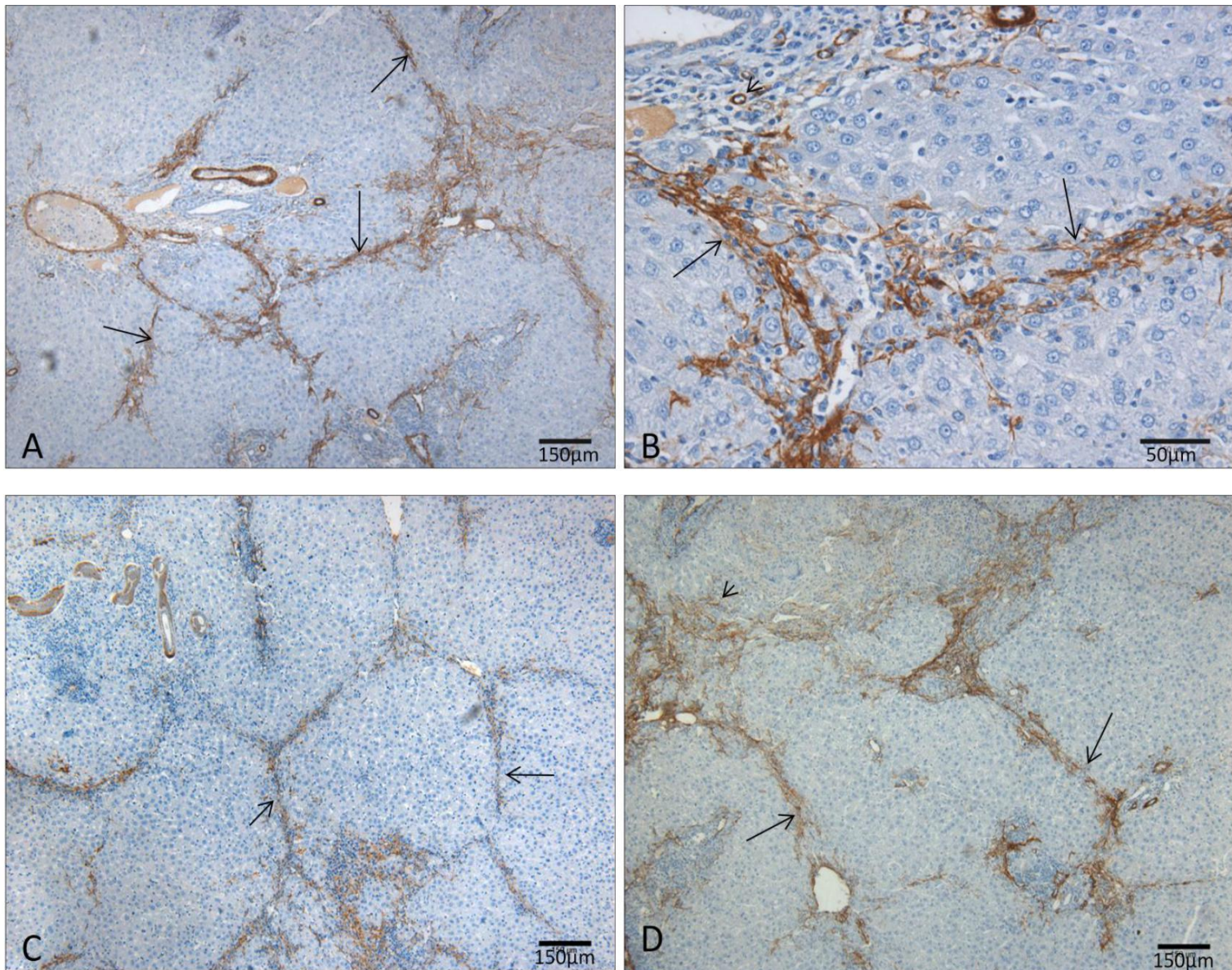
**Figura 10-** Em A, acúmulo de miofibroblastos no interior e em torno do espaço-porta (seta). Em B, células actino-positivas no interior e em torno do espaço-porta, espaço-porta da figura A (seta). Em C, marcação positiva para  $\alpha$ -actina do músculo liso no parênquima. Fotomicrografias ópticas. A - 150 $\mu$ m, B - 50  $\mu$ m, C - 150  $\mu$ m.  $\alpha$ -Actina do músculo liso - 12 dias.





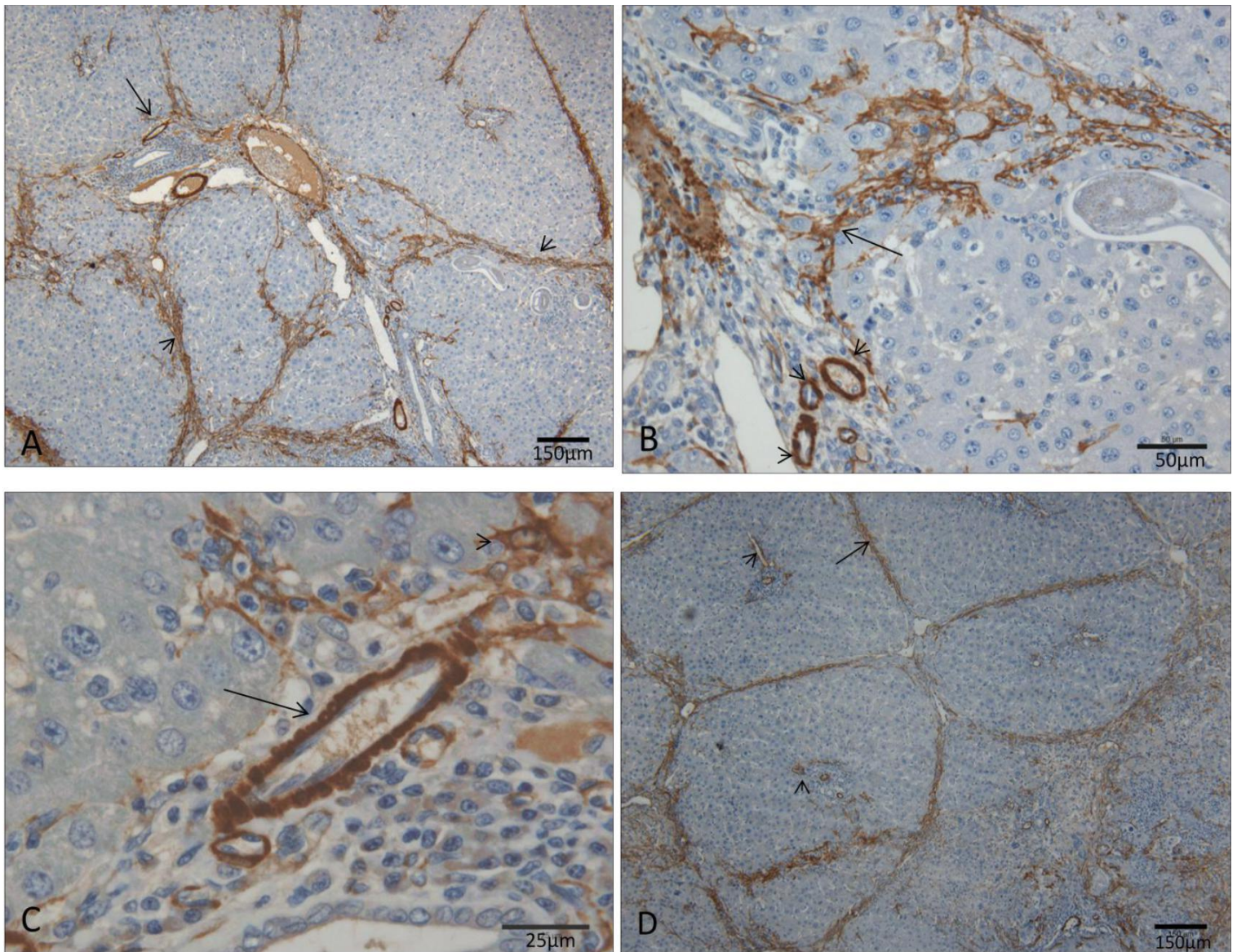
**Figura 11-** Em A, marcação positiva para  $\alpha$ -actina do músculo liso em miofibroblastos presentes no espaço-porta e nas proximidades (seta). Em B, células actino-positivas em torno do espaço-porta, espaço-porta da figura A (seta) e ao redor do ducto biliar (cabeça de seta). Em C, células positivas para  $\alpha$ -actina do músculo liso, coradas em castanho, no parênquima (seta) e no interior do espaço-porta (cabeça de seta). Em D, marcação de células actino-positivas em torno do ducto biliar, espaço-porta da figura C (seta). Fotomicrografias ópticas. A - 150  $\mu$ m, B - 50  $\mu$ m, C - 150  $\mu$ m, D - 50  $\mu$ m.  $\alpha$ -Actina do músculo liso – 14 dias.





