



INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

ANGIOGÊNESE E FIBROSE HEPÁTICA EXPERIMENTAL

QUELI TEIXEIRA LEMOS

Rio de Janeiro

2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

QUELI TEIXEIRA LEMOS

ANGIOGÊNESE E FIBROSE HEPÁTICA EXPERIMENTAL

**Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Biologia Celular e
Molecular.**

Orientador: Dr. Zilton de Araújo Andrade

**RIO DE JANEIRO
2008**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

QUELI TEIXEIRA LEMOS

ANGIOGÊNESE E FIBROSE HEPÁTICA EXPERIMENTAL

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Zilton de Araújo Andrade

Aprovada em: 25/08/2008

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis - Presidente

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

Prof. Dr^a. Márcia Maria de Souza

Prof. Dr. Raimundo Paraná Filho

Prof. Dr. Arion Barbosa Almeida Junior

Rio de Janeiro, 25 de agosto de 2008

**As coisas que os olhos não viram,
e os ouvidos não ouviram, e não
chegaram ao coração do homem,
são as que Deus preparou para os
que o amam.**

I Corintios 2:9

**Ao meu Senhor Jesus, minha fortaleza,
socorro presente em todos os
momentos.**

**Ao meu amado esposo Kleber, pelo
incentivo, exemplo de determinação e
paciência.**

**Aos meus filhos: Kleber e Kevin,
minhas maiores realizações na vida.**

**A minha mãe, família e amigos pelo
apoio e confiança.**

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Zilton A. Andrade, um grande exemplo de pesquisador e profissional para todas as pessoas que tiveram a honra de tê-lo como orientador, pela confiança, disponibilidade e carinho o qual trata a todos sem distinção. Minha grande admiração, respeito e gratidão. Estará sempre em minhas orações. Muito obrigada

À Professora Dr. Sônia G. Andrade, pela revisão do trabalho e pelo exemplo de pesquisadora que tanto nos inspira. Muito obrigada.

Ao Coordenador do Curso de Biologia Celular e Molecular, Dr. Milton Ozório Moraes, pelo apoio institucional. Muito obrigada.

Ao Diretor do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, pelo apoio institucional, atenção e exemplo de determinação que muito me inspirou. Muito obrigada.

Ao CPqGM, como órgão facilitador para o desenvolvimento de todo o trabalho experimental.

À Bióloga Elisângela Trindade do Laboratório de Patologia Experimental, pelo auxílio, amizade e disponibilidade. Muito obrigada.

À Bióloga e Mestre Ana Cristina pela cooperação nas imuno-histoquímicas, pela atenção e carinho a mim dispensado. Muito obrigada.

À Doutora Márcia Maria de Souza, pelo auxílio, incentivo e preciosa amizade. Muito obrigada.

À Mestre, Bárbara Cristina Alves de Assis, pela cooperação na realização do modelo com soro de porco, disponibilidade, amizade e grande exemplo de determinação e competência. Obrigada.

Ao Sr. Antônio Carlos S. Santos, Técnico do Laboratório de Patologia Experimental pelo auxílio com o manuseio dos animais no laboratório e disponibilidade. Muito obrigada.

Aos Amigos do Laboratório de Patologia Experimental, pela ajuda e amizade a mim dispensada. Que Deus os abençoe. Muito obrigada.

Aos Amigos do Laboratório de Chagas Experimental Autoimunidade e Imunologia Celular pelo incentivo. Muito obrigada.

Às Técnicas do Laboratório de Histopatologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, pela competência com a qual realizaram os cortes e colorações histológicas deste trabalho. Muito obrigada

Às Secretárias da pós-graduação do Instituto Oswaldo Cruz, pela disponibilidade, paciência e atenção. Muito obrigada.

À Secretária da pós-graduação do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Taíse Coutinho Caíres, pela disponibilidade, simpatia e atenção. Muito obrigada

A Rejane Márcia Chaves de Menezes, chefe da experimentação do Biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz pelo cuidado e organização dos animais no biotério, eficiência e agilidade com que desempenha seu trabalho. Muito obrigada.

À Bibliotecária Ana Maria Fiscina Sampaio, do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz pela ajuda na organização das referências bibliográficas, correções e pela disponibilidade e simpatia. Muito obrigada.

A Todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho, muito obrigada.

Apoio Financeiro: CNPq

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS		
RESUMO		
ABSTRACT		
1	<u>INTRODUÇÃO</u>	01
2	<u>JUSTIFICATIVA</u>	02
3	<u>OBJETIVO</u>	02
3.1	Objetivo Geral	02
3.2	Objetivos Específicos	02
4	<u>HIPÓTESE</u>	03
5	<u>REVISÃO BIBLIOGRAFICA</u>	04
5.1	Angiogênese	04
5.2	Fibrose hepática	08
5.2.1	Aspectos Morfológicos da fibrose hepática	12
5.2.2	Modelos Experimentais	13
5.2.2-1	Modelo de indução de fibrose septal por Soro de Porco	13
5.2.2-2	Modelo de indução de fibrose septal por <i>Capillaria hepática</i>	15
5.2.2-3	Modelo de Indução de fibrose septal por Tetracloreto de Carbono(CCl ₄)	17
5.2.2-4	Modelo de indução de fibrose pela Ligadura do Colédoco	19
5.2.2-5	Modelo de indução de fibrose pela Infecção por <i>S. mansoni</i>	20
6	<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	24
6.1	Animais	24
6.2	Grupos Experimentais	24
6.2.1	<u>Grupo Experimental com Esquistossomose murina</u>	24
6.2.2	<u>Grupo Experimental com <i>Capillaria hepatica</i></u>	24
6.2.3	<u>Grupo Experimental com Soro de Porco</u>	24
6.2.4	<u>Grupo Experimental com CCl₄</u>	25
6.2.5	<u>Grupo Experimental com Ligadura do colédoco</u>	25

6.3	Anestesia	25
6.4	Eutanásia	25
6.5	Histopatologia	25
6.6	Imuno-histoquímica	26
6.6.1	Imuno-fluorescência	26
6.6.2	Imuno-peroxidase	26
7	<u>RESULTADOS</u>	27
7.1	Generalidades	27
7.2	Modelos	28
7.2.1	<u>Grupo Experimental com Esquistossomose murina</u>	28
7.2.2	<u>Grupo Experimental com <i>Capillaria hepatica</i></u>	29
7.2.3	<u>Grupo Experimental com Soro de Porco</u>	30
7.2.4	<u>Grupo Experimental com CCl₄</u>	31
7.2.5	<u>Grupo Experimental com Ligadura do colédoco</u>	32
8	<u>DISCUSSÃO</u>	43
8.1	<u>Generalidade</u>	43
8.2	<u>Peculiaridades</u>	47
9	<u>CONCLUSÕES</u>	56
10	<u>PERSPECTIVAS FUTURAS</u>	56
11	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	57

LISTA DE ABREVIATURAS

VEGF.....Fator de crescimento do endotélio Vascular

Fator VIII..... Fator de Von Willenbrand

Ang1.....Angiopoetina 1

FGFb.....Fator de crescimento de fibroblasto beta,

TGF- β 1.....Fator de crescimento transformador de
crescimento beta-1

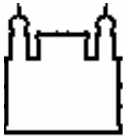
PDGF.....Fator de crescimento derivado de plaqueta

TNF- αFator de necrose tumoral alfa

HGF.....Fator de crescimento do hepatócito

IGF-1.....Fator de crescimento semelhante a insulina-1

MCP-1.....Proteína quimiotática para monócito-1



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ ANGIOGÊNESE E FIBROSE HEPÁTICA EXPERIMENTAL

RESUMO TESE DE DOUTORADO

Queli Teixeira Lemos

Na cicatrização dos ferimentos a fase de intensa proliferação vascular (tecido de granulação) constitui um aspecto crucial indicativo da formação do tecido fibroso do reparo. Vários trabalhos recentes têm chamado a atenção para a semelhança deste processo com a patogênese da fibrose hepática. De fato, tem sido demonstrado que a proliferação vascular (angiogênese) ocorre como uma alteração proeminente em várias doenças crônicas fibrosantes do fígado. Os modelos experimentais de fibrose septal induzida pela infecção por *Capillaria hepatica* no rato, por ligadura do ducto biliar do rato, e pela esquistossomose no camundongo foram recentemente utilizados para demonstrar a estreita relação entre angiogênese e fibrose hepática.

O presente trabalho procura investigar, comparativamente, a presença de angiogênese, suas características evolutivas, intensidade e peculiaridades nos modelos experimentais de fibrose hepática mais comumente utilizados. Para tal, cinco modelos diferentes e bem padronizados de fibrose hepática foram escolhidos: a) Fibrose septal induzida pela infecção com o helminto *Capillaria hepatica* no rato; b) Fibrose septal induzida pelo tratamento repetido com soro de porco em ratos; c) Fibrose com cirrose, provocada pelo tratamento crônico com o tetracloreto de carbono (CCl₄); d) fibrose biliar provocada pela ligadura total do colédoco de ratos; e) fibrose granulomatosa e periportal produzida em camundongos pela infecção crônica pelo *Schistosoma mansoni*. A primeira etapa do trabalho consistiu na produção experimental de cada tipo de fibrose hepática. A segunda etapa consistiu na avaliação dos resultados através do estudo qualitativo com técnicas histológicas e imuno-histoquímicas, tendo sido avaliadas: as características dos elementos celulares, matriciais e vasculares. Além da atenção dada ao comportamento do endotélio (fator VIII), da membrana basal vascular (laminina, fibronectina, colágeno tipo IV), paredes vasculares (actina, elastina) e da participação do fator de crescimento do endotélio vascular VEGF, uma atenção especial foi dada ao comportamento dos pericitos, elementos celulares cruciais na fibrogênese e possivelmente a razão de ser da angiogênese, em virtude do seu papel na formação e remodelamento do tecido conjuntivo fibroso.

O comportamento da angiogênese, sua intensidade, sua relação sequencial com o depósito de matriz extracelular, foram particularmente consideradas em cada modelo *per se*, e depois analisada comparativamente. Todos os modelos exibiram angiogênese associada com fibrogênese, sendo que a inter-relação patogenética mais evidente foi sugerida nos modelos da capilaríase e da ligadura do ducto biliar.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

ANGIOGENESIS AND EXPERIMENTAL HEPATIC FIBROSIS

ABSTRACT

DOCTORAL THESIS

Queli Teixeira Lemos

During wound healing the development of marked vascular proliferation (granulation tissue) represents a crucial phase of the repair process. Recent publications call attention to the main characteristics of this process being present during the pathogenesis of hepatic fibrosis. As a matter of fact, prominent vascular proliferation (angiogenesis) appears associated with fibrosis in chronic hepatic diseases. The experimental models of hepatic fibroses, such as that induced by *Capillaria hepatica* infection in rats, bile-duct ligation and murine schistosomiasis have been recently used to demonstrate the close relationship between angiogenesis and hepatic fibrosis.

The present investigation concerns a qualitative and comparative study on the presence, evolution, prominence, and peculiarities of angiogenesis in the most common experimental rat models of hepatic fibrosis: a) *Capillaria hepatica*-induced septal fibrosis; b) pig-serum-induced fibrosis; c) carbon tetrachloride (CCl₄)-induced fibrosis with cirrhosis; d) main bile duct ligation, and e) the murine model of chronic granulomatous and periportal fibrosis caused by *Schistosoma mansoni* infection. First step was concerned with the characterization of cells, vessels, and extra cellular matrix by histological and immuno-histochemical techniques, being specifically observed the behavior of the endothelium (factor VIII), vascular basement membrane (laminin, fibronectin, type IV collagen), the vascular walls (actin, elastin), and the presence of the vasculo-endothelium growth factor - VEGF). Special attention was paid to the presence of pericytes, a key-element in fibrogenesis, and probably a rational explanation for the role of angiogenesis in hepatic fibrosis, considering the role pericytes are known to play during formation and remodeling of connective fibrous tissue.

After analyzing the angiogenesis behavior and intensity, and its sequential relationship with fibrosis production in each model, a comparative study was made. All models studied exhibited prominent angiogenesis, the most evident relationship with hepatic fibrosis formation being exhibited by the *Capillaria hepatica* and the bile-duct ligation models.

1- INTRODUÇÃO

A fibrose representa um achado comum nas doenças crônicas do fígado, sendo considerada como uma tendência para a cicatrização das lesões inflamatórias crônicas ou degenerativas. Ela é caracterizada por mudanças quantitativas e qualitativas nos componentes da matriz extracelular, principalmente pelo aumento da síntese e acúmulo do colágeno fibrilar dos tipos I e III. Representa um quadro de comprometimento funcional em muitas doenças hepáticas, tendo grande valor prognóstico, podendo estar associada com a cirrose ou até mesmo o câncer hepático, o que torna o seu estudo de grande relevância.

RAPAPPORT *et al.* (1983) chamaram a atenção para o fato do desenvolvimento da cicatrização na cirrose hepática vir invariavelmente acompanhado por uma intensa proliferação vascular, sugerindo que o remodelamento tecidual e o reparo fibroso poderiam representar a construção do caminho para o fluxo sanguíneo anormal na cirrose. Contudo, o mecanismo que disparava essa intensa proliferação vascular permaneceu por ser determinado.