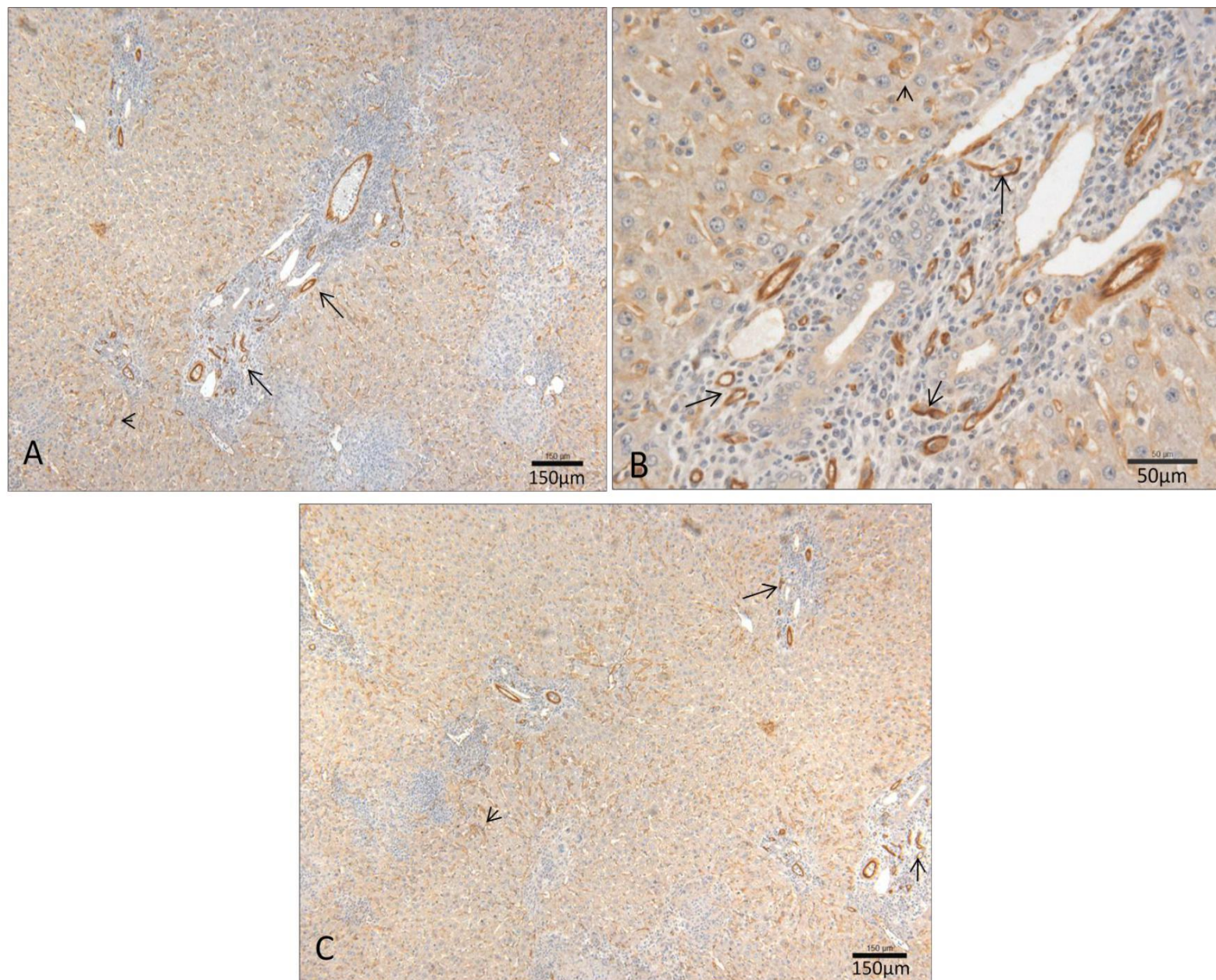
**Figura 12-** Em A, marcação positiva para  $\alpha$ -actina do músculo liso no interior dos septos fibrosos irradiados do espaço-porta (seta). Em B, presença de células actino-positivas no interior dos septos, septos fibrosos da figura A (seta) e em pequenos vasos no espaço-porta (cabeça de seta). Em C, miofibroblastos em castanho. Parênquima hepático com aspecto pseudonodular (seta). Em D, células positivas para  $\alpha$ -actina do músculo liso em septos (seta), além do acúmulo de miofibroblastos no parênquima hepático (cabeça de seta). Fotomicrografias ópticas. A - 150  $\mu$ m, B - 50  $\mu$ m, C - 150  $\mu$ m, D - 150  $\mu$ m.  $\alpha$ -Actina do músculo liso - 16 dias.





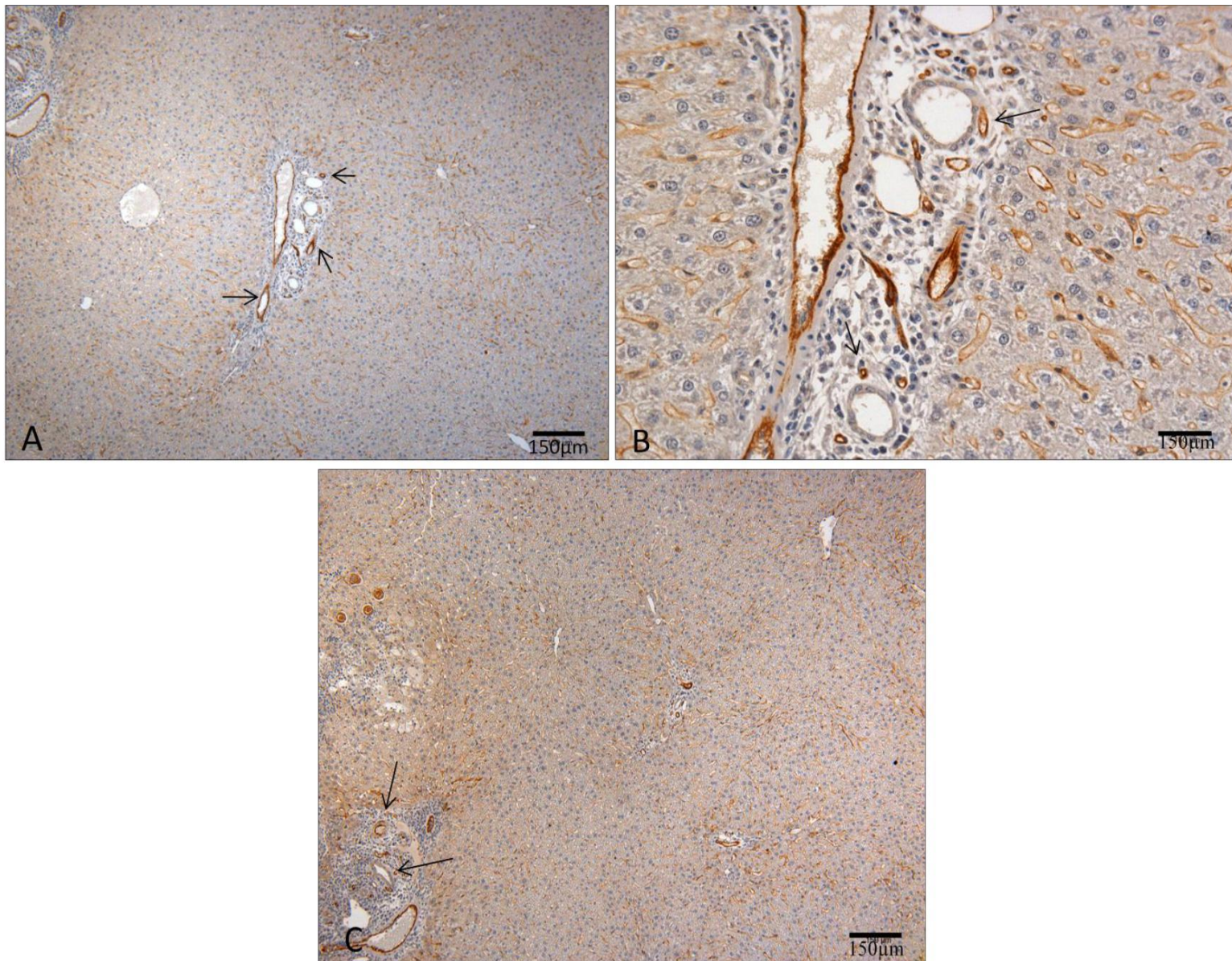
**Figura 13-** Em A, células actino-positivas no interior do espaço-porta (seta) e nos septos fibrosos (cabeça de seta). Em B, marcação de miofibroblastos em um septo fibroso a partir do espaço-porta, espaço-porta da figura A (seta) e em ductos biliares (cabeça de seta). Em C, marcação positiva para  $\alpha$ -actina do músculo liso em torno de ductos biliares, espaço-porta da figura A (seta), além da marcação de células em torno do espaço-porta (cabeça de seta). Em D, células actino-positivas no interior dos septos fibrosos (seta) e na estrutura do espaço-porta (cabeça de seta). Fotomicrografias ópticas. A - 150  $\mu$ m, B - 50  $\mu$ m, C - 25  $\mu$ m, D - 150  $\mu$ m.  $\alpha$ -actina do músculo liso – 18 dias.





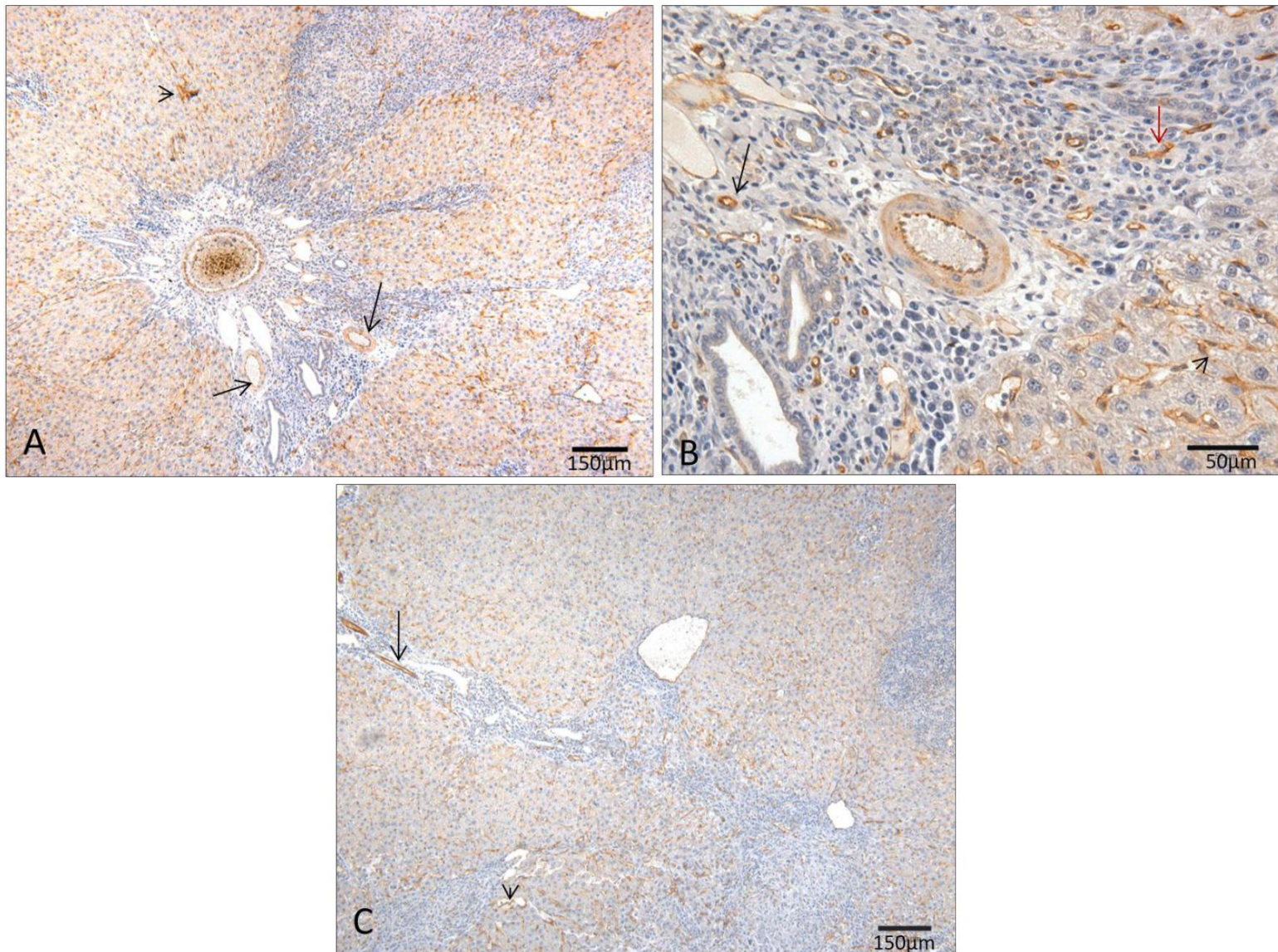
**Figura 14-** Em A, marcação positiva para CD31 nos vasos do espaço-porta (seta), além da marcação dos sinusóides hepáticos (cabeça de seta). Em B, células endoteliais no espaço-porta com marcação para C31 em castanho, espaço-porta da figura A (seta), assim como os sinusóides hepáticos (cabeça de seta). Em C, células positivas para CD31 nos espaços-porta (seta) e nos sinusóides hepáticos (seta menor). Fotomicrografias ópticas. A - 150  $\mu\text{m}$ , B - 50  $\mu\text{m}$ , C - 150  $\mu\text{m}$ . CD31 - 12 dias.





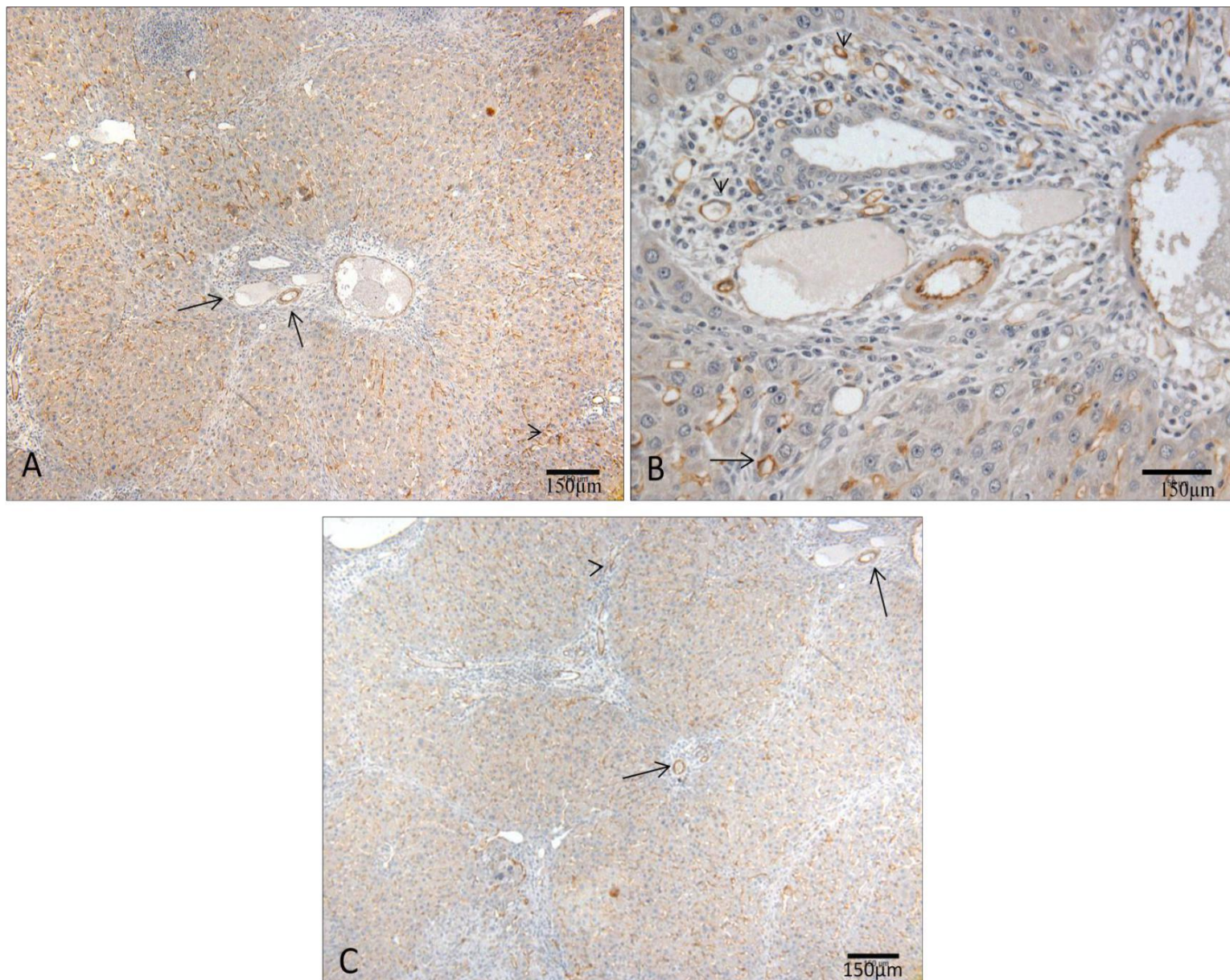
**Figura 15-** Em A, marcação de células endoteliais no espaço-porta (seta). Em B, células endoteliais de pequenos vasos positivas para CD31 no interior do espaço-porta (seta), e na parede dos sinusóides hepáticos (cabeça de seta). Em C, marcação positiva para C31 em castanho no espaço-porta (seta). Fotomicrografias ópticas. A - 150µm, B - 50 µm, C - 150µm. CD31 - 14 dias.





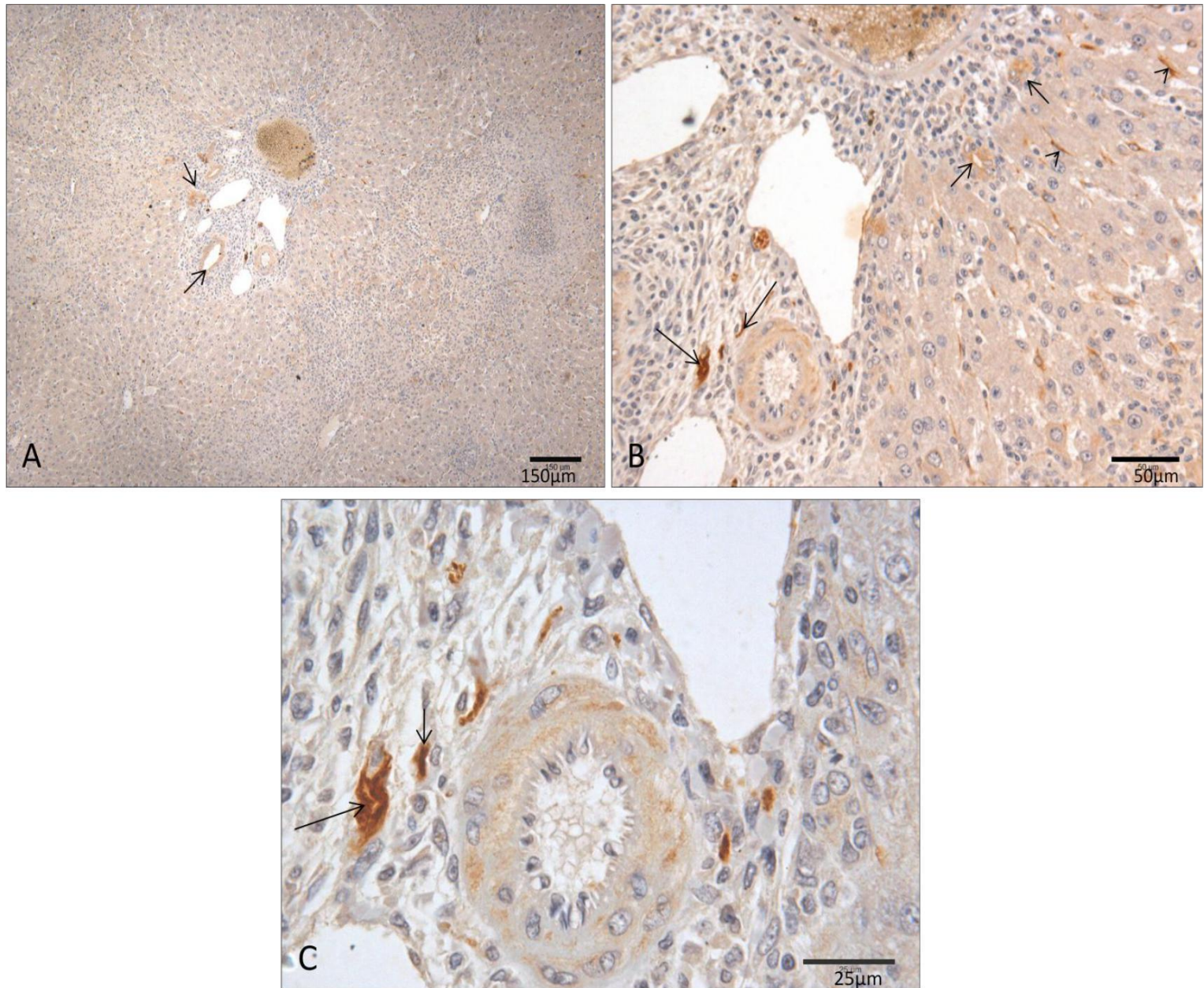
**Figura 16-** Em A, células endoteliais positivas para CD31 no espaço-porta (seta), além da marcação nos sinusóides hepáticos (cabeça de seta). Em B, marcação para CD31 de pequenos vasos no espaço-porta, espaço-porta da figura A (seta), marcação de célula endotelial no septo fibroso (seta vermelha), além da marcação da parede dos sinusóides hepáticos (cabeça de seta). Em C, demonstração de célula endotelial positiva para CD31 no interior do septo fibroso (seta), células positivas para CD31 no sinusóide hepático (seta). Fotomicrografias ópticas. A - 150µm, B - 50µm , C - 150µm. CD31 - 16 dias.