Até pouco tempo a angiogênese era vista apenas no contexto do processo de reparo, onde naturalmente, após processo inflamatório crônico, o tecido lesado inicia um depósito de material conjuntivo na tentativa de reparar os danos causados ao tecido. Nesse momento ocorre uma formação local de novos vasos que vão se ramificando a fim de levar aporte de oxigênio e nutrientes para o tecido novo, denominado de tecido de granulação.

A fibrose e a angiogênese eram até então estudadas como processos distintos. Entretanto, descobertas recentes têm chamado a atenção para a participação desse processo na fibrose hepática. ROSMORDUC *et al.* (1999) estudando a angiogênese na cirrose biliar experimental do rato demonstraram que a hipóxia hepatocelular induzia o aumento da síntese do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), e que este poderia ser o promotor da proliferação micro-vascular associada à fibrose hepática. Esse fato chamou a atenção para a estreita relação entre os dois processos.

A proliferação de células vasculares hepáticas ou “remodelamento vascular” tem sido firmemente associado à fibrose (UENO *et al.*, 2006). Artigos recentes vêm demonstrando a relação entre citocinas e moléculas da matriz envolvidas na fibrose, que também são importantes na formação de novos vasos, como por exemplo: O TGF- β , que indiretamente induz à formação de novos vasos sanguíneos *in vivo*,

principalmente quando associado com o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (KALLURI & SUKHATMA, 2000).

Estudo da fibrose induzida pelo parasito *Capillaria hepatica*, realizada em nosso laboratório, permitiu observar uma proeminente angiogênese ocorrendo no início do depósito do colágeno no processo fibroso (SOUZA *et al*, 2006). Este fato nos despertou o interesse em pesquisar a partir de outros modelos experimentais a participação da neovascularização na fibrose hepática, em vista da importância do entendimento de cada passo da cascata fibrosante, desde a agressão hepática até a síntese do excesso de matrix extracelular, que poderia trazer dados de grande potencial para o entendimento da patogenia e para aplicações terapêuticas.

2- JUSTIFICATIVA

Uma vez constatada a participação da angiogênese como um processo geral, precursor da fibrose, a utilização de drogas anti-angiogênicas, poderia ser considerada como uma medida terapêutica adicional.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Investigar a participação da angiogênese na patogenia da fibrose utilizando diversos modelos de indução de fibrose hepática.

3.2- Objetivos Específicos

3.2.1. Investigar se há uma uniformidade geral no comportamento dos vasos sanguíneos e dos fatores de angiogênese no processo de fibrogênese hepática em diferentes modelos experimentais, quais sejam: Fibrose induzida pela administração do Soro de Porco, pela infecção com a *Capillaria hepatica*, pela administração repetida do tetracloreto de carbono (CCl₄), pela ligadura do canal colédoco em ratos, e pela infecção com o *Schistosoma mansoni* em camundongos.

3.2.2. Avaliar a partir de análises histológicas, com técnicas de imuno-fluorescência indireta e de imuno-histoquímica, os componentes vasculares: Endotélio (fator VIII), membrana basal (laminina, fibronectina, colágeno tipo IV), parede vascular (actina, elastina) e o fator angiogênico (VEGF).

4- HIPÓTESE

1. A angiogênese é um processo geral que antecede a formação da fibrose e está relacionada ao desenvolvimento do processo fibroso. Os vasos que proliferam trazem consigo células especializadas responsáveis pelo excesso do depósito da matriz extracelular.

2. Como os modelos experimentais diferem na etiologia e na dinâmica do processo fibroso, o comportamento da angiogênese poderia também exibir características peculiares para cada caso.

5- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1- Angiogênese

A formação de novos vasos pode ocorrer por diferentes processos. No início do desenvolvimento embrionário os vasos são formados pelo processo conhecido como vasculogênese, em que as células endoteliais progenitoras se diferenciam e proliferam dentro de um tecido avascular e se juntam para formar uma rede tubular primitiva, denominada de plexo vascular primitivo (UENO *et al*, 2006). A angiogênese refere-se ao processo pelo qual esta trama inicial é modificada, compreendendo a formação de novos vasos via brotamento de células endoteliais maduras de vasos pré-existentes (YANCONPOULOS *et al*, 2000).

A angiogênese normalmente ocorre durante o período embrionário, porém ao longo da vida permanece quiescente, sendo observada apenas em alguns processos fisiológicos como na cicatrização dos ferimentos e ciclo ovariano, e em algumas doenças como: a psoríase, o diabetes, o câncer e as doenças inflamatórias. A formação de novos vasos é de suma importância para a regularização do fluxo sanguíneo e aporte de oxigênio e nutrientes bem como para o transporte de células de defesa para tecidos lesados (WALSH & PEARSON, 2001).

O controle da angiogênese é feito por um balanço entre fatores endógenos: promotores e inibidores. Vários fatores solúveis, proteínas da matriz, e diferentes tipos celulares participam da regulação desse complexo processo *in vivo* (UENO *et al*, 2006). Quando os mecanismos de controle falham a angiogênese, seja excessiva ou deficiente, torna-se patológica.

A angiogênese, portanto, compreende um processo complexo que envolve desde mediadores solúveis, interações célula-célula e célula-matriz extracelular, bem como forças biomecânicas, podendo ser resumida nas seguintes etapas: aumento da permeabilidade vascular e depósito de fibrina extra-vascular; desarranjo da parede vascular, com remoção dos pericitos; degradação da membrana basal e da matriz extracelular; migração da célula endotelial através da matriz extracelular remodelada; proliferação da célula endotelial; formação de estruturas tubulares; inibição da proliferação e migração da célula endotelial; reconstituição da membrana basal; maturação dos complexos juncionais; construção da parede vascular, através do recrutamento e diferenciação de células murais, pericitos e células de músculo liso; estabelecimento de fluxo sanguíneo no novo vaso.

Dentre os diversos fatores descritos como angiogênicos, um dos mais importantes é o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). O VEGF tem um papel central na divisão, migração e formação tubular das células endoteliais vasculares, além de regular a vasculogênese (MUSTONEN & ALITALO, 1995; SHIBUYA, 1995; BROWN et al, 1997; FERRARA & DAVIS-SMYTH, 1997). Acredita-se que também apresente um papel essencial na sobrevivência dessas células uma vez que inibe a apoptose e a regressão de capilares. O VEGF possui uma potente habilidade de aumentar a permeabilidade vascular e a vasodilatação. O aumento da vasodilatação promove o aumento do fluxo sanguíneo que precede a angiogênese (NAGY *et al*, 2007). ROSMORDUC *et al*. (1999) sugeriram que a angiogênese é primariamente estimulada pelo VEGF em resposta a hipóxia hepatocelular.

O VEGF é uma glicoproteína ligada à heparina, peso molecular de 45 Kda, que possui dois receptores: o FLT-1 (Fms-Like tirosina quinase) e FLK-1(fígado fetal quinase), ambos tirosina quinase transmembrana, regulados pela hipóxia. Acreditava-se que os receptores VEGFR tirosina quinase eram específicos de células endoteliais, atualmente sabe-se que várias células expressam ambos os receptores. Estudos mostram que o VEGF tem ação autócrina via receptores, tanto em células endoteliais, quanto em não endoteliais.

O fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) também participam ativamente do processo de angiogênese (FOLKMAN & KLAGSBRUN, 1997; GOSPODAROWICZ *et al*, 1987; LEVEEN *et al*, 1994). O FGF produzido em células tumorais e também em vários tipos de células normais, inclusive endoteliais promove a angiogênese por um efeito direto ou indireto nas células endoteliais, induzindo a replicação e a migração dessas células, ou regulando a expressão do VEGF. Esse fator demonstrou ter um efeito sinérgico na indução da angiogênese *in vitro*.

Múltiplos fatores têm sido descritos como responsáveis pela expressão aumentada do VEGF na angiogênese patológica. Tem-se sugerido que a isquemia, assim como o aumento de certos fatores de crescimento são os responsáveis pelo aumento da expressão do VEGF na inflamação crônica e na cicatrização (NAGY *et al*, 2007). BROGI *et al*. (1994) demonstraram *in vitro* que a hipóxia estimula a expressão de genes de VEGF, tanto em células endoteliais quanto em células do músculo liso vascular e fibroblastos. Como tecido inflamado freqüentemente é tecido em hipóxia, a inflamação pode promover a angiogênese induzindo a liberação de diversos fatores angiogênicos.

A relação entre inflamação e angiogênese é evidenciada também quando muitos fatores que são angiogênicos mostram-se como fatores pró-inflamatórios, e muitos agentes designados especificamente como inibidores angiogênicos podem também inibir a inflamação (WALSH & PEARSON, 2001).

A angiogênese prolongada e excessiva é uma característica dos processos inflamatórios em muitos órgãos, inclusive no fígado. As células inflamatórias: monócitos, macrófagos, plaquetas, mastócitos e outros leucócitos liberam numerosos fatores angiogênicos incluindo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), angiopoetina (Ang1), fator de crescimento de fibroblasto beta (FGF β), fator transformador de crescimento beta 1(TGF- β 1), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de crescimento do hepatócito (HGF), fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1), proteína quimiotática para monócito-1(MCP-1), entre muitas outras (PINEDO *et al*, 1998; SELJELID *et al*, 1999). Alguns desses fatores também atraem células em estado de degeneração que, por outro lado, liberam fatores angiogênicos adicionais (SCHAPER *et al*, 1996; COUSSENS *et al*, 1999).

Os estudos sobre angiogênese concentravam-se apenas nos componentes endoteliais, principalmente quando o primeiro fator angiogênico foi descoberto. Contudo, os capilares sanguíneos são constituídos por dois tipos celulares, as células endoteliais e os pericitos. Atualmente, os pericitos têm despertado grande interesse dos pesquisadores, principalmente como contribuinte funcional da angiogênese tumoral. Os pericitos são células perivasculares que estão mergulhadas na membrana basal dos microvasos em contato íntimo com as células endoteliais, compartilhando pequenas moléculas, íons, e servindo também como suporte para as mesmas. São células de origem mesenquimal que foram descritas inicialmente por Charles Rouget como célula de músculo liso devido à presença de actina. Estudos recentes vêm chamando a atenção para a participação dessas células no processo fibroso, pelo seu potencial em se transformar em miofibroblasto (RAJKUMAR *et al*, 2005).

Estudar a participação do processo angiogênico e tentativas de inibi-los pode representar no mínimo uma forma de reduzir a inflamação, ajudando a restaurar a estrutura e função tecidual após doenças inflamatórias crônicas.

Atualmente tem-se utilizado inibidores de angiogênese a fim de se observar o papel da mesma em alguns processos. Existem duas classes de inibidores de angiogênese: os diretos e os indiretos. Os inibidores de angiogênese diretos tais

como a vitaxina, a angiostatina e outros, evitam que as células dos endotélios vasculares proliferem e migrem em resposta a um espectro de proteínas pró-angiogênicas, como VEGF, FGF β , IL-8, PDGF e fator de crescimento endotelial derivado de plaqueta (PD-EGF). Os inibidores diretos da angiogênese praticamente não induzem resistência porque agem mais em células endoteliais geneticamente estáveis, do que em células neoplásicas instáveis mutantes (KERBEL, 1991).

Os inibidores angiogênicos indiretos geralmente previnem a expressão ou bloqueiam a atividade de uma proteína neoplásica que ativa a angiogênese ou bloqueia a expressão de receptores em células endoteliais (RAK *et al.*, 2000 e 2002; KERBEL *et al.*, 1998).

Alguns pacientes têm sido tratados com inibidores de angiogênese diretos, tais como interferon-alfa (IFN- α), por até 7 anos (FOLKMAN *et al.*, 1997) e com endostatina por mais de 1 ano (FOLKMAN, 2001). Foi demonstrado que essas drogas têm muita baixa toxicidade (MARLER *et al.*, 2002) e a resistência adquirida à droga foi raramente vista em animais que foram tratados por longos períodos de tempo com angiostatina ou endostatina (BOEHM *et al.*, 1997).

D'AMATO e colaboradores (1994), demonstraram que a droga anti-inflamatória talidomida pode inibir a angiogênese induzida por FGF β ou VEGF em ensaios realizados utilizando córneas de coelho (GIMBRONE *et al.*, 1974). A talidomida inibe a formação de novos vasos sanguíneos em coelhos e camundongos independentemente da habilidade destes em suprimir a infiltração de células inflamatórias hospedeiras (D'AMATO *et al.*, 1994). O tratamento com talidomida suprime a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que tem sido demonstrado como anti-angiogênico (SETTLES *et al.*, 2001; BAUDITZ *et al.*, 2002; D'AMATO *et al.*, 2001). Contudo, outros mais potentes inibidores de TNF- α , tais como pentoxifilina e dexametasona, têm pouca ou nenhuma atividade em ensaios de angiogênese de córnea (FOLKMAN, 2001). A supressão de TNF- α não deve ser encarada como o fator principal da atividade anti-angiogênica da talidomida.