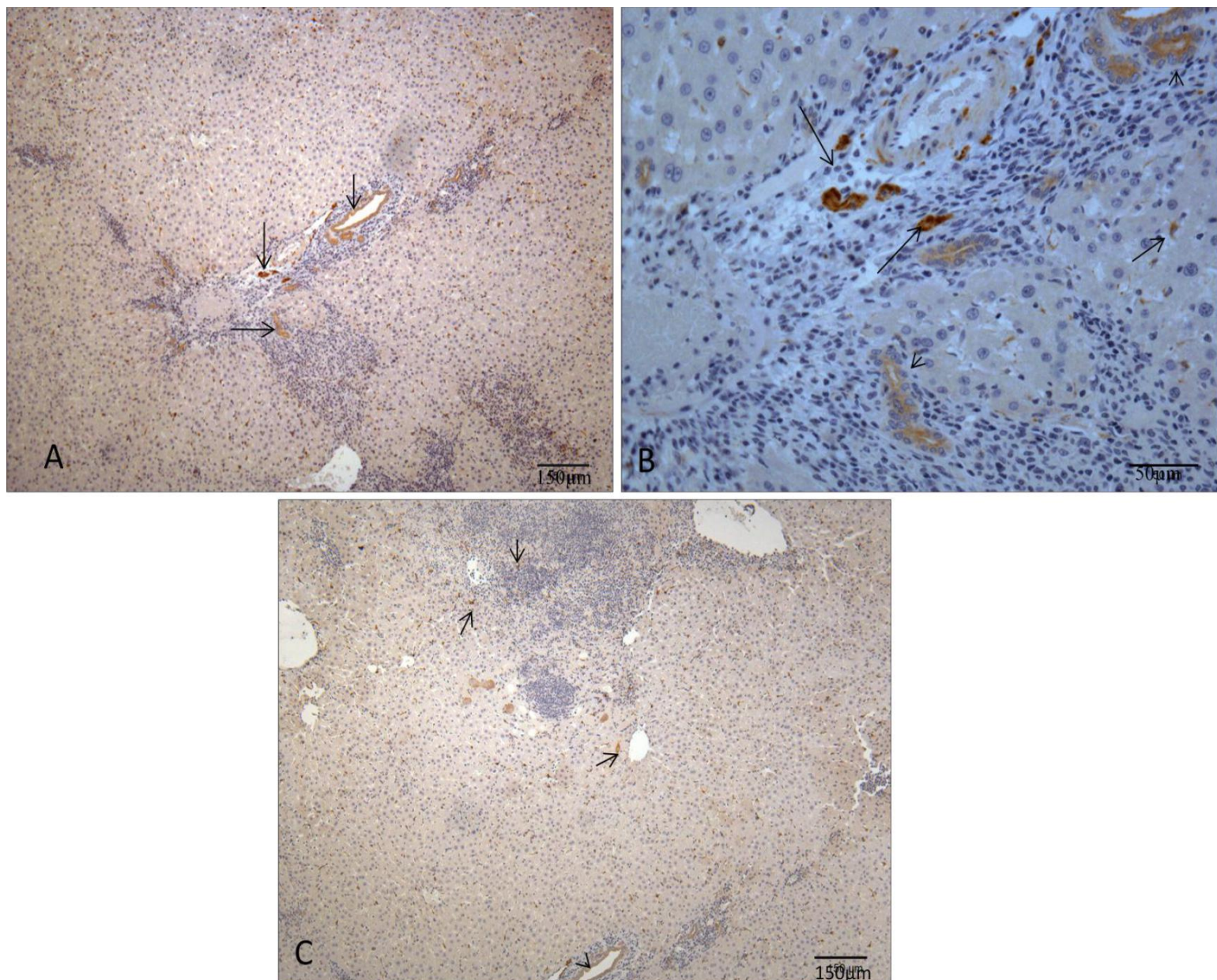
**Figura 17-** Em A, células positivas para CD31 no espaço-porta (seta) e nos sinusóides hepáticos (cabeça de seta). Em B, endotélio positivo para CD31 em vaso presente no interior do septo fibroso (seta) e em pequenos vasos no espaço-porta, espaço-porta da figura A (cabeça de seta). Em C, marcação positiva para CD31 nos espaços-porta (seta) e no interior do septo fibroso (cabeça de seta). Fotomicrografias ópticas. A - 150µm, B - 50µm, C - 150µm. CD31 - 18 dias.





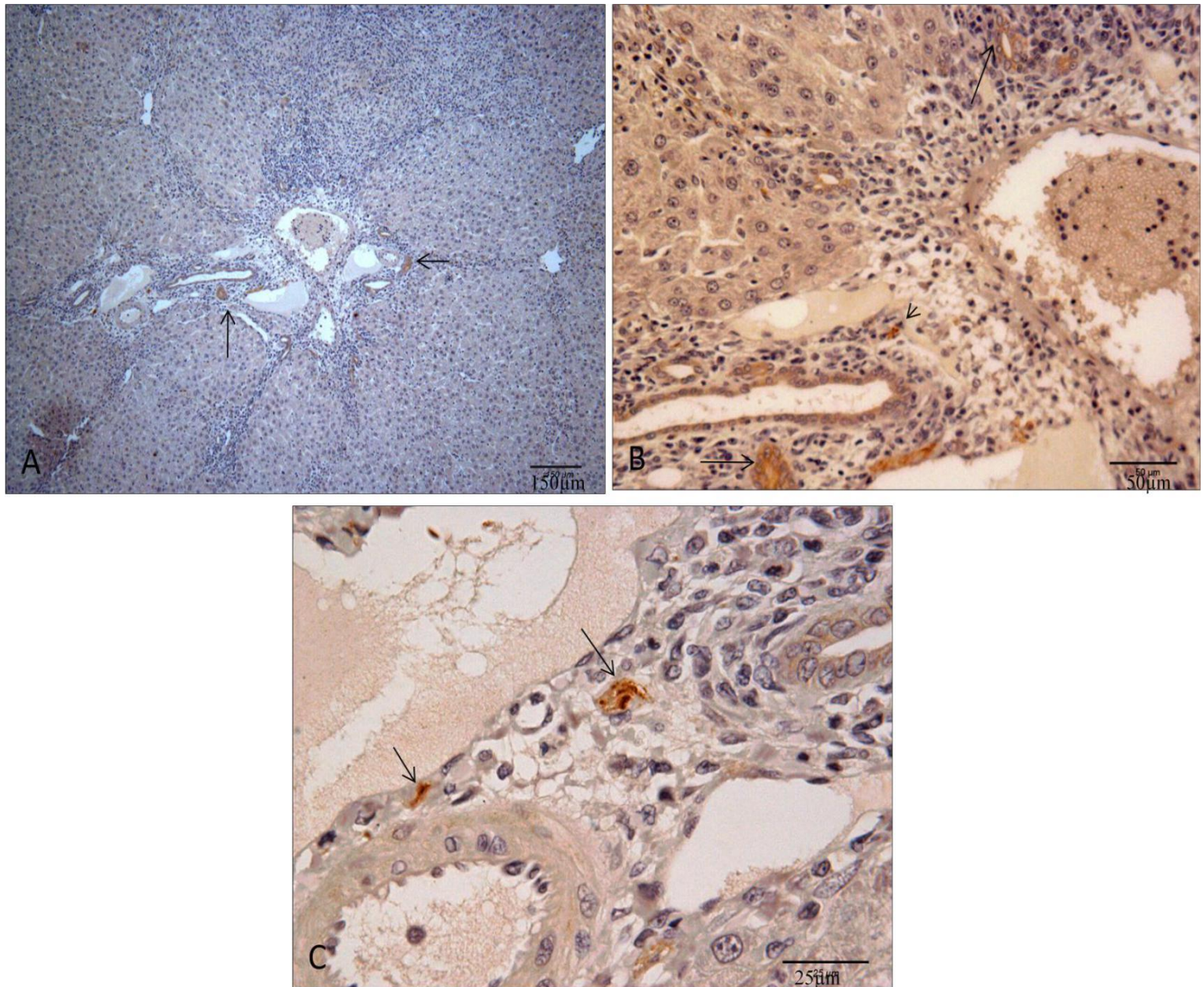
**Figura 18-** Em A, marcação positiva em castanho para GFAP no espaço-porta (seta). Em B, células positivas para GFAP no espaço-porta, espaço-porta da figura A, e em células estreladas hepáticas (seta). Marcação em ductos biliares (seta menor) e no espaço de Disse (cabeça de seta). Em C, demonstração de células estreladas hepáticas no interior do espaço-porta, espaço-porta da figura A (seta). Fotomicrografias ópticas. A - 150µm, B - 50µm, C - 25 µm. GFAP – 12 dias.





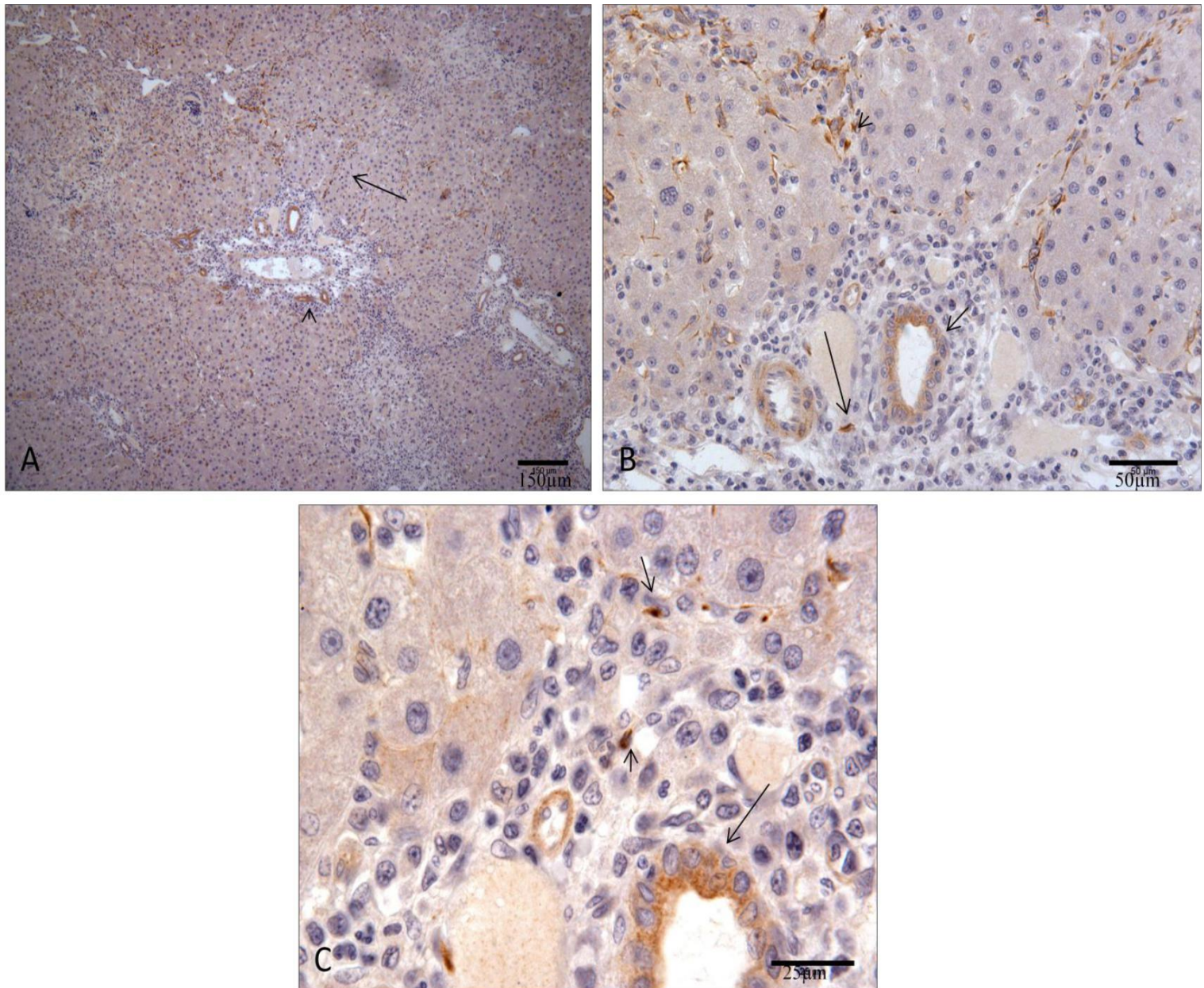
**Figura 19-** Em A, marcação de células positivas para GFAP em castanho, no espaço-porta (seta) Em B, células positivas para GFAP: células estreladas hepáticas (seta), marcação no espaço de Disse- células estreladas hepáticas- (seta menor) e em ductos biliares (cabeça de seta), espaço-porta da figura A. Em C, células estreladas hepáticas positivas para GFAP (seta) em área de lesão, além da marcação positiva de ducto biliar (cabeça de seta). Fotomicrografias ópticas. A - 150µm, B - 50µm, C - 150µm. GFAP – 14 dias.





**Figura 20-** Em A, marcação de células para GFAP no espaço-porta (seta). Em B, colangiócitos positivos para a proteína GFAP, espaço-porta da figura A (seta) e marcação de célula estrelada hepática (cabeça de seta). Em C, espaço-porta da figura A, marcação de ducto biliar (seta maior), marcação de célula estrelada hepática (seta menor). Fotomicrografias ópticas. A - 150  $\mu\text{m}$ , B - 50  $\mu\text{m}$ , C - 25  $\mu\text{m}$ . GFAP - 16 dias.





**Figura 21-** Em A, células positivas para GFAP no interior dos septos (seta maior) e no espaço-porta (seta menor). Em B, células estreladas hepáticas positivas para a proteína GFAP no espaço-porta, espaço-porta da figura A (seta maior), marcação de colangiócitos (seta intermediária). Cels em septos fibrosos (seta menor). Em C, marcação de ducto biliar (seta maior), espaço-porta da figura A, marcação de Cels em septos fibrosos (seta intermediária), além da marcação de célula estrelada hepática no espaço-porta (seta menor). Fotomicrografias ópticas. A - 150  $\mu$ m, B - 50  $\mu$ m, C - 25  $\mu$ m. GFAP – 18 dias.

**Análise histológica semiquantitativa:**

Grupos: G1 – 12 dias/ G2 – 14 dias/ G3 – 16 dias/ G4 – 18 dias/ G5 - controle.

Gradação/Escore: ausente (1), moderado (2) e intenso (3).

**HE**

- Inflamação hepática

Ausente- Ausência de inflamação em áreas portais, no parênquima e sem o aumento da quantidade de ductos biliares.

Moderada- Processo inflamatório concentrado nos espaços-porta com proliferação de ductos biliares.

Intensa- Inflamação irradiada dos espaços-porta para o parênquima, com proliferação de ductos biliares.

**PICRO-SÍRIUS VERMELHO**

- Marcação de colágeno no fígado

Ausente - Marcação restrita a parede vascular.

Moderada- Marcação no interior do espaço-porta e em projeções iniciais de septos celulosos.

Intensa - Depósito de colágeno no espaço-porta e em septos fibrosos completos.

 **$\alpha$ - ACTINA DE MÚSCULO LISO**

- Marcação de miofibroblastos no fígado

Ausente – Marcação na parede dos vasos hepáticos (células de músculo liso).

Moderada- Acúmulo de miofibroblastos no espaço-porta com disseminação para o parênquima e no interior de projeções incompletas de septos fibrosos.

Intensa- Marcação de miofibroblastos no espaço-porta, no parênquima hepático e no interior de septos fibrosos completos.

### **CD-31**

- Marcação de células endoteliais.

Ausente- marcação de células endoteliais pré-existentes no fígado: vasos portais, veias centrais e sinusóides.

Moderada- Marcação de novos vasos no espaço-porta, marcação de veias centrais e de sinusóides.

Intensa- Marcação de novos vasos no espaço-porta e no interior de septos fibrosos, marcação de veias centrais e sinusóides.

### **GFAP**

- Marcação de células estreladas hepáticas

Ausente- marcação de células estreladas hepáticas no espaço de Disse e em ducto biliar.

Moderada- marcação de Cehs no espaço de Disse, no parênquima hepático, no espaço-porta e marcação para GFAP em ductos biliares (colangiócitos).

Intensa- Marcação de células estreladas hepáticas no espaço de Disse, no parênquima hepático, no espaço-porta, no parênquima hepático, nos ductos biliares (colangiócitos) e em septos fibrosos.



HE	G1	G2	G3	G4	G5
R1	3	3	3	3	1
R2	3	3	3	3	1
R3	2	3	3	3	1
R4	3	3	3	3	1
R5	3	3	3	3	1

**Quadro 1 – Análise histológica semiquantitativa - HE**

PIFG	G1	G2	G3	G4	G5
R1	2	2	3	3	1
R2	2	2	2	3	1
R3	2	2	2	3	1
R4	2	2	2	3	1
R5	2	2	2	3	1

**Quadro 2 – Análise histológica semiquantitativa – Picro-sírius vermelho**

$\alpha$ -ACTINA DE MÚSCULO LISO	G1	G2	G3	G4	G5
R1	2	2	3	3	1
R2	2	2	2	3	1
R3	2	2	2	3	1
R4	2	2	3	3	1
R5	2	2	2	3	1

**Quadro 3 – Análise histológica semiquantitativa -  $\alpha$ - Actina do músculo liso**

CD-31	G1	G2	G3	G4	G5
R1	2	2	3	3	1
R2	2	2	3	3	1
R3	2	2	3	3	1
R4	2	2	3	3	1
R5	2	2	3	3	1

**Quadro 4 – Análise histológica semiquantitativa - CD-31**

GFAP	G1	G2	G3	G4	G5
R1	2	2	3	3	1
R2	2	2	3	3	1
R3	2	2	3	3	1
R4	2	2	3	3	1
R5	2	2	3	3	1

**Quadro 5 – Análise histológica semiquantitativa - GFAP**

## 6 DISCUSSÃO

O espaço-porta é o local de origem da fibrose em muitas doenças crônicas do fígado, além das doenças que atingem o sistema biliar, sendo este sítio composto por células, como os fibroblastos portais, pericitos vasculares, células musculares e células ductais (colangiócitos) que têm a capacidade de gerar miofibroblastos indutores de fibrose (MIYAZAKI et al., 1993; ANDRADE et al., 1999; KINNMAN e HOUSSET, 2002; PRIESTER et al., 2010).