Pacientes com mieloma múltiplo ou síndromes mielodisplásicas tratados com talidomida, apresentaram níveis plasmáticos de proteínas pró-angiogênicas VEGF e FGF β significativamente diminuídos comparados aos níveis pré-tratamento. Esta diminuição esteve relacionada com a eficácia da terapia com talidomida (BERTOLINE *et al.*, 2001). A talidomida não tem um efeito antiproliferativo em células de mieloma múltiplo *in vitro* (D'AMATO *et al.*, 2001), embora altas concentrações de talidomida (acima de 100 μ M) sejam requeridas para tal efeito.

Trabalho recente demonstrou que a talidomida não revelou capacidade para inibir a angiogênese que se desenvolve na esquistossomose experimental do camundongo (LIMA *et al*, 2007).

O IFN- α tem sido largamente usado não apenas como um agente antiviral para o tratamento de hepatite crônica, mas também, como um agente citotóxico para o tratamento de certas leucemias e alguns cânceres de bexiga (FOLKMAN *et al*, 1997). A primeira evidência de que o IFN- α tem atividade anti-endotelial foi verificada em 1980 quando se demonstrou que as células endoteliais tinham a sua motilidade inibida *in vitro* em uma maneira dose-dependente e reversível (BROUTY & ZETTER, 1980), e subseqüentemente foi demonstrada a inibição da angiogênese *in vivo* (SIDKY & BORDEN, 1987; DVORAK & GRESSER, 1989). Estudos experimentais em camundongos mostraram que a eficácia anti-angiogênica do IFN- α é ótima em baixas doses e tende a cair em altas doses (SLATON *et al*, 1999).

Em recente Editorial do Journal of Hepatology foi sugerido que o uso de drogas anti-angiogênicas poderá vir a se constituir no meio mais eficaz para o tratamento das doenças crônicas do fígado, já que os tratamentos hoje disponíveis para tal estão longe de serem satisfatórios (LAI & ADAMS, 2005).

5.2- Fibrose hepática

A fibrose hepática ocorre como conseqüência de muitas formas de doenças crônicas do fígado, sendo um processo dinâmico e complexo que envolve a ativação de vários tipos celulares e a participação de muitas moléculas levando à produção excessiva de proteínas da matriz extracelular (BURT, 1993; DAY, 1996; FRIEDMAN, 1999).

A patogênese da fibrose em doenças crônicas do fígado em humanos ainda tem aspectos pouco conhecidos (FRIEDMAN, 2004). Entretanto fica bem evidente sua associação com dois fatores: a inflamação crônica e a necrose hepatocelular repetida.

O avanço no conhecimento do metabolismo do colágeno tem ajudado no entendimento da cinética da fibrose no parênquima hepático. Três aspectos têm destaque nesse processo: 1) a ativação de fibroblastos e células relacionadas; 2) a maturação das fibras extracelulares; 3) e a degradação (catabolismo) dessas fibras (POPPER & UDENFRIEND, 1970; MCGREE & PATRICK, 1972). Normalmente, o

fígado mantém um equilíbrio entre as quantidades relativas de parênquima e estroma, através da produção concomitante das proteínas de depósito, com as enzimas proteolíticas específicas, responsáveis pela degradação da matriz extracelular (MARTINEZ-HERNANDES & CHUNG, 1984).

A principal fonte das proteínas da matriz extracelular (MEC) do fígado são as células perisinusoidais denominadas de células estreladas ou células de Ito (ARESON *et al*, 1988). Elas são consideradas as chaves efetoras da resposta fibrótica, sendo o principal alvo das citocinas fibrogênicas (FRIEDMAN, 1993). Os estudos demonstram que após necrose de hepatócitos, populações de células perisinusoidais são ativadas. Uma vez ativadas essas células proliferam e passam a produzir aproximadamente 5 vezes mais colágenos fibrilares tipos I e III e glicoproteínas associadas (STENGER, 1966). Em lesões agudas este fenômeno é transitório. Contudo em doenças crônicas a ativação das células perisinusoidais ocorre associada a uma modulação fenotípica para miofibroblastos, adquirindo um formato alongado com um proeminente retículo endoplasmático, aumentando a expressão de RNA para vários componentes da matriz extracelular, diminuindo consideravelmente a quantidade de vitamina A intracelular e passando a exibir marcadores para alfa actina de músculo liso (BURT, 1993; FRIEDMAN, 1999). Em muitas espécies, as células perisinusoidais são os principais sítios de estocagem de vitamina A. São lipócitos que, em estado de quiescência, expressam o citoesqueleto de proteína desmina e contêm citoplasma largamente composto por gotículas lipídicas de ésteres de retinol. Elas normalmente são responsáveis pela produção da matriz extracelular, secretando predominantemente colágeno tipo IV, fibronectina, cadeias específicas de laminina e pequenas quantidades de colágenos fibrilares tipo I e III (DAY, 1996; CABALLERO-MENDONZA *et al*, 1999).

Sugere-se que a ativação das células perisinusoidais é mediada, em parte pela alteração na composição dos elementos da matriz extracelular que ocorre durante a lesão do fígado, e por várias citocinas fibrosantes, sendo o fator de crescimento tumoral (TGF- β) e o fator de crescimento plaquetário (PDGF) as principais (BURT, 1993).

Dois outros tipos celulares parecem exercer grande influência no processo fibrogênico, as células endoteliais residentes nos sinusóides, as quais, quando lesadas sintetizariam isoformas de fibronectina que estimulariam a ativação das células estreladas; e também as células de Kupffer, macrófagos residentes, que quando ativados são componentes críticos na cascata da fibrogênese hepática

(ALCOLADO *et al*, 1997). Tem-se sugerido uma estimulação parácrina entre as células de Kupffer e as células estreladas uma vez que, foi observado logo após a ativação das células estreladas a presença de um grande número de células de Kupffer (FRIEDMAN, 1999). Algumas das citocinas fibrosantes têm origem nessas células ativadas e também provêm das plaquetas e da própria matriz.

Estudos imuno-histoquímicos *in vivo* de lesões agudas (indução de zonas de necrose) e crônicas (ligação do ducto biliar do fígado), têm mostrado que expansões de populações de monócitos/macrófagos precedem populações de lipócitos, e ambos os tipos celulares acumulam-se exclusivamente dentro de áreas de necrose (IKEDA *et al*, 1993). Também revelaram a transformação dos lipócitos para células transitórias, após lesões agudas, e para miofibroblastos após as lesões crônicas.

Trabalhos *in vitro* demonstraram que, uma vez ativadas, as células de Kupffer liberam numerosas citocinas/fatores de crescimento, com efeito na ativação e proliferação dos lipócitos (TGF- α e β e TNF α), e na fibrogênese (TGF β) (LOREAL *et al*, 1993; WINWOOD & ARTHUR, 1993).

A célula de Kupffer é provavelmente o centro da resposta do fígado a muitas agressões. Dentre as várias citocinas fibrosantes liberadas por esta célula, o TGF β é a principal. O TGF β é uma citocina multifuncional que tem um papel central em torno da cicatrização e reparo tecidual. Quando um tecido é lesado um processo de reparo se inicia com um grande aumento na secreção do TGF β juntamente com várias proteínas da matriz (ALCOLADO *et al.*, 1997). Essa citocina pode promover o acúmulo da matriz extracelular pela indução de inibidores das metaloproteinases e do ativador do plasminogênio. Além das células parenquimais, outras células também podem produzir o TGF β , as células de infiltrado inflamatório tais como linfócitos, monócitos/macrófagos e plaquetas (BRANTON & JEFFREY, 1999). Outras citocinas como as interleucinas 1 e 4 (IL-1 e IL-4), tem sido implicadas na fibrogênese hepática. Contudo, nenhuma tão consistente como o TGF β . Recentemente um peptídeo vasoativo denominado de endotelina-1 foi observado como estimulador hepático para síntese de colágeno. Segundo os pesquisadores esse peptídeo também promove a ativação e proliferação das células estreladas, contribuindo desta forma para a fibrogênese pelo aumento do número dessas células no fígado (MAHER, 1999).

O acúmulo excessivo do colágeno no fígado no processo fibrogênico envolve além dos macrófagos e células perisinusoidais, a síntese de proteínas específicas, as metaloproteinases e seus inibidores. Esse acúmulo decorre também do fato do

colágeno depositado no meio extracelular, organizado em fibrilas e protofibrilas, estabelecerem ligações dissulfídicas, chamadas de “cross-links”, que resultam em uma maior coesão e resistência dos feixes que vão se formando, tornando as fibras colágenas mais resistentes à ação das collagenases (PEREZ-TAMAYO *et al*, 1987).

A degradação das proteínas da matriz é catalisada por várias famílias de enzimas incluindo as plasminas e as metaloproteinases da matriz (MMP), das quais 23 já foram bem descritas (BRANTON & JEFFREY, 1999).

A família das metaloproteinases que está subdividida em 3 grupos é composta pelas collagenases, que degradam colágeno intersticial, particularmente os tipos I, II, e III; por gelatinases que também degradam colágeno do tipo IV e V, desnaturando o colágeno e a elastina; e a estromelina que degrada as proteínas da membrana basal como o colágeno IV e V e outras proteínas como: gelatina, fibronectina lamininas e proteoglicanos. A atividade extracelular dessas enzimas é regulada por vários mecanismos que incluem desde alterações na transcrição gênica e sínteses proenzimáticas, quanto na inibição específica de formas ativadas por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPS) (BRANTON & JEFFREY, 1999; ARTHUR, 2000).

Algumas evidências correntes indicam que as células estreladas ativadas e as células de Kupffer tenham também um papel central na síntese das metaloproteinases da matriz. Em condições definidas essas células sintetizam collagenase tipo IV/gelatinase (72KDa e 95KDa respectivamente) e possivelmente estromelinas. As células estreladas estariam também contribuindo para a regulação da atividade extracelular dessas enzimas pela secreção de inibidores teciduais de metaloproteinases as alfa 1-antitripsina e alfa 2- macroglobulina. Essas células apresentam, portanto, ambas as habilidades, tanto para degradar, quanto para regular a degradação da matriz no fígado normal e do colágeno intersticial fibrilar depositado durante o processo de fibrose do fígado (ARTHUR, 1994).

As células estreladas são pericitos especiais que têm a propriedade de armazenar vitamina A no fígado. Essas células chegam a comportar até 80% de toda vitamina A do corpo (SATO *et al*. 2003). Diferentemente dos pericitos capilares, estas células estão em contato íntimo com as células endoteliais, não existindo uma membrana basal entre elas, apenas fibras colágenas intersticiais e alguns componentes da membrana basal (BERGERS & SONG, 2005). Atualmente, muitos autores acreditam que a ênfase dada anteriormente à participação dessas células na fibrogênese hepática tenha sido exagerada (RAMADORI, 2004; SANCHO-BRU *et al*. 2005).

Como a vitamina A é lipossolúvel, a gordura associada facilita o isolamento de tais células através de gradientes de separação, permitindo o seu isolamento e cultivo, facilitando assim o seu estudo *in vitro*.

Estudos derivados de observações *in vivo*, sobretudo feitos na esquistossomose murina (FONSECA *et al*, 2005) e humana (ANDRADE *et al*, 1999) e na capilaríase do rato (SOUZA *et al*, 2006) têm chamado a atenção para outros elementos celulares dos espaços porta na fibrogênese hepática.

5.2.1- Aspectos Morfológicos da fibrose hepática

A fibrose no fígado pode ocorrer sob várias designações: a) **Fibrose portal** - onde os espaços porta aparecem ampliados, muito maiores do que se pode esperar, considerando o calibre de seus vasos e ductos. Este tipo de fibrose aparece em vários processos, sobretudo nas hepatites crônicas e na forma hépatoesplênica da esquistossomose (CHEEVER & ANDRADE, 1970). b) **Fibrose septal** – que aparece como finos e longos cordões de tecido fibroso dissecando o parênquima ao longo da zona I do ácino, fazendo geralmente conexão entre espaços porta; entre estes e as veias centrais ou terminando abruptamente no interior do parênquima (septos incompletos) (FERREIRA & ANDRADE, 1993); c) **Fibrose peri-sinusoidal** – que consiste no depósito de colágeno na região para-sinusoidal exibindo um quadro de reforço da trama reticular do fígado, sendo um dos componentes da capilarização dos sinusóides (SOUZA *et al*, 2000). Denota a ativação de um sistema sinusoidal relacionado com a formação da fibrose hepática, e que inclui as células sinusoidais de Kupffer e as células estreladas hepáticas; d) **Fibrose peri-central** - representada pela fibrose que se desenvolve em torno das veias centrais, comuns no alcoolismo crônico; e) **Fibrose difusa** - caso em que a fibrose parece envolver e isolar células hepáticas entre si ou em pequenos grupos, por todo o fígado; f) **Fibrose focal** – que consiste na formação de um pequeno nódulo, densamente colagenizado, resultante da cicatrização de uma lesão focal, geralmente um abscesso ou granuloma.