O trato portal é o caminho de entrada do sangue no fígado, através da veia-porta e da artéria hepática, e o caminho de saída da bile, pelo ducto biliar, e da linfa, pelos capilares linfáticos. O fígado é responsável pela produção da maior parte da linfa produzida em todo organismo e o espaço-porta pode ser considerado como o centro da drenagem linfática hepática (RAMADORI e SAILE, 2004; MCCUSKEY, 2008; OTHANI e OTHANI, 2008). Estas características nos levam a crer que no estudo desenvolvido, no qual os espaços-porta se revelaram como o núcleo da resposta fibrogênica, assim como foi referido por Lemos e Andrade (2010), os antígenos liberados por vermes adultos e ovos (estejam eles vivos ou em desintegração), além dos mediadores químicos gerados pela agressão ao parênquima hepático, circulam pelo tecido através do plasma e penetram nos espaços-porta pelos capilares linfáticos, desencadeando a mobilização dos elementos celulares potencialmente fibrogênicos que residem no trato portal e, conseqüentemente, fibrose.

Ao entrar no fígado, o sangue venoso se mistura ao sangue arterial dentro dos sinusóides hepáticos, que são capilares especiais do fígado por serem fenestrados e por desempenharem funções vitais ao órgão, como a troca metabólica bidirecional com os hepatócitos. É por meio destes capilares fenestrados que o plasma extravasa para o espaço de Disse e chega aos capilares linfáticos como linfa que segue para o canal torácico (MCCUSKEY, 2008; HERNANDEZ-GEA e FRIEDMAN, 2011).

No 12º dia pós-infecção, o fígado mostrou-se com sinais de alterações em sua histologia, especialmente nos espaços-porta. Neste momento, o trato portal apresentou-se com inflamação e com proliferação de ductos biliares em todos os animais avaliados. Este comportamento assemelha-se ao que foi visto por Oliveira e Andrade (2005) em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*, onde a inflamação e os ductos proliferados estiveram presentes no fígado durante a infecção.

No fígado normal, os colangiócitos são mitoticamente quiescentes, contudo no modelo murino de cirrose induzida por tetracloreto de carbono, a proliferação de ductos biliares foi evidente, assim como no modelo em estudo (ALPINI et al., 1997). Apesar de muitas doenças hepáticas terem a proliferação de ductos biliares como uma característica comum, em experimentos feitos com ratos infectados por *C. hepatica*, analisados a partir do 17º dia, este aspecto não foi relevante (SOUZA et al., 2006b) .

A proliferação de ductos biliares ocorre em muitas doenças hepáticas como nas hepatites virais, na cirrose biliar primária, na colangite esclerosante primária, na atresia biliar e em muitas outras doenças hepáticas. Geralmente estes ductos proliferam para substituir colangiócitos, produzir fatores pro-fibrogênicos ou para gerar miofibroblastos, sendo que o aumento destes colangiócitos em condições patológicas tem suscitado o interesse dos pesquisadores com relação ao papel que podem exercer na fibrogênese hepática (SEKI et al., 1993; SEDLACZEK et al., 2001; PRIESTER et al., 2010).

Os colangiócitos têm sido preconizados na literatura científica como possível origem de miofibroblastos. Estas células epiteliais podem se diferenciar em células mesenquimais secretoras de componentes da matriz extracelular, através do processo de transição epitélio-mesênquima (TEM) e, no presente estudo, estas células parecem ter grande participação na formação da fibrose septal, visto que foi observada a a proliferação de colangiócitos em todos os animais analisados (DIAZ et al., 2008 e GLASER et al., 2009).

Omenetti e colaboradores (2008) também ressaltaram que os colangiócitos podem participar da fibrose hepática de forma direta, através da transição epitélio-mesênquima, ou indiretamente, por meio da ativação de células estreladas hepáticas. De qualquer modo, a participação dos ductos biliares na fibrose hepática ainda tem gerado muitos debates como foi comentado por Choi e Diehl (2009) e Sholten e colaboradores (2010), sendo essencial o aumento dos estudos neste contexto para ratificar a cooperação destes elementos celulares com a fibrose hepática.

A  $\alpha$ -actina de músculo liso atuou como um marcador de miofibroblastos que foram evidentes durante todo período de observação do experimento. Estas células contráteis, independente de sua origem e localização, são identificadas por sua morfologia específica (produzem fibras de estresse), pela sua capacidade de secretar componentes da matriz e pela expressão de  $\alpha$ -actina do músculo liso (PAROLA et al., 2008).

Através da análise da fase inicial do experimento, foi possível observar que estas células expandiam-se a partir do espaço-porta em 100% dos animais. Aos 18 dias, no último ponto de análise histológica, os miofibroblastos estavam concentrados em septos fibrosos ao longo do parênquima hepático. Alguns vasos também foram marcados por esta proteína, pois a contêm em sua estrutura (células do músculo liso) (PAROLA et al., 2008).

Estes dados estão relacionados ao que foi constatado por Lemos e Andrade (2010) em fases iniciais dos estudos da fibrose septal induzida pela *C.hepatica* e pelo soro de porco. Contudo, diferem do que foi visto por Souza e colaboradores (2006b) através de técnicas combinadas de histologia de rotina, microscopia eletrônica de transmissão e imunohistoquímica em ratos infectados com *C.hepatica* em fases mais tardias. Foi relatado que poucos miofibroblastos eram evidentes nesta fase da infecção.

Apesar de a marcação para  $\alpha$ -actina do músculo liso ter sido utilizada para demonstração de miofibroblastos, este marcador não permite a identificação da origem destas células. No entanto, as evidências geradas - acúmulo de miofibroblastos nos espaços-porta de todos os animais e em todas as fases da infecção estudadas - nos permitem inferir mais uma vez que o espaço-porta funciona como um reservatório de células capazes de induzir fibrose, pós-diferenciação. Ademais, estudos feitos por Cassiman e colaboradores (2002) em fígados fibróticos de ratos e de humanos indicaram que os miofibroblastos septais têm o mesmo perfil dos miofibroblastos portais, o que pode sugerir uma origem comum entre essas células.

A indicação das células estreladas hepáticas como principais células relacionadas com a fibrogênese hepática tem sido questionada. Atualmente, sabe-se que uma população heterogênea de células pode ser a origem da fibrose no fígado, todavia a observação do comportamento das células estreladas hepáticas ao longo da formação da fibrose septal não poderia ser descartada, pois representam um grupo de células que têm grande contribuição na formação da fibrose (FORBES e PAROLA, 2011). Além do mais, Fonseca e colaboradores (2005) demonstraram por meio de super dosagens de vitamina A que as células estreladas hepáticas podem migrar para os espaços-porta no fígado de ratos infectados pela *C. hepatica* do mesmo modo como ocorreu no estudo corrente. Foi possível constatar a presença de células estreladas hepáticas nos espaços-porta, o que sugere que na fibrose septal, assim como em outros tipos de fibrose hepática, as células estreladas hepáticas colaboram com a formação da fibrose, seja

produzindo matriz extracelular, seja estimulando outras células a proliferarem e se diferenciarem em miofibroblastos.

Neste estudo, as células estreladas hepáticas foram avaliadas por meio da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e foi possível constatar que, no início da infecção, estas células mostraram-se presentes nos sinusóides hepáticos e nos espaços-porta na totalidade dos animais analisados, assim como em septos fibrosos, confirmando assim a colaboração destas células na fibrose septal. Entretanto, diferente do que foi observado neste material, estudos da fibrose septal induzida pela capilaríase hepática e pelo soro de porco revelaram que a participação das células estreladas hepáticas não foi tão proeminente (BHUNCHET e WAKE, 1992; SOUZA et al., 2006b).

A proteína ácida fibrilar glial é um filamento intermediário, geralmente considerado como específico para linhagem de células astrogliais. Durante episódios de lesão ao cérebro, os astrócitos aumentam a expressão do GFAP, sofrem ativação e adquirem a capacidade de proliferar e secretar fatores de crescimento, sendo que a sua expressão diminui com o desenvolvimento da lesão (MACHADO e FIGUEIREDO, 1996; NIKI et al., 1996; PEKNY et al., 1998).

A presença desta proteína em células estreladas hepáticas foi demonstrada inicialmente por Gard e colaboradores (1985) e tem sido utilizada como marcador de ativação inicial destas células. Além disso, esta proteína também funciona como um marcador celular que distingue as células estreladas hepáticas de outros tipos celulares potencialmente fibrogênicos (NEUBAUER et al., 1995).

Niki e colaboradores (1996) compararam o uso do GFAP com a desmina em ratos submetidos ao tratamento com CCL4 e concluíram que células positivas tanto para desmina, quanto para GFAP faziam parte dos septos fibrosos. Eles perceberam também que a coexpressão de GFAP/desmina no desenvolvimento dos septos fibrosos e a pouca expressão do GFAP no estágio avançado da fibrose podem refletir os diferentes estágios da ativação das células estreladas hepáticas.

Chang e colaboradores (2006) também fizeram o uso do marcador GFAP em células estreladas hepáticas. O intuito destes autores era comparar estas células mesenquimais hepáticas na esquistossomose e na cirrose induzida pelo vírus da hepatite C. Percebeu-se então que a marcação para GFAP era aumentada em ambos os casos.

Os ductos biliares foram imunorreativos ao GFAP. Este marcador não é específico para colangiócitos, contudo por ser considerado como um filamento

intermediário, esta proteína pode estar preservada nestas células epiteliais, assim como nas células astrogliais do cérebro que especificamente se mostram positivas para este marcador.