Como o fígado tem uma enorme capacidade de reserva funcional, a presença de fibrose *per se* não representa a causa direta de insuficiência hepática. Na realidade são as alterações vasculares presentes no interior do tecido fibroso que determinam a insuficiência hepática, bem como a hipertensão portal.

5.2.2- Modelos Experimentais

Os modelos experimentais têm sido propostos a fim de se entender os mecanismos patogênicos da fibrose hepática, contudo é importante ressaltar que nenhum deles reproduz exatamente a fibrose do fígado humano (BHUNCHET & WAKE, 1992; CHOJKIER *et al*, 1988; YOKOI *et al*, 1988; WU & NORTON, 1996). Entretanto têm trazido importantes contribuições para o entendimento do mecanismo celular e molecular implícito no processo. Achados em comum, observados nos modelos experimentais têm sido de grande importância para o entendimento de vários processos patológicos, como exemplo, tem-se o extenso uso de modelos *in vitro* para a investigação das células estreladas do fígado, de onde tem partido a maioria dos dados sobre fibrogênese hepática e o estudo em modelos animais experimentais demonstrando o papel desempenhado pelo TGF- β na fibrogênese do fígado (TSUKAMOTO *et al*, 1990). Os modelos experimentais de indução de fibrose em animais são categorizados de acordo com o fator etiológico como: tóxico, nutricional, alcoólico, genético ou imunológico (TSUKAMOTO *et al*, 1990).

5.2.2- 1. Modelo de indução de fibrose septal por Soro de Porco

A fibrose septal induzida por soro de porco foi descrita inicialmente por PARONETTO & POPPER (1966) quando tentavam a indução de um modelo imunológico de hepatite com a injeção de soros heterólogos em ratos. Consiste em uma fibrose fina, formada após repetidas injeções intraperitoniais de soro de porco (PARONETTO & POPPER, 1966; RUBIN *et al*, 1968). Sabe-se que o elemento do soro que desencadeia o processo está ligado à sua fração albumina. Entretanto tem se demonstrado que a reprodutibilidade é relativamente baixa uma vez que, apenas 40 a 70% dos animais submetidos ao tratamento desenvolvem o quadro fibrótico (SOUZA *et al*, 2000).

Nesse modelo a fibrose parece se iniciar na zona perisinusoidal, onde se acredita que as células estreladas proliferam e secretam o excesso de matriz. As porções do tecido hepático, isoladas pelos septos fibrosos mantêm a estrutura lobular ou acinar normal (RUBIN *et al*, 1968; ANDRADE, 1991).

A via de administração do soro parece ser de grande importância no sucesso da obtenção da fibrose nesse modelo, pois quando se substitui a via peritoneal pela subcutânea a fibrose septal hepática não se forma (ANDRADE & GODOY, 1996).

Apesar da fibrose estar associada à inflamação crônica e contínuas reações de reparo a lesões teciduais (ALCOLADO *et al*, 1997; ANDRADE, 1991), acredita-se que nesse caso trata-se de um modelo onde a fibrose ocorre na ausência de inflamação crônica e necrose, ou seja, uma forma “pura” de se produzir fibrose sem degeneração ou regeneração hépato-celular. Entretanto, NAKANO em 1986, utilizando a microscopia eletrônica, observou danos em vasos e hepatócitos antes do desenvolvimento da fibrose. Uma leve, mas distinta necrose de hepatócitos nos estágios mais recentes levou o autor a sugerir que esta fibrose poderia ser resultante de danos hepáticos causados possivelmente por distúrbios das veias portais.

SHIGA *et al.* (1997) após 16 semanas de inoculações de ratos com o soro de porco, obtiveram um grau de fibrose avançada e uniforme em quase todos os casos e observaram mudanças hepatocelulares tais como necrose, apoptose e proliferação dos ductos biliares freqüentemente. Os autores também observaram abundantes fibras elásticas em áreas de avançada fibrose, presença de células musculares lisas alfa-actina, desmina-positivas e macrófagos ao redor de veias centrolobulares e em septos fibrosos, o que interpretaram como resultado do processo de necrose hépato-celular. Os autores sugeriram que a necrose e a apoptose de hepatócitos observadas nesse trabalho poderiam representar lesões hepatocelulares devido à hipóxia ou ao desenvolvimento secundário de vasos intrahepáticos para o remodelamento, após mudanças hemodinâmicas na circulação intrahepática. Em 1998 eles publicaram que a fibrose nesse modelo se desenvolve ao longo das paredes de vasos neoformados entre as veias centrolobulares vizinhas, sugerindo que um processo de capilarização e venularização de sinusóides paralelo ao desenvolvimento da fibrose, possivelmente ocorre como um processo de adaptação para a manutenção do fluxo sanguíneo para os lóbulos.

Nos trabalhos publicados até o presente, não há referências específicas sobre a participação de elementos vasculares ou de fatores de angiogênese na patogenia da fibrose neste modelo.

5.2.2- 2. Modelo de indução de fibrose septal por *Capillaria hepatica*

A capilaríase em ratos é um excelente modelo para o estudo da patogenia da fibrose considerando-se que a reprodutibilidade dos aspectos morfológicos ocorre em 100% dos animais, e que a mortalidade é mínima ou nula (FERREIRA & ANDRADE, 1993). Este processo de fibrose hepática é muito parecido, morfológica e patogeneticamente, com a do modelo anterior.

O primeiro relato de fibrose septal como manifestação da capilaríase hepática foi feito por FERREIRA & ANDRADE (1993). Esses autores observaram o desenvolvimento de septos fibrosos finos e longos, formando conexões porta-porta, em ratos infectados experimentalmente com ovos embrionados do parasito.

Acreditava-se que, quando as lesões inflamatórias focais de origem parasitária direta mostravam evidências de involução, começavam a aparecer os septos fibrosos em torno das lesões parasitárias focais e ao mesmo tempo, em várias outras áreas do fígado, sem aparente continuidade direta com as lesões parasitárias. Pouco a pouco todo o fígado vem a ficar septado pelos tratos fibrosos, que tendem a delimitar porções, por vezes nodulares (SOUZA *et al*, 2000).

Ratos infectados com esse helminto, regularmente desenvolvem fibrose septal em um pequeno espaço de tempo. Atualmente sabe-se que a formação da fibrose septal inicia-se após aproximadamente 17-20 dias de infecção tornando-se mais evidente após os 30 dias. Aparentemente essa fibrose não tem uma relação direta com as lesões causadas pelo parasito porque aparecem em áreas bem distantes dos nódulos parasitários (FERREIRA & ANDRADE, 1993), levando a crer que esta tenha uma base imunológica (LEMOS *et al*, 2002).

A *C. hepatica* é um nematódeo que parasita várias espécies de mamíferos, sendo que os roedores assumem um importante papel, por se constituírem no principal reservatório natural da *Capillaria*. Esse parasito apresenta uma distribuição geográfica cosmopolita, já tendo sido encontrado em todas as regiões do mundo de climas e condições ambientais diversos (FERREIRA & ANDRADE, 1993).

A infecção por *C. hepatica* se dá pela ingestão pelo hospedeiro de ovos embrionados, que vão eclodir ao nível do ceco. As larvas liberadas desses ovos migram pelo sistema porta para o fígado onde se desenvolvem até a fase adulta, 15 dias pós-infecção. Após 20 dias, as fêmeas liberam os ovos que vão permanecer no parênquima hepático até a morte do hospedeiro. Quando o animal ingere ovos de

Capillaria não embrionados, esses são transportados via sistema digestório, sendo eliminados nas fezes, caracterizando assim a infecção espúria (GALVÃO, 1976).

São raros os casos de infecção humana por *C. hepatica*, sendo até o momento registrado, apenas 40 casos, quatro dos quais no Brasil (PIAZZA *et al*, 1963; SAWAMURA *et al*, 1998; JUNKER-VOSS *et al*, 2000). Contudo, suspeita-se que a frequência de seres humanos infectados seja muito maior devido à alta prevalência de ratos infectados encontrados em muitas regiões, aliado ao fato de grande número destes roedores serem encontrados nos locais onde habitam as pessoas das camadas mais desfavorecidas da nossa sociedade, onde as condições de higiene também são precárias. Além disso, existe uma grande dificuldade em se diagnosticar a infecção no homem, tendo em vista que o ciclo de vida do parasito no mesmo ocorre sem a liberação dos ovos nas fezes.

NASCIMENTO (1986) sugeriu que o homem apresenta uma resistência natural a essa doença, tendo em vista que os casos de contaminação relatados na espécie humana ocorreram durante períodos de queda de imunidade. Ressaltou ainda o fato de que quase todos os casos graves ocorreram em crianças com menos de cinco anos de idade vivendo em péssimas condições sócio-econômicas ou em pacientes com algumas condições patológicas concomitantes.

As lesões produzidas pela infecção por *C. hepatica* em humanos estão presentes em pleno parênquima hepático, podendo ser descritas como reações granulomatosas em torno de ovos e fragmentos de vermes, acompanhadas de infiltrado inflamatório constituído por: eosinófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos e por vezes, células gigantes do tipo corpo estranho seguindo-se a fibrose.

Não existe ainda tratamento específico para esta parasitose e o método único para diagnóstico é a ultra-sonografia, seguida de biópsia hepática, sendo muitas vezes necessário utilizar a laparotomia ou laparoscopia devido aos ovos se concentrarem em focos, podendo não ser alcançados pela biópsia de agulha. Contudo, GALVÃO (1976) sugeriu a possibilidade de diagnóstico destes casos através de testes imunológicos, após resultados positivos dos testes pela imunofluorescência, em cortes em parafina de material de necrópsia humana que mostravam uma área de necrose no fígado circundada por um halo de fibrose. Os cortes foram tratados com soro de camundongos infectados pela *C. hepatica*.

SOUZA *et al*. (2006) observaram que na fibrose induzida pela *C. hepatica* ocorria uma proeminente proliferação de vasos antes mesmo da formação dos septos fibrosos. Os autores sugeriram que esses vasos neoformados precedendo o

depósito de colágeno, poderiam estar contribuindo para o desenvolvimento do processo fibroso.

5.2.2-3. Modelo de indução de fibrose septal por Tetracloreto de Carbono (CCl₄)

O modelo de fibrose induzida pelo Tetracloreto de Carbono (CCl₄) é dos mais estudados. Resulta de uma lesão química que induz fibrose e cirrose hepática, representando um protótipo de lesão tóxica que é compartilhado por muitos compostos químicos semelhantes (ROBBINS & CONTRAN, 1983). O CCl₄ é responsável por causar necrose de hepatócitos nas áreas centro-lobulares levando ao desenvolvimento da fibrose (ROSA *et al*, 1991; MARTINEZ-HERNANDES, 1985). Foi inicialmente usado por Simpson (1849) como anestésico, mas logo foi descartado devido à sua toxicidade. Hoje é largamente empregado na indústria química como reagente e solvente (HALL, 1916).

Sabe-se que a hepatotoxicidade do tetracloreto de carbono se dá pela conversão do mesmo para um metabólito altamente reativo e tóxico o radical triclorometil, o CCl₃, o qual é ativado por um sistema de oxidase de função mista - citocromo P-450, que está presente no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos e de outras células (GOLBEY *et al*, 1994). O tetracloreto tem sido utilizado para induzir lesões agudas em fígado de animais de laboratório, especialmente em espécies de roedores (KANTA *et al*, 1992). Myren (1989) demonstrou que injeções subcutâneas de CCl₄ em camundongos são seguidas por uma extensa necrose centrolobular, com diminuição da atividade enzimática oxidativa em 24 horas. Contudo apesar de ser o modelo de hepatotoxicidade mais estudado, não reproduz uma resposta necrogênica em todas as espécies (PEREZ-TAMAYO *et al*, 1987).

Em ratos, as lesões hepatocelulares inicialmente se manifestam por alterações do metabolismo lipídico, tornando-se evidentes dentro de 30 minutos após a administração intragástrica de CCl₄, levando a um desencadeamento de distúrbios patológicos hepáticos como: alterações bioquímicas e estruturais do retículo endoplasmático liso, atividade reduzida das enzimas dos microsomas e síntese diminuída das proteínas hepáticas, as quais tornam-se evidentes nas primeiras horas de intoxicação. No intervalo de 2 a 4 horas ocorre o aumento de cálcio nas mitocôndrias, alterações eletrolíticas, aumento do volume dos hepatócitos e uma seqüência de distúrbios como: depleção do glicogênio hepático, ruptura dos

lisossomos e perda de enzimas intracelulares. Com 24 horas, as lesões mais extensas são evidenciadas e caracterizadas por lesão mitocondrial e intensa necrose centrolobular (SHI *et al*, 1998).

PROCTOR & CHATAMARA (1983) utilizaram o CCl₄ para criarem um dos métodos mais interessantes, simples e bem padronizado de produção controlada de cirrose em ratos. Administrando o CCl₄ por via digestiva e ajustando a dose de acordo com o peso do animal, esses investigadores conseguiram induzir cirrose micronodular até a fase descompensada com uma baixa taxa de mortalidade. Posteriormente ROSA *et al*. (1991) estabeleceram os níveis críticos de variação de peso, acima ou abaixo do qual as dose de CCl₄ seriam modificadas.

Segundo MCGREE & PATRICK (1972) com uma única dose de CCl₄, a taxa de síntese de componentes do tecido conjuntivo pode aumentar de 4 a 8 vezes demonstrando que se trata de um bom modelo para a identificação das células sinusoidais que possuem atividade fibrogênica.

Recentemente, tem sido demonstrado que as células estreladas hepáticas (CEHs) podem expressar VEGF e receptores para VEGF no fígado após intoxicação com CCl₄ *in vitro* (ISHIKAWA *et al*, 1999; ANKOMA-SEY *et al*, 2000).

A cirrose hepática é caracterizada pela coexistência de necrose, regeneração nodular e septos fibróticos, que levam à insuficiência hepática progressiva e irreversível. Apesar das extensas investigações funcionais e morfológicas, os mecanismos responsáveis pela falha progressiva do fígado cirrótico são ainda debatidos (MACSWEEN *et al*, 1987; SCHIFF & SCHIFF, 1993). Alguns autores acreditam que a insuficiência hepática na cirrose é causada pelo desarranjo da estrutura hepática (VAUBOURDOLLE *et al*, 1989; MARTINEZ-HERNANDEZ & MARTINEZ, 1991). Sendo assim, o papel principal pode ser atribuído às alterações patológicas da microvasculatura. SCHAFFNER & POPPER (1963), descreveram a presença de uma membrana basal nos sinusóides do fígado cirrótico, sendo esse fenômeno conhecido como capilarização dos sinusóides hepáticos. Subseqüentemente outros trabalhos sugeriram que a modificação dos sinusóides pode contribuir para impedir a troca de nutrientes entre os hepatócitos e o sangue que perfunde o fígado (MARTINEZ-HERNANDEZ, 1984 e 1985).

Estudo realizado em nosso Laboratório permitiu verificar que durante todo o processo de instalação da fibrose hepática e evolução da mesma para cirrose causada pela administração intragástrica de CCl₄ em ratos, ocorre uma grande produção de vasos que tendem a circunscrever os nódulos fibróticos recém

formados. Quando realizadas técnicas de imunofluorescência indireta em secções hepáticas representativas das fases iniciais da intoxicação, conseguiu demonstrar a expressão de laminina e colágeno IV nos septos nodulares. Após a suspensão do tratamento, quando ocorre clara redução do teor de colágeno, comprovada microscópica e bioquimicamente, ainda se conseguiu demonstrar a expressão de vasos nos septos o que atesta que, pelo menos parte das alterações microvasculares, permanece inalterada após a regressão parcial da fibrose.

5.2.2- 4. Modelo de indução de fibrose pela ligadura do Colédoco

O modelo de fibrose hepática induzida por ligadura do ducto biliar representa um modelo experimental da cirrose biliar humana (GRESSNER, 1991; BURT, 1993; FRIEDMAN, 1993). A obstrução biliar extra-hepática por ligadura e secção do colédoco em ratos é o modelo favorito para observação da colestase extra-hepática. O colédoco, também conhecido por ducto biliar extra-hepático, recebe a bile secretada no fígado e canaliza para o duodeno. A ligadura desse canal leva ao aparecimento da colestase, ou seja, estase biliar por diminuição ou ausência de fluxo pelas vias biliares, levando aos sintomas característicos como a icterícia e algumas alterações patológicas (ORELLANA *et al*, 1999).

VIRCHOW (1857) relatou pela primeira vez uma possível relação entre lesão do ducto biliar principal e cirrose no fígado, o que foi comprovado mais tarde com os trabalhos de LEGG (1873) e OGATA (1913).

CARLSON *et al*, (1977) demonstraram que a ligadura do ducto biliar resultava no aumento imediato da pressão intraductular seguida de um aumento significativo da velocidade de síntese de colágeno e da ativação da prolil hidroxilase. Após 2 semanas, período quando os níveis dessa enzima estavam bastante elevados, a resposta fibro-proliferativa então se acentuava.

As alterações histológicas mais comuns observadas em muitos animais após a obstrução biliar é a dilatação do ducto biliar, proliferação ductular, necrose de células hepáticas, severa inflamação e fibrose portal e lobular (POPPER, 1977; KOEPEL *et a*, 1997; ORELLANA *et al*, 1999).

Variado grau de fibrose hepática é observada na obstrução biliar extra-hepática, mais precisamente em áreas portais, em torno de hepatócitos e de ductus biliares proliferados (DESMET, 1995).

A necrose celular hepática tem sido indicada como uma das mais frequentes alterações na obstrução ductular, iniciando poucas horas após o processo. Acreditava-se que a necrose ocorria devido à ação tóxica da bile. Atualmente sabe-se que se dá em decorrência da ação tóxica de substâncias derivadas da estase biliar; mecânica e da elevação da pressão no sistema biliar.

Segundo KOEPEL *et al.* (1997) o déficit na perfusão microvascular e aumento da infiltração leucocitária observadas 3 a 7 dias pós-ligadura do colédoco, poderia representar uma fonte em potencial de lesão hepática durante a obstrução biliar. Os neutrófilos antes de migrarem para os tecidos aderem às células endoteliais dos sinusóides podendo contribuir para lesões teciduais pela liberação de citocinas inflamatórias e radicais tóxicos de oxigênio e promover lesões de células endoteliais contribuindo para os distúrbios microcirculatórios nos sinusóides hepáticos.

Apesar da atenção que tem sido dada às células estreladas hepáticas, como as principais produtoras das proteínas de matriz extracelular, no modelo de ligadura de ducto biliar, outras células mesenquimais podem estar envolvidas nos estágios recentes de desenvolvimento da fibrose. Os fibroblastos intersticiais, incluindo as chamadas células da segunda camada encontradas nas proximidades imediatas das paredes das veias centrais e da cápsula do fígado, e fibroblastos do trato portal, têm sido identificados como potencialmente fibrogênicos como demonstrado em estudos de fibrose hepática induzida em animais por ligadura do ducto biliar (ABDEL-AZIZ *et al.*, 1991; BHUNCHET & WAKE, 1992; MIYAZAKI *et al.*, 1993). Os achados de TUCHWEBER *et al.* (1996) indicam que nas fases recentes da ligadura do ducto biliar existe uma marcante proliferação das células epiteliais, associadas com a proliferação dos fibroblastos periductulares portais que rapidamente expressam alfa actina de músculo liso (α -SM). Acrescenta-se ainda, que esta população fibroblástica pode ter um papel dominante no início da fibrose portal após a ligadura.

5.2.2- 5. Modelo de Indução da fibrose pela infecção por *S. mansoni*

A fibrose periportal hepática representa uma característica das lesões patológicas na forma hepato-esplênica na esquistossomose humana e consiste na fibrose portal ampliando e inter-conectando os espaços porta. Ela foi inicialmente descrita por SYMMERS (1904) que a denominou de fibrose *pipestem*, por uma comparação que ele fez com um fígado que tivesse sido atravessado por inúmeros cabos de

cachimbos de porcelana e depois fosse examinado na sua superfície de secção (*clay-pipe stem cirrhosis*).

Na fibrose *pipestem*, apesar do fígado apresentar inflamação portal, granulomas periovulares, obstrução vascular devido à deposição maciça de ovos e expansão do espaço porta pela fibrose com total ou parcial destruição dos ramos da veia portal, o parênquima hepático mostra uma arquitetura normal (BOGLIOLO, 1957). A estrutura do ducto biliar e os ramos da artéria hepática também se mantêm preservados.

Alguns modelos têm sido usados para reprodução dessa patologia. O modelo experimental utilizando babuínos tem demonstrado sucesso devido à semelhança anatômica, genética e imunológica à doença humana. Contudo os custos com a aquisição e manutenção desses animais tornam o modelo inviável (NYINDO & FARAH, 1999). Um outro modelo usando chimpanzés infectados com *S. mansoni* também tem sido utilizado para reproduzir experimentalmente a fibrose, entretanto esta não ocorre por hipertensão portal como em humanos (SADUN *et al*, 1970).

Granulomas periovulares e a fibrose periportal que se formam no fígado de camundongos infectados pelo *S. mansoni* têm se constituído em um modelo importante para o estudo da patogenia da fibrose e da sua degradação. Os ovos chegam continuamente ao fígado e, desta maneira, lesões em diferentes etapas de evolução podem ser estudadas.

Camundongos infectados com *S. mansoni* desenvolvem fibrose portal devido ao acúmulo de ovos na área periportal, semelhante à fibrose *pipestem* observada em pacientes humanos (ANDRADE & CHEEVER, 1993; ANDRADE, 1987).

A maciça infecção em camundongos produz uma hipertensão portal, relacionada ao número e tamanho dos granulomas, os quais provavelmente não são relevantes para o mecanismo de hipertensão portal em humanos (CHEVEER, 1969). Contudo camundongos também partilham das lesões obstrutivas venosas portais aparentemente responsáveis pela hipertensão portal em humanos.

Este modelo foi descrito inicialmente por WARREN (1966) e confirmado mais tarde por ANDRADE (1987). Atualmente tem sido um dos modelos mais utilizados para o estudo experimental da fibrose hepática não só por reproduzir em vários aspectos a doença humana, mas também por apresentar um baixo custo, uma vez que os reagentes para camundongos encontram-se mais disponíveis no mercado e a facilidade de manipulação dispensa maiores cuidados. O modelo tem similaridades e diferenças com a fibrose *pipestem* humana. Contudo, pelo desenvolvimento da

fibrose e distribuição preferencial dos ovos no espaço periportal, o modelo reproduz os principais aspectos desse tipo de fibrose (ANDRADE *et al*, 1998).

Para se obter uma fibrose sistematizada em camundongos infectados com *S. mansoni* é fundamental que a infecção seja leve e acompanhada por mais de 16 semanas, que é o período de estabelecimento da fibrose, período crônico da doença. Infecções pesadas (150 cercárias), geralmente não reproduzem o modelo, podendo levar a ocorrência de uma distorção da vascularização portal até a morte do hospedeiro antes da fibrose poder se desenvolver (ANDRADE & CHEEVER, 1993).

ANDRADE & WARREN (1964), observando a evolução do granuloma hepático em torno dos ovos maduros de *S. mansoni* no modelo murino, verificaram que a intensidade da resposta inflamatória vai reduzindo com o progresso da infecção. Os ovos que são depositados mais tarde sofrem uma reação menos intensa, os granulomas são mais delimitados, com muitos macrófagos e proliferação fibroblástica e ocorre a diminuição do número de eosinófilos, caracterizando o processo imunomodulatório.

Acredita-se que as lesões hepáticas graves na esquistossomose não dependem só dos ovos, mas de uma série de fatores, culminando em alterações vasculares, proliferação de miofibroblastos e a produção de quantidades excessivas de matriz extracelular (GRIMAUD & BOROJEVIC, 1977; 1986).

Segundo AL ADMANI (1985), na fase inicial da infecção, os granulomas esquistossomóticos humanos contém principalmente fibronectina. Na fase intermediária além da fibronectina encontra-se também o colágeno tipo III. Na fase crônica o colágeno tipo I predomina. Técnicas imuno-histoquímicas demonstraram que na matriz do granuloma hepático esquistossomótico murino, em estágios recentes da infecção encontra-se grande quantidade de colágeno tipo III e pouco tipo I. A laminina e o colágeno tipo IV são encontrados somente em vasos neoformados na periferia do granuloma (WU *et al*, 1982).

Como a fibronectina é encontrada abundantemente durante o estágio mais ativo do granuloma, sugeriu-se que a mesma poderia servir como marcador para o estágio do granuloma (AL ADMANI, 1985).

O tecido elástico é achado em abundância em lesões fibróticas hepáticas associadas apenas com a esquistossomose hépato-esplênica em humanos. Observa-se uma hiperplasia elástica formando uma matriz compacta no espaço porta alargado e ao longo dos finos e longos septos radiados do espaço porta.

Contudo, em camundongos, as fibras elásticas estão praticamente ausentes da periferia do granuloma periovular e da fibrose portal (ANDRADE & GRIMAUD, 1986; ANDRADE & FREITAS, 1991), sendo observada apenas dentro do granuloma, provavelmente oriunda da parede de vasos destruídos.

ANDRADE & BRITO (1981), usando moldes plásticos da veia portal mostraram numerosos vasos colaterais brotando dos ramos da veia porta intra-hepática dos camundongos cronicamente infectados com *S. mansoni*, o que explicaria a curiosa distribuição dos ovos ao longo dos espaços periportais. Esta mudança vascular permite que os ovos sejam distribuídos ao longo do tecido periportal por pequenos vasos (Andrade, 1987).

LOEFFLER *et al.* (2002) demonstraram em seus estudos *in vitro*, que antígeno solúvel de ovos de *S. mansoni* tem a capacidade de indução da expressão do fator de crescimento endotelial (VEGF) em células endoteliais humanas, sugerindo que esta proteína pode ter um importante papel na indução da angiogênese no granuloma esquistossomótico. Outros fatores têm sido citados na angiogênese do granuloma como as alterações nas condições do microambiente como a hipóxia, o pH ácido, e baixa concentração de glicose que podem induzir a neovascularização, em parte também pelo aumento de VEGF.