A angiogênese ocorreu de forma acentuada ao longo da infecção (CD31). Novos vasos formaram-se nos espaços-porta, ao início da infecção, desenvolvendo-se em paralelo aos septos fibrosos à medida que estes se formavam. Esta conduta dos vasos assemelha-se ao mecanismo clássico de cicatrização, onde o tecido de granulação (angiogênese) aparece em fases iniciais (CARMELIET e JAIN, 2000). Neste experimento, a proliferação dos vasos e o depósito de colágeno (avaliada pelo Picro-sírius vermelho) foram evidentes ao mesmo tempo, em todas as fases da infecção.

A proliferação vascular é conhecida por estar associada com a formação da fibrose hepática. Em experimentos realizados com o modelo clássico de fibrose hepática induzida por *C. hepatica*, os autores propuseram a angiogênese como um fator de importância no desenvolvimento da fibrose septal (BARBOSA e ANDRADE, 2010; LEMOS e ANDRADE, 2010). A proliferação vascular também foi percebida por Taura e colaboradores (2008) em seus experimentos. Estes pesquisadores tinham como objetivo bloquear a sinalização da angiopoietina (citocina angiogênica indispensável ao desenvolvimento e remodelamento vascular) para avaliação do comportamento da fibrose no fígado. Em comparação com o controle, a marcação para o CD-31 foi aumentada. Além disso, houve o aumento da expressão de mRNA do colágeno  $\alpha 1$  (I), no fígado de ratos tratados com CCl<sub>4</sub> e com ligadura de ducto biliar. Estes achados estão correspondentes aos dados encontrados neste estudo, em que houve positividade diferenciada entre animais infectados e animais controle para o marcador CD-31, além do depósito crescente de colágeno no fígado com o desenvolvimento da infecção.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os colangiócitos, assim como os miofibroblastos e as células estreladas hepáticas foram vistos como participantes da formação inicial da fibrose septal hepática induzida por *Capillaria hepatica*.

## REFERÊNCIAS

ACLOQUE, H.; et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 6, p. 1438-1449, Jun 2009.

ADRIANA, C.; et al. Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, n. 7, p. 1589-1594, jul. 1999.

ALLT, G.; LAWRENSON, J. G. Pericytes: cell biology and pathology. **Cells. Tiss. Org.**, v. 169, n. 1, p. 1-11, 2001.

ALPINI, G.; et al. Gamma-Interferon inhibits secretin-induced choleresis and cholangiocytes proliferation in a murine model of cirrhosis. **J. Hepatol.**, v. 27, n.2, p. 371-380, aug. 1997.

ANDRADE, S. B.; ANDRADE, Z. A. Experimental hepatic fibrosis due to *Capillaria hepatica* infection (Differential features presented by rats and mice). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 399-406, 2004.

ANDRADE, Z.A.; et al. Myofibroblasts in schistosomal portal fibrosis of man. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 87-93, feb. 1999.

ANDRADE, Z.A.; SANTANA, T.S. Angiogenesis and Schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, n.4, p. 436-439, jul. 2010.

ANDRADE, ZA. Contribution to the study of septal fibrosis of the liver. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 72, n. 5, p. 553-562, may. 1991.

ANDRADE, ZA. Regression of hepatic fibrosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 6, p. 514-520, dec. 2005.

ARTHUR, M.J.P. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, v. 340, n. 3, p. 629-637. mar. 2000.

BARBOSA, V. L.; ANDRADE, Z. A. *Capillaria hepatica*-induced septal fibrosis in rats: a contribution to the study of liver fibrogenesis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, n. 5, p. 504-507, sep. 2010.

BATALLER, R.; BRENNER, D.A. Hepatic fibrosis. In: ARIAS, I. et al. The liver: **Biology and Pathobiology**. 5ed. Wiley-Blackwell, 2009.

BATALLER, R.; BRENNER, D.A. Liver fibrosis. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 2, p. 209-218, feb. 2005.



BEAUSSIER, M.; et al. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries. **Lab. Invest.**, v. 87, n. 3, p. 292-303, mar. 2007.

BERGERS, G.; SONG, S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. **Neuro. Oncol.**, v. 7, n. 4, p. 452-464, oct. 2005.

BHUNCHET, E.; WAKE, K. Role of mesenchymal cell populations in porcine serum-induced rat liver fibrosis. **Hepatology**, v. 16, n. 6, p. 1452- 1473, 1992.

BORTHWICK, L.; et al. Cytokine mediated tissue fibrosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1832, n.7, p. 1049-1060, sep. 2013.

BOSELUT, N.; et al. Distinct proteomic features of two fibrogenic liver cell populations: hepatic stellate cells and portal myofibroblasts. **Proteomics**, v. 10, n.5, p. 1017-1028, mar. 2010.

CAMARGO, L. M. A.; et al. Capillariasis (Trichurida, *Trichinellidae*, *Capillaria hepatica*) in Brazilian Amazon: low pathogenicity, low infectivity, and a novel mode of transmission. **Parasit. Vectors**, v.3, n. 11, p. 1-6, feb. 2010.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat. Med.**, v. 9, n.6, p. 553-560, jun. 2003.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407, p. 249-257, sep. 2000.

CARROTI, S.; et al. Glial fibrillary acidic protein as an early marker of hepatic stellate cell activation in chronic and posttransplant recurrent Hepatitis C. **Liver. Tanspl.**, v. 14, n. 6, p. 806-814, jun. 2008.

CARRUTHERS, J. S.; et al. The ductular cell reaction of rat liver in extrahepatic cholestasis. II. The proliferation of connective tissue. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 1, p. 377-396, aug. 1962.

CASSIMAN, D.; et al. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. **J. Hepatol.**, v. 36, n. 2, p. 200-209, feb. 2002.

CHANG, A.; et al. Hepatic stellate cells in human schistosomiasis mansoni: A comparative immunohistochemical study with liver cirrosis. **Acta Trop.**, v.97, n.3, p. 318-323, feb. 2006.

CHOI, S.S.; DIEHL, A. M. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. **Hepatology**, v. 50, n. 6, p. 2007-2013, dec. 2009.

CLOUSTON, A. D.; et al. Fibrosis correlates with ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. **Hepatology**, v. 41, n. 4, p. 809-818, apr. 2005.

DIAZ, R.; et al. Evidence for the epithelial to mesenchymal transition in biliary atresia fibrosis. **Hum. Pathol.**, v. 39, n. 1, p. 102-115, jan. 2008.

DÍAZ-FLORES, L.; et al. Pericytes. Morphofunction, interactions, and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. **Histol. Histopathol.**, v. 24, n.7, p. 909-969, jul. 2009.

DRANOFF, J. A.; WELLS, R. G. Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis. **Hepatology**, v. 51, n. 4, p. 1438-1444, apr. 2010.

DUFFIELD, J.S.; et al. Host responses in tissue repair and fibrosis. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 8, p. 241-276, oct. 2012.

FERREIRA, L.A.; ANDRADE, ZA. *Capillaria hepatica*: A cause of septal fibrosis of the liver. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 3, p. 441-447, set. 1993.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocrin. Rev.**, v. 18, n. 1, p. 4-25, feb. 1997.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 16, p. 10931-10934, jun. 1992.

FONSECA, Y O. et al. On the presence of hepatic stellate cells in portal spaces. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n.3, p. 289-291, may. 2005.

FORBES, S. J.; PAROLA, M. Liver fibrogenic cells. **Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 25, n. 2, p. 207-217, apr. 2011.

FRIEDMAN, S.L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Gastroenterol.**, v. 134, n. 6, p. 1655-1669, may. 2008.

FRIEDMAN, S.L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 4, p. 2247-2250, jan. 2000.

FRIEDMAN, S.L.; ROLL, F.J. Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with Stractan. **Anal. Biochem.**, v. 161, n. 1, p. 207-218, feb. 1987.

FUEHRER, H. P.; et al. *Capillaria hepatica* in man- an overview of hepatic capillariosis and spurious infections. **Parasitol Res**, v. 109, n. 4, p. 969-979, oct. 2011.

GALLI, A.; et al. Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2-mediated mechanism. **Hepatology**, v. 41, n. 5, p. 1074-1084, may. 2005.

GALVÃO, V.A. Estudos sobre *Capillaria hepatica*: um avaliação do seu papel patogênico para o homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 76, n. 4, p. 415-433, dez. 1981.

GARD, A. L.; et al. Extra-neural glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in perisinusoidal stellate cells of rat liver. **J. Neuroimmunol.**, v. 8, p. 359-375, jun. 1985.

GLASER, S. S.; et al. Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. **Expert. Rev. Mol. Med.**, v. 11, p. 1-22, feb. 2009.

GOTARDO, B. M.; et al. Hepatic hepatology in *Capillaria hepatica* infected mice. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. 4, p. 341-346, aug. 2000.

GRESSNER, A. M.; et al. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. **Front. Biosci.**, v. 7, p. 793-807, apr. 2002.

GUYOT, C.; et al. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell populations involved. *Inter J; Biochem. Cell. Biol.*, v. 38, n. 2, p. 135-151, feb. 2006.

HAO, H.; et al. Phenotypic modulation of intima and media smooth muscle cells in fatal cases of coronary artery lesion. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 26, n. 2, p. 326-332, feb. 2006.

HELLERBRAND, C. Hepatic stellate cells- the pericytes in the liver. **Pflugers. Arch- Eur. J. Physiol.**, v. 465, n. 6, p. 775-778, jun. 2013.

HENDERSON, NC.; FORBES, SJ. Hepatic fibrogenesis: From within and outwith. **Toxicology**, v. 254, n. 3, p.130-135. Aug. 2008.

HERNANDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN, S.L. Pathogenesis of liver fibrosis. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 6, p. 425-456, feb. 2011.

HINZ, B.; et al. The Myofibroblast. One function, Multiple origins. **Am. J. Pathol.**, v. 170, n. 6, p. 1807-1816, jun. 2007.