SILVA *et al.* (2006) demonstraram através de moldes plásticos do sistema de veias portais de camundongos Swiss webster e BALB-c infectados com *S. mansoni*, que camundongos com fibrose periportal apresentam marcantes mudanças vasculares não observadas em camundongos com apenas lesões granulomatosas isoladas, sugerindo que a interação entre os ovos e as mudanças vasculares portais são fatores importantes para o desenvolvimento da fibrose *pipestem*. A fibrose periportal é acompanhada por um processo de neovascularização evidente, demonstrado através de marcações imunohistoquímicas contra colágeno tipo IV e laminina, marcadores de membrana basal vascular. Brotamento de vasos colaterais do principal ramo portal, amputação da ramificação periférica e distorções dos ramos médios e pequenos foram observados. Essa proliferação vascular tem sido interpretada como uma possível resposta do organismo a hipóxia causada pela obstrução dos vasos portais pelos ovos de *S. mansoni*, na tentativa de manter o equilíbrio da microcirculação hepática.

6- MATERIAIS E MÉTODOS

6.1- Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss Webster para o modelo de indução de fibrose por infecção com *S. mansoni* e ratos da linhagem Wistar (*Mammalia Rodentia, Muridae, Rattus Norvegicus Albinus*) para compor os outros quatro grupos experimentais. Os animais foram mantidos no Biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/FIOCRUZ sob dieta e água padrão *ad libitum* e tratados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ).

6.2- Grupos Experimentais

Foram organizados os grupos experimentais de acordo com os métodos propostos nos objetivos para estudo de diferentes modelos de fibrogênese e papel da angiogênese.

6.2.1-Grupo Experimental com Esquistossomose murina Vinte camundongos foram infectados com 50 cercárias do *S. mansoni* por via transcutânea. Após 35 dias de infecção, e a confirmação pelo exame de fezes da positividade dos animais para a infecção, procedeu-se a eutanásia de dois animais experimentais e um controle, a cada cinco dias.

6.2.2- Grupo Experimental com *Capillaria hepatica* Dez ratos Wistar, de ambos os sexos, pesando entre 150-200g foram infectados por via gástrica por meio de entubação com agulha de ponta romba com 800 ovos embrionados de *C. hepatica*. Dois animais experimentais e um controle foram submetidos à eutanásia com 20, 30, 40 e 50 dias após infecção.

6.2.3- Grupo Experimental com Soro de Porco Dez ratos Wistar adultos, de ambos os sexos, com peso variando entre 200-250g receberam duas injeções intraperitoneais de soro de porco (1ml) semanais, até perfazerem 32 injeções (16 semanas). O animal controle foi injetado com 1 ml de salina. No dia seguinte após a última dose do soro procedeu-se a eutanásia.

6.2.4- Grupo Experimental com CCl₄ Dez ratos Wistar machos pesando entre 150-200g foram submetidos à administração gástrica de 0,5ml da solução de CCl₄ a 8 % em óleo mineral, por meio de entubação com agulha de ponta romba, duas vezes por semana. Após completarem 12 semanas de tratamento foram submetidos à eutanásia.

6.2.5- Grupo Experimental com ligadura do colédoco Dez ratos Wistar, de ambos os sexos, pesando entre 250-300g foram submetidos à ligadura do colédoco. Uma laparotomia com uma incisão longitudinal da pele na linha mediana, desde o apêndice xifóide até a cicatriz umbilical, expôs os órgãos abdominais. O duodeno foi retraído permitindo a identificação do ducto biliar. Após a identificação do ducto duas ligaduras foram realizadas e uma ressecção da porção comum entre as duas ligaduras foi feita para a interrupção total do fluxo. Após 4, 7, 14, 30 e 40 dias da ligadura dois animais foram submetidos a eutanásia em cada ponto.

6.3- Anestesia

Como anestésico foi usado uma mistura de ketamina (2,5ml), xilasina (0,5ml) e salina (1ml) administrada 0,2 ml/100g de peso.

6.4-Eutanásia

Para a eutanásia foram usadas doses letais da mistura do anestésico descrito acima. Após a eutanásia foram removidos fragmentos de fígado para criopreservação e preservação em formol para realização de técnicas histológicas e de imuno-histoquímica.

6.5-Histopatologia

Fragmentos de fígado fixados em formol Millonig (pH 7.4), foram incluídos em parafina e cortados em micrótomo. Secções de 5µm de espessura foram coradas pelos métodos de Hematoxilina-Eosina, picrossírius vermelho para fibras colágenas contrastado com verde luz e orceína para fibras elásticas. As secções foram examinadas em microscópio óptico.

5.6-Imuno-histoquímica

5.6.1-Imuno-fluorescência

Fragmentos de tecido hepático foram imediatamente criopreservados em nitrogênio líquido e estocados em freezer a -70°C . Posteriormente foram realizadas secções de aproximadamente 5 micra de espessura em um criostato a -20°C . As secções obtidas foram posteriormente fixadas em acetona gelada por cinco minutos e acondicionadas em freezer; em seguida hidratadas com PBS (pH7,4) por cinco minutos. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com leite em pó Mólico, diluído a 10% em PBS pH 7,4, sendo realizada posteriormente a marcação com os seguintes anticorpos primários: Colágeno tipo IV (1:20), fibronectina (1:25) e laminina (1:100) a 37°C por 30' em câmara úmida. Os anticorpos para colágeno IV (Ref. 20451, Lot. 240), laminina (Ref. 24851, Lot. 188) e fibronectina (Ref.24911, lot. 194) foram produzidos em coelho no Instituto Pasteur em Lyon (França) e cedido pelo Dr. Jean Aléxis-Grimaud. Após a marcação com os anticorpos primários as lâminas foram lavadas com PBS pH 7,4, e adicionado o anticorpo secundário anti IgG de coelho (SIGMA,USA) conjugado com isocianato de fluoresceína, diluído em PBS (1:20) e azul de Evans, sendo as lâminas acondicionadas em câmara úmida a 37°C por 30'. Os cortes marcados foram examinados em microscópio Zeiss, Axioskop, com epiiluminação provida de lâmpada HBO de vapor de mercúrio potência 50w, com filtro de barreira e excitador apropriados para fluorescência.

5.6.2- Imuno-peroxidase

Para a imuno-peroxidase foram usados fragmentos de fígado criopreservados, para marcação do fator de Von Willebrand (fator VIII - Santa Cruz biotechnology, Sc-14014) e VEGF (Santa Cruz biotechnology, Sc-152), e fixados em formol para a marcação de alfa-actina de músculo liso (α -SM-Dako, Clone 1A4, Lot. M0851).

Para criopreservação os fragmentos de tecido hepático foram mergulhados em Tissue-teck (OCT compound-Miles Inc. Diagnostic Division, Elkhart, USA), imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer a -70°C até o momento do uso.

Foram obtidas secções de $5\mu\text{m}$ de espessura dos fragmentos de fígado criopreservados e parafinados que foram montadas em lâminas tratadas com Poly-L-Lisine a 10% (SIGMA ST.Louis, Mo. USA).

As secções obtidas dos fragmentos de fígado criopreservados foram fixadas em acetona por 5 minutos e conservadas no freezer a -20°C. No dia seguinte, foram retiradas do freezer e deixadas à temperatura ambiente por 1 hora para estabilizar. Após a hidratação com PBS por 5 minutos foi feito o bloqueio da peroxidase endógena usando o bloqueador de peroxidase endógena (DAKO Envision Sistem) 2 vezes por 10 minutos. Os cortes foram lavados em água destilada e hidratados com PBS/BSA 2 vezes de 5 minutos cada. Em seguida foi feita a inibição das ligações inespecíficas usando leite desnatado a 10% em PBS, por 20 minutos, à temperatura ambiente. As secções então foram incubadas em câmara úmida com o anticorpo primário produzido em coelho, diluído com a solução do Kit DAKO (VEGF 1:100 e Fator VIII 1:50) e deixadas na geladeira (4°C) overnight. No dia seguinte após equilibrar a temperatura por 1 hora, as secções foram lavadas com PBS por 3 vezes de 5 minutos cada e colocado o anticorpo secundário produzido em cabra, anti-camundongo e anti-coelho conjugado à peroxidase (Kit DAKO Envision Sistem-Labelled polymer). Após 30 minutos o material foi lavado com PBS por 3 vezes de 5 minutos e procedeu-se a revelação também feita com o Kit da DAKO. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina.

Para a marcação de alfa-actina de músculo liso (α -SM) foi usado um anticorpo monoclonal anti-alfa actina humano produzido em camundongos (Dako, Clone 1A4, Lot. M0851) seguindo o mesmo protocolo anterior, contudo as lâminas antes passaram pelo processo de desparafinização e a recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato pH 6,0 em banho – maria por trinta minutos.

7-RESULTADOS

7.1 Generalidades

A fibrose hepática foi reproduzida em todos os cinco modelos de indução propostos nesse trabalho. O início do processo pôde ser observado com a histologia para picrossírius-vermelho, específica para fibras colágenas, as quais se mostram coradas em vermelho em contraste com o parênquima em verde (PRANCHA 2-A). As imunomarcações para os elementos da membrana basal vascular, colágeno IV e laminina, revelaram marcante angiogênese, aparentemente precedendo o processo de depósito do colágeno em todos os modelos estudados, portanto independentemente do agente etiológico. Nos modelos de indução de fibrose com

os parasitos *S. mansoni* e *C. hepatica*, a angiogênese se mostrou ainda mais proeminente, sendo observada até mesmo com a coloração de rotina, como a H&E. Em todos os modelos estudados, até mesmo naqueles onde as alterações hepáticas são mais características de áreas centrolobulares, como no modelo do CCl₄, pode-se observar a ocorrência da fibrose nos espaços-porta.

7.2 Modelos

7.2.1 Grupo Experimental com Esquistossomose murina

Como os camundongos só passaram a liberar os ovos do parasito nas fezes após 35 dias de infecção, os sacrifícios foram realizados após esse período, dois animais a cada cinco dias. Todos os vinte camundongos infectados desenvolveram fibrose hepática. Os dois primeiros animais, sacrificados com aproximadamente cinco semanas de infecção, já apresentavam uma grande quantidade de reações granulomatosas ao redor de ovos íntegros ou em degradação. Nesse período, como os granulomas se desenvolviam em pequenos espaços-porta, dava a impressão de estarem distribuídos isoladamente no interior do parênquima. A expansão dos espaços-porta, em consequência da concentração dos granulomas periovulares, foi observada nas secções do fígado dos animais sacrificados mais tardiamente, caracterizando a fibrose de tipo “pipestem”. Tanto a fibrose focal granulomatosa, quanto à fibrose periportal característica da esquistossomose humana avançada foram observadas com a coloração de H&E (PRANCHA 1-A) e com o picosírius-vermelho para fibras colágenas.

O grande depósito de colágeno alargando o espaço periportal na fase mais avançada também foi marcante quando usado o anti-colágeno IV. As reações de imuno-fluorescências para o colágeno IV e para laminina (elementos da membrana basal vascular) demonstraram bem a proliferação vascular nos espaços porta e nos granulomas periovulares isolados (PRANCHA 1-B).

Os granulomas mais recentes, identificados pela presença de ovos íntegros no seu interior, apresentaram uma maior quantidade de células inflamatórias mononucleares e alguns polimorfonucleares eosinófilos, os quais formavam um grande halo ao seu redor, sendo que os vasos se mostravam distribuídos de maneira mais uniforme (PRANCHA 1-C). À medida que os granulomas iam se tornando mais fibrosos, maduros, a população celular aparecia mais reduzida e os vasos passavam a se concentrar mais na periferia.

A disposição dos vasos nos granulomas foi demonstrada também com a marcação para fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (PRANCHA 1-D) e fator VIII de células endoteliais (PRANCHA 1-E), que acompanhou a cinética descrita acima, confirmando a rica vascularização dos espaços porta e dos granulomas periovulares esquistosomóticos.

Muitas células actina-positivas foram identificadas ocupando os espaços porta e o derredor dos granulomas.

A marcação para fibras elásticas pela coloração por orceína demonstrou apenas os vasos centrais e espaços-porta, semelhantemente ao grupo controle.

A presença de fibronectina foi observada no interstício das lesões em correlação com o grau de inflamação presente, mas sem outras características especiais (PRANCHA 1-F).

7.2.2 Grupo Experimental com *Capillaria hepatica*

Comparando com os outros modelos estudados, a Capilariase em ratos foi o modelo mais constante e regular de indução de fibrose, onde 100% dos animais infectados desenvolveram a fibrose hepática uniformemente.

Os animais sacrificados após o 20º dias de infecção apresentaram lesões focais representadas por uma intensa reação inflamatória granulomatosa com predominância de células mononucleares, rodeando vermes e ovos imaturos e isolando esse material do resto do parênquima, o qual aparentemente manteve a estrutura normal. A formação dos septos fibrosos, também iniciando a partir dos espaços porta foi observada mesmo na coloração por H&E, septos estes que não mostravam sinais de continuidade imediata com as lesões focais diretamente causadas pelos parasitos.

A presença e disposição das fibras colágenas nas lesões focais e na formação dos septos nos espaços portais foram observadas nas lâminas coradas com o picosírius-vermelho (PRANCHA 2-A).

A proliferação vascular, nos espaços-porta e nos septos, foi revelada pelas marcações da membrana basal vascular para colágeno IV e com laminina (PRANCHA 2-B e C). Seguindo o mesmo padrão de distribuição, as imunomarcações para Fator VIII e VEGF, revelaram a presença de células reativas no espaço porta e dentro dos septos fibrosos ainda em formação (PRANCHA 2-E e

F). A fibronectina de matriz extracelular foi bem evidenciada nos septos e na periferia das reações inflamatórias parasitárias focais.

No fígado dos animais sacrificados após 30 dias de infecção os septos fibrosos se estendiam por todo o parênquima, ligando espaços porta a espaços porta e eventualmente, às veias centrais, dando um aspecto trabecular ao fígado. As lesões focais apresentaram-se com uma cápsula fibrosa mais espessa, em torno de restos de vermes, vermes íntegros, e ovos. O parênquima manteve a arquitetura normal. Nos espaços porta se observava um discreto infiltrado inflamatório. Os vasos apareciam em toda a extensão do septo fibroso. Células α -actina-positivas foram observadas ao longo dos septos e rodeando as lesões inflamatórias focais (PRANCHA 2-D). As células positivas para fator VIII e VEGF apareciam formando um halo ao redor dos nódulos fibrosos.

Aos 40 e 50 dias pós-infecção o quadro histológico não diferia muito do que foi observado aos 30 dias. Alguns vermes exibiam necrose de coagulação já com início de calcificação.

A orceína marcou apenas fibras elásticas dos vasos portais e veia central.

7.2.3 Grupo Experimental com Soro de Porco

Dos ratos inoculados com o soro de porco, apenas 40% dos animais desenvolveram uma fibrose septal fina e disseminada. A coloração do picrossírius-vermelho demonstrou o depósito de colágeno, iniciando a formação dos septos fibrosos a partir do espaço porta (PRANCHA 3-A).

A fibrose se mostrou como septos finos e longos partindo do espaço porta e se irradiando por todo o parênquima. Os septos conectavam os espaços porta e raramente as veias centrais formando uma teia que delimitava por vezes porções nodulares do parênquima, simulando um fígado cirrótico. Não se observou necrose celular precedendo a fibrose, e os espaços-portais mostraram um leve infiltrado inflamatório crônico.

As imunomarcações para colágeno IV (PRANCHA 3-B) e laminina (PRANCHA 3-C) demonstraram a proliferação vascular iniciando-se no espaço porta e a aparente migração desses vasos formando os septos. Células actina-positivas foram marcadas especificamente ao redor dos vasos (PRANCHA 3-D).

Células positivas para Fator VIII e VEGF delimitaram bem os septos fibrosos confirmando a forte vascularização dos septos (PRANCHA 3-E e F).

7.2.4 Grupo Experimental com CCl₄

Apesar da taxa de mortalidade de aproximadamente 15%, o modelo utilizado correspondeu às expectativas na indução da fibrose hepática. Apesar de todos os animais terem sido sacrificados após 12 semanas de inoculação, o modelo permitiu avaliar a fibrose em vários estágios de desenvolvimento uma vez que, a reprodutibilidade da fibrose não ocorre de maneira uniforme entre os animais. O fígado dos animais tratados apresentou desde fibrose em estágio inicial até cirrose dentro do período do experimento.

No momento do sacrifício, todos os animais apresentaram o fígado com aspecto macroscópico enrijecido e rugoso. No estudo histopatológico as marcações para picosírius-vermelho revelaram grau variado de fibrose entre eles. Nas secções dos fígados dos animais em estágio inicial da fibrose foram observados discreto infiltrado inflamatório e início da formação de septos finos partindo tanto de regiões centrolobulares, quanto do espaço porta. Também uma intensa esteatose nos hepatócitos foi observada (PRANCHA 4-A). Nos casos considerados intermediários, os septos finos já tomavam grande parte do parênquima ligando espaços porta e veias centrais; e nos casos mais avançados, onde já se observavam septos mais espessos circulando nódulos bem definidos no parênquima, os espaços porta se mostraram bem dilatados devido ao depósito da matriz extracelular. Algumas vezes a fibrose portal se iniciava antes mesmo de haver indícios de fibrose nas regiões centrolobulares.

Nos casos considerados iniciais e intermediários, a coloração para orceína marcou a periferia dos vasos portais e centrais. Nos casos mais avançados, onde a cirrose já estava estabelecida, se observou a marcação positiva dos vasos rodeando os nódulos cirróticos.

A proliferação de vasos nos espaços porta, observada no início da formação dos septos fibrosos, foi evidenciada nas secções marcadas para laminina e para colágeno IV (PRANCHA 4-B e C). Células positivas para anti-fator VIII e VEGF foram observadas nos septos oriundos dos espaços-porta e vasos centrais e mais tarde, também ao redor dos nódulos cirróticos (PRANCHA 4-D e E).

Células actina-positivas foram observadas na periferia do espaço porta, veias centrais, e nos septos fibrosos que pareciam migrar tanto da veia central quanto dos espaços porta (PRANCHA 4-F).

7.2.5- Grupo Experimental com ligadura do colédoco

Os animais submetidos à ligadura do ducto biliar, sacrificados 4 dias pós-obstrução, ainda não mostravam alterações macroscópicas acentuadas, apenas uma leve dilatação do coto proximal do ducto e fígado com aspecto granular. Após o sétimo dia a icterícia era notada através das orelhas, patas e urina amarelada dos animais. O coto proximal do ducto biliar apresentava-se bastante dilatado e o fígado levemente aumentado.

No trigésimo e quadragésimo dias, o coto proximal já se mostrava altamente dilatado em todos os animais, com uma dimensão média de 6,5cm. Todos os animais apresentavam um quadro de icterícia e hépato-esplenomegalia. O fígado aumentado mostrava-se com aspecto superficial rugoso.

Os estudos histopatológicos demonstraram que, após os quatro dias da ligadura do ducto biliar, já ocorria moderada reação ductular nos espaços-porta. Com as secções coradas com H&E já se observava a proliferação de células ductulares nos espaços-porta acompanhada de um infiltrado inflamatório de polimorfos nucleares rodeando os ductos (PRANCHA 5-A). Células actina-positivas também foram observadas na periferia do espaço porta (PRANCHA 5-B) As marcações para laminina e colágeno IV de membrana basal se mostraram positiva, tanto revelando a presença desses elementos nos ductos biliares, como nos vasos proliferados nos espaços porta (PRANCHA 5-C). Nesse mesmo período a marcação positiva intensa já ocorria para VEGF na periferia dos espaços-porta.

Após sete dias a proliferação de células ductulares foi acentuada e se estendia de um a outro espaço-porta vizinho (PRANCHA 5-D). Nesse período as marcações para VEGF e fator VIII foram positivas e bem delimitadas nos espaços porta, revelando a proliferação vascular acompanhando a ductular (PRANCHA 5-E e F).

Aos 14 dias, o fígado mostrou os espaços-porta bem mais alargados devido à intensa proliferação ductular. Também ocorreu maior infiltrado inflamatório de polimorfos nucleares e linfócitos. Após os 30 dias uma extensa fibrose, com septos conjuntivos contendo os ductos e vasos proliferados, conectava os espaços-porta entre si.

Aos 40 dias pós-ligadura o fígado apresentava a arquitetura lobular hepática altamente alterada, os espaços porta alargados, e uma intensa proliferação de ductos por todo o parênquima chegando a isolar áreas de hepatócitos.

PRANCHA 1

Schistosoma mansoni

Fig. A – Fígado com estrutura do parênquima conservada, mostrando alguns granulomas periovulares esparsos (a) e ampliação fibrosa dos espaços porta (b), onde aparecem granulomas confluentes. H & E, 40X.

Fig. B – Espaço porta mostrando fibrose evidente e numerosos vasos sanguíneos, característico da forma avançada da esquistossomose (fibrose de tipo *pipestem*). Imuno-fluorescência indireta para laminina. 100X

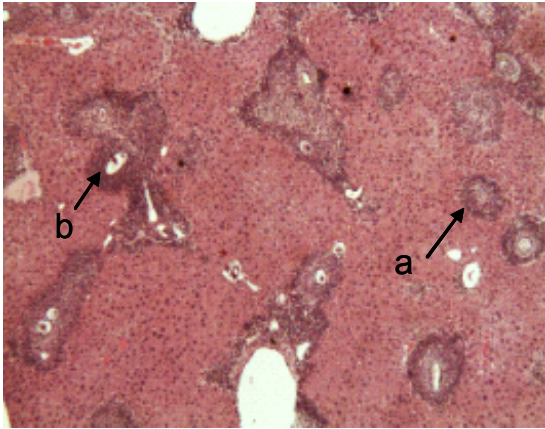
Fig. C – Vasos sanguíneos distribuídos nos granulomas revelados pela marcação da membrana basal vascular pela imuno-fluorescência indireta para colágeno IV. 200X.

Fig. D – A proliferação dos pequenos vasos sanguíneos, distribuídos de maneira difusa, bem evidenciada nesta secção de um granuloma periovular recente, marcado histoquimicamente para VEGE. 400X.

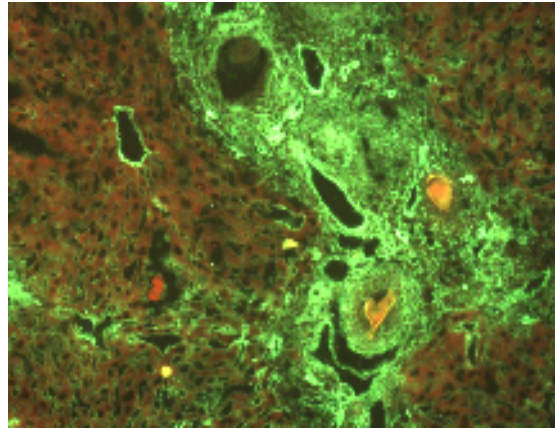
Fig. E – Granuloma periovular mais antigo, com proliferação vascular mais evidente na sua periferia. Imuno-histoquímica para anti-Fator VIII. 200X.

Fig. F – Intensa marcação para fibronectina na matriz extracelular do espaço porta e do granuloma esquistosomótico. 100X.

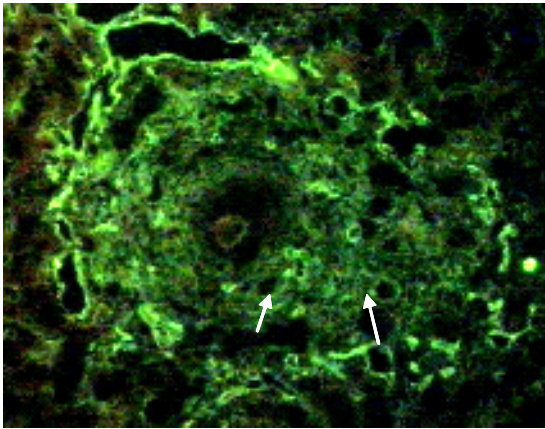
Schistosoma mansoni



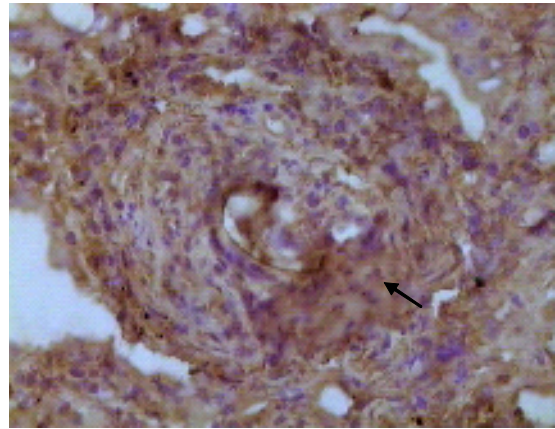
A



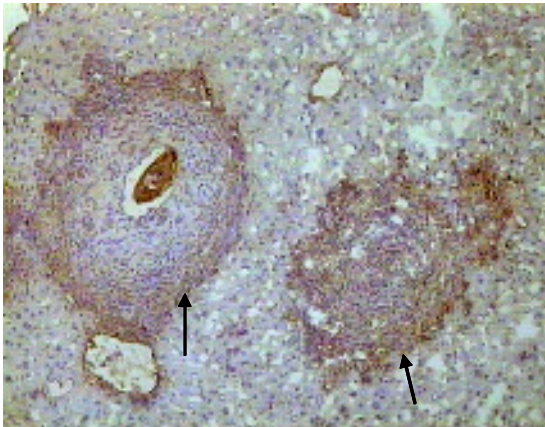
B



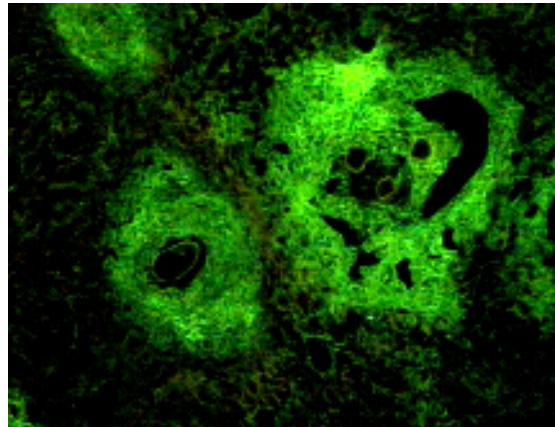
C



D



E



F

PRANCHA 2

Capillaria hepatica

Fig. A – Aspecto característico da fibrose septal induzida pela infecção por *C. hepática* no rato após 20 dias de infecção. Finos septos fibrosos aparecem ligando os espaços porta. Picosírius vermelho, 40X

Fig. B – Presença de numerosos vasos no espaço porta no início do processo fibroso. Imunofluorescência indireta para colágeno IV. 200X.