IREDALE, J.P. et al. Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1832, n. 7, p. 876-883, nov. 2012.

IREDALE, J.P. et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. **J. Clin. Invest.**, v. 102, n.3, p. 538-549, aug. 1998.

IREDALE, J.P. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 29, n. 1, p. 43-54, jan. 1997.

IWAISAKO, K.; et al. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. **Gastroenterol. Hepatol.**, Suppl. 2, p. 65-68, mar. 2012.

KALLURI, R. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 6, p. 1417-1419, jun. 2009.

KALLURI, R.; WEINBERG, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 6, p. 1420-1428, jun. 2009.

KINMMAN, N.; HOUSSET, C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. **Front. Biosci.**, v.7, p. 496-503, feb. 2002.

KISSELEVA, T.; BRENNER, D.A. Fibrogenesis of Parenchymal Organs. **Proc. Am. Thorac.**, v. 5, p. 338-342, 2008.

KNITTEL, T.; et al. Cell-type-specific expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in Ito cells of rat liver. Up-regulation during in vitro activation and in vitro activation and in hepatic tissue repair. **Am. J. Pathol.**, v. 149. n. 2, p. 449-462, aug. 1996.

KNOOK, D.L.; et al. Fat-storing cells of the rat liver. Their isolation and purification. **Exp. Cell. Res.**, 1982; v. 139, n. 2, p. 468-471, jun. 1982.

LEE, J.S.; et al. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: A new function for the liver-specific pericytes? **Hepatology**, v. 45, n. 3, p. 817-825, Mar 2007.

LEE, JONG-MIN.; et al. Abnormal liver differentiation and excessive angiogenesis in mice lacking Runx3. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 139, n. 5, p. 751-758, may. 2013.

LEMOES, Q.T.; ANDRADE, Z.A. Angiogenesis and experimental hepatic fibrosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 5, p 611-614, aug. 2010.

LEVY, M. T.; et al. Fibroblast activation protein: a cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodeling interface in human cirrhosis. **Hepatology**, v. 29, n. 6, p. 1768-1778, jun. 1999.

LI, CD.; et al. *Capillaria hepatica* in China. **World J. Gastroenterol.**, v. 16, n. 6, p. 698-702, feb. 2010.

MACHADO, G. G.; FIGUEIREDO, F. Revisão: filamentos intermediários. **Ver. Med.**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 104-113, mar. 1996.

MAGNESS, S.T.; et al. A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell populations. **Hepatology**, v. 40, n. 5, p. 1151-1159, nov. 2004.

MCCUSKEY, R.S. The hepatic microvascular system in health and its response to toxicants. **Anat. Rec.**, v. 291, n. 6, p. 661-671, jun. 2008.

MICHALAK, S.; et al. Respective roles of porto-septal fibrosis and centrilobular fibrosis in alcoholic liver disease. **J. Pathol.**, v. 201, n. 1, p. 55-62, sep. 2003.

MIYAZAKI, H.; et al. Transient expression of tenascin in experimentally induced cholestatic fibrosis in rat liver: an immunohistochemical study. **J. Hepatol.**, v. 19, n. 3, p. 353-366, nov. 1993.

NEUBAUER, K.; et al. Accumulation of fibrinogen during short term and long term rat liver injury. **Gastroenterology**, v. 108, n. 4, p. 1124-1135, apr. 1995.

NIKI, T.; et al. Comparison of glial fibrillary acidic protein and desmin staining in normal and CCL4-induced fibrotic rat livers. **Hepatology**, v. 23, n. 6, p. 1538-1545, jun. 1996.

NITTA, T.; et al. Murine cirrhosis induces hepatocyte epithelial mesenchymal transition and alterations in survival signaling pathways. **Hepatology**, v. 48, n. 3, p. 909-919, sep. 2008.

NOVO, E.; et al. Hepatic Myofibroblasts: A heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. **Inter. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 41, p. 2089-2093, mar. 2009.

OLIVEIRA, L.; ANDRADE, Z.A. Significance of bile-duct changes in schistosomiasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n.6, p. 464-468, nov.-dec. 2005.

OMENETTI, A.; et al. Hedgehog-mediated mesenchymal-epithelial interactions modulate hepatic response to bile duct ligation. **Lab. Invest.**, v. 87, n. 5, p. 499-514, may, 2007.

OMENETTI, A.; et al. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and in humans. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 10, p. 3331-3342, oct. 2008.

OTHANI, O.; OTHANI, Y. Lymph Circulation in the liver. **Anat. Rec.**, v. 291, n. 6, p. 643-652, dec. 2008.

PAROLA, M.; et al. Myofibroblast-like cells and liver fibrogenesis: Emerging concepts in a rapidly moving scenario. **Mol. Aspects Med.**, v. 29, n. 1-2, p. 58-66, apr. 2008.

PARONETO, F.; POPPER, H. Chronic liver injury induced by immunologic reactions. Cirrhosis immunization with heterologous sera. **Am. J. Pathol.**, v. 49, n. 6, p. 1087-1101, dec. 1966.

PEKONY, M.; et al. Impaired induction of blood-brain properties in aortic endothelial cells by astrocytes from GFAP-deficient mice. **Glia**, v. 22, n. 4, p. 390-400, apr. 1998.

PHAN, S.H. Biology of fibroblast and myfibroblast. **Proc. Am. Thorac. Soc.**, v. 5, n. 3, p. 334-337, apr. 2008.

POVERO, D.; et al. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process. **Histol. Histopathol.**, v. 25, p. 1075-1091, 2010.

PRIESTER, S.; et al. Involvement of cholangiocyte proliferation in biliary fibrosis. **World J. Gastrointest. Pathophysiol.**, v. 1, n. 2, p. 30-37, jun. 2010.

RAMADORI, G.; SAILE, B. Mesenchymal cells in the liver- one cell type or two? **Live.**, v. 22, n. 4, p. 283-294, aug. 2002.

RAMADORI, G.; SAILE, B. Portal tract fibrogenesis in the liver. **Lab. Inv.**, v. 84, n. 2, p. 153-159, dec. 2004.

ROCKEY, D.C. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. **Semi. Liver. Dis.**, v.21, n.3, p. 337-349, aug. 2001.

ROSKAMS, T.; et al. Neuro-regulation of the neuroendocrine compartment of the liver. **Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.**, v. 280, n. 1, p. 910-923, sep. 2004.

RUAS, J.L.; et al. Infecção por *Capillaria hepatica* em carnívoros silvestres (*Lycalopex Gymnocercus e Cerdocyon Thous*) na região Sul do Rio Grande do Sul. **Arq. Inst. Biol.**, v. 70, n. 2, p. 127-130, jun. 2003.

RUBIN, E, HUTTERER, F, POPPER, H. Experimental hepatic fibrosis without hepatocelular regeneration. **Am. J. Pathol.** v. 52, n. 1, p. 11-19, 1968.

RUOSLAHTI, E.; YAMAGUCHI, Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. **Cell**, v. 64, n. 5, p. 867-869, mar. 1991.

RYGIEL, K. A.; et al. Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease. **Lab. Invest.**, v. 88, n. 2, p. 112-123, dec. 2008.

SANTOS, A.B.; et al. Pathogenesis of hepatic septal fibrosis associated with *Capillaria hepatica* infection of rats. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, n. 6, p. 503-506, dec. 2001.

SAREM, M.; et al. Las células estrelladas del hígado: su importancia en condiciones normales y patológicas. **Gastroenterol. Hepatol.**, v. 29, n. 2, p. 93-101, 2006.

SATO, M.; et al. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. **Cell. Struct. Funct.**, v. 28, n. 2, p. 105-112, apr. 2003.

SCHINONI, M. I.; et al. Incomplete septal cirrosis: an enigmatic disease. **Liver. Int.**, v. 24, n. 5, p. 452-456, oct. 2004.

SCHUPPAN, D.; et al. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. **Semin. Liver. Dis.**, v. 21, n. 3, p. 351-372, aug. 2001.

SEDLACZEK, N.; et al. Proliferating bile duct epithelial cells are a major source of connective tissue growth factor in rat biliary fibrosis. **Am. J. Pathol.**, v. 158, n. 4, p. 1239-1244, apr. 2001.

SEKI, S.; et al. Analysis of proliferating biliary epithelial cells in human liver disease using a monoclonal antibody against DNA polymerase alpha. **Virch. Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.**, v. 422, n. 2, p. 133-143, 1993.

SHOI, S. S.; DIEHL, A. M. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. **Hepatology**, v. 50, n. 6, p. 2007-2013, dec. 2009.

SHOLTEN, D.; et al. Genetic labeling does not detect epithelial-to-mesenchymal transition of cholangiocytes in liver fibrosis in mice. **Gastroenterology**, v. 139, n. 3, p. 987-998, sep. 2010.

SNOWDON, V.K.; FALLOWFIELD, J.A. Models and mechanisms fibrosis resolution. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 35, n. 5, p. 794-799, may. 2011.

SOUZA, M.M. et al. Pathogenesis of septal fibrosis of the liver. (An experimental study with a new model). **Pathol. Res. Pract.**, v. 202, n. 12, p. 883-889, jul. 2006.

SOUZA, M.M. et al. Significance and fate of septal fibrosis of the liver. **Hepatol. Res.**, v. 35, p. 31-36, jan. 2006.

TAURA, K.; et al. Hepatic stellate cells secrete angiopoietin 1 that induces angiogenesis in liver fibrosis. **Gastroenterology**, v. 135, n. 5, p. 1729-1738, nov. 2008.

TOMASEK, J. J.; et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 3, n. 5, p. 349-363, May 2002.

WYNN, T. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 3, p. 524-529, mar. 2007.

WYNN, T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **J. Pathol.**, v. 214, n. 2, p. 199-210. Jan. 2008.

ZEISBERG, M.; NEILSON, E.G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transition. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 6, p. 1429-1437, jun. 2009.