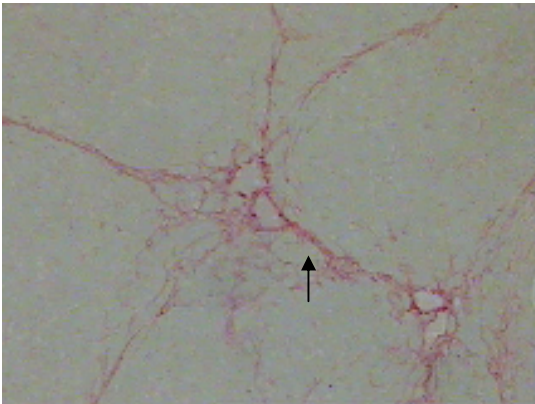
Fig. C – A marcação da membrana basal vascular revela bem evidente a presença de numerosos vasos desde os espaços porta até os finos septos fibrosos daí irradiados. Imunofluorescência indireta para laminina. 100X

Fig. D – Células actina-positivas nos espaços porta aparecem no seio dos finos septos fibrosos. Anti- α -actina, 100X

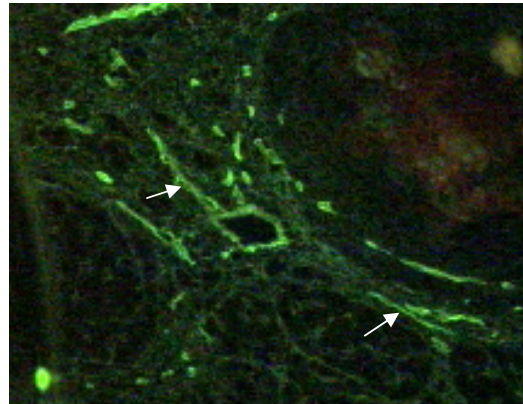
Fig. E – Presença de células positivas para Fator VIII nos espaços porta e nos septos ainda no início de sua formação. 400X.

Fig. F – Marcação positiva para VEGF nos espaços porta, o que aparece também ao longo dos septos fibrosos. 400X.

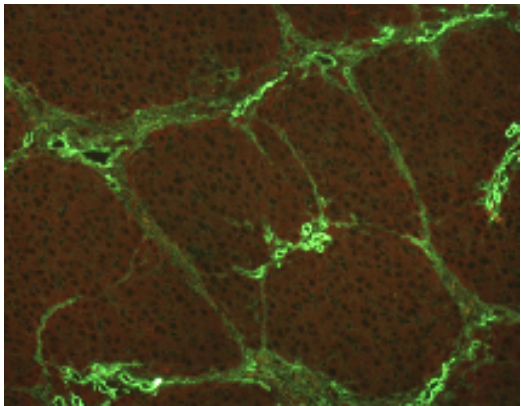
Capillaria hepatica



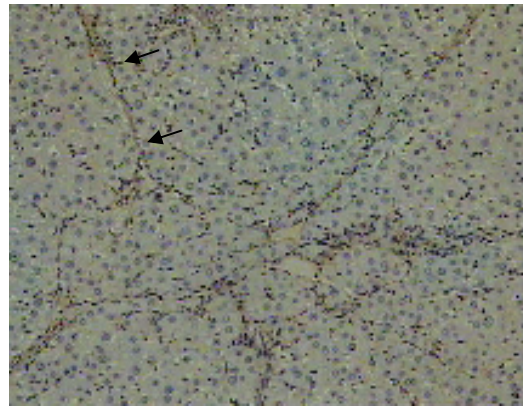
A



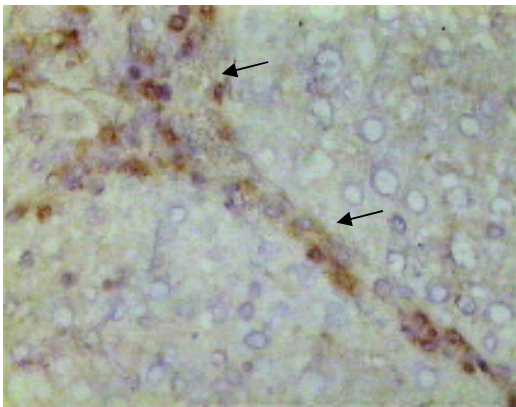
B



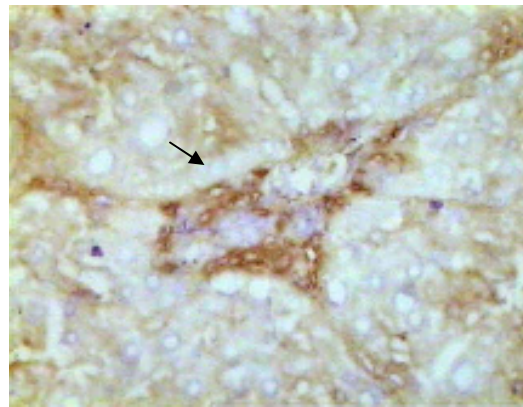
C



D



E



F

PRANCHA 3

Soro de Porco

Fig. A – Secção de fígado de animais inoculados com soro de porco demonstrando a deposição de colágeno na formação dos finos septos fibrosos que conectam os espaços porta entre si. Picrosírius-vermelho. 100X.

Fig. B – Evidência dos vasos nos espaços porta marcados pelo anti-colágeno IV ainda no início da formação dos septos. 100X.

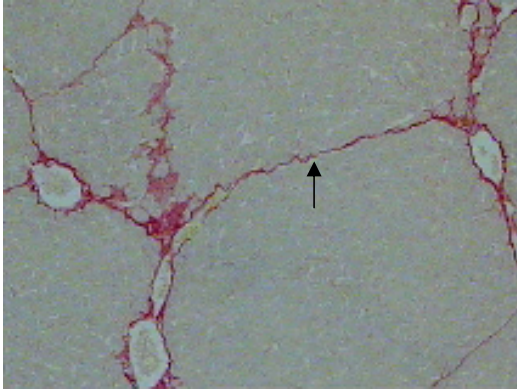
Fig. C – Proliferação dos vasos nos espaços porta e na direção dos septos, numa fase bem inicial da formação dos mesmos. Imunofluorescência para Laminina. 200X.

Fig. D – Imunohistoquímica para α -actina marcando especificamente a parede muscular do vaso porta principal. Anti- α -actina. 100X.

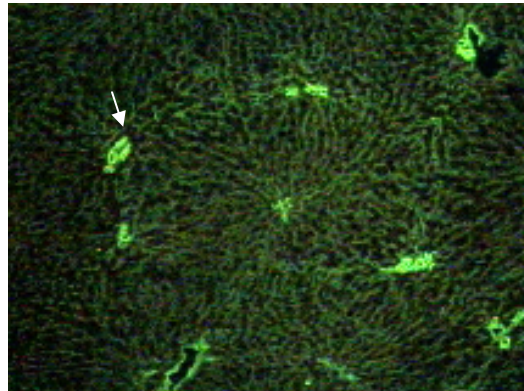
Fig. E – Presença de células que expressam reatividade para Fator VIII dentro dos septos fibrosos. 100X.

Fig. F – Marcação positiva para VEGF também delimitando bem os septos fibrosos. Anti-VEGF. 100X.

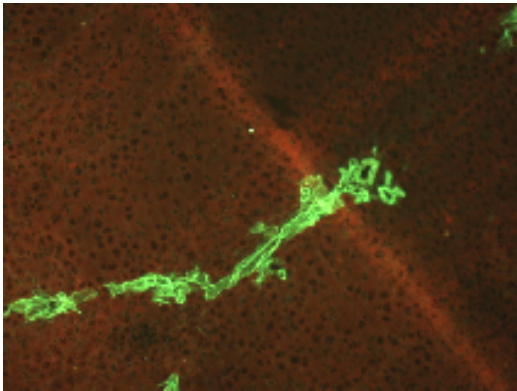
Soro de Porco



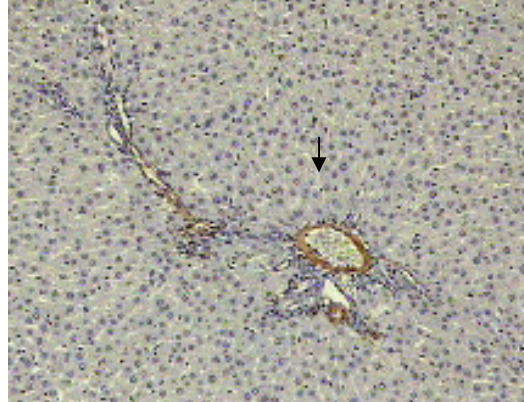
A



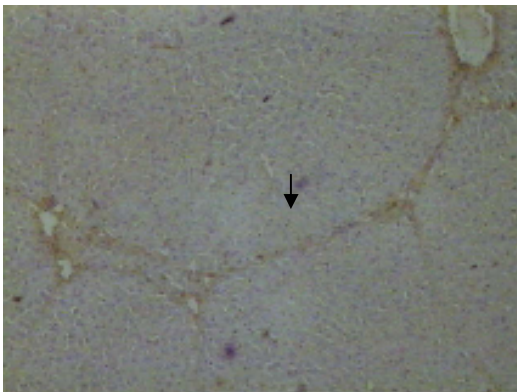
B



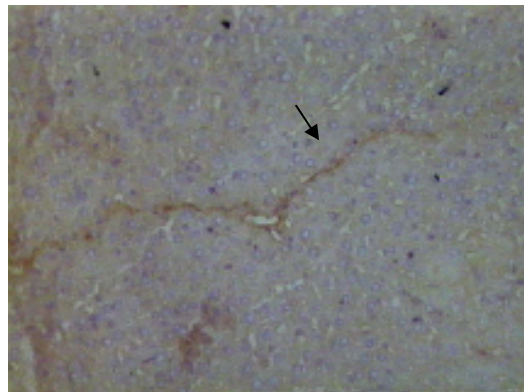
C



D



E



F

PRANCHA 4

CCl₄

Fig. A – Secção de fígado de animais inoculados com CCl₄ apresentando processo inflamatório, esteatose e fibrose. Coloração em H&E. 200X.

Fig. B – Presença de vasos nos septos fibrosos, bem evidenciado pela marcação da sua membrana basal pela anti-laminina. Imunofluorescência indireta. 200X.

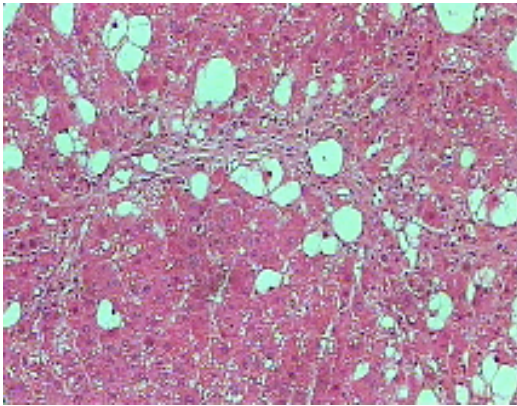
Fig. C – As paredes vasculares aparecem bem evidentes tanto nos espaços porta, como nos septos fibrosos. Imunofluorescência para colágeno IV. 200X.

Fig. D – Positividade para Fator VIII dentro dos septos fibrosos. 200X

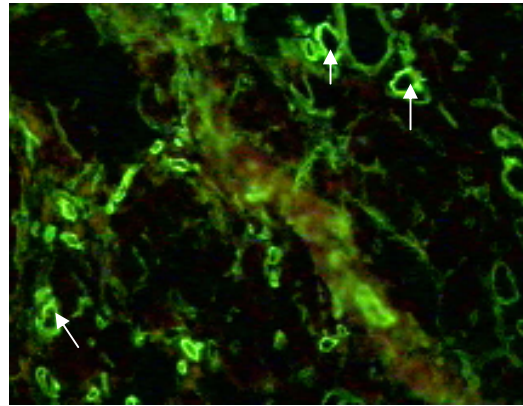
Fig. E – A marcação para VEGF também evidencia a proliferação vascular ao redor dos nódulos da cirrose. Anti-VEGF. 200X

Fig. F – Células α -actina positivas ao redor dos vasos hepáticos, evidenciando parede muscular, e células migrando para os septos fibrosos (pericitos-miofibroblastos?).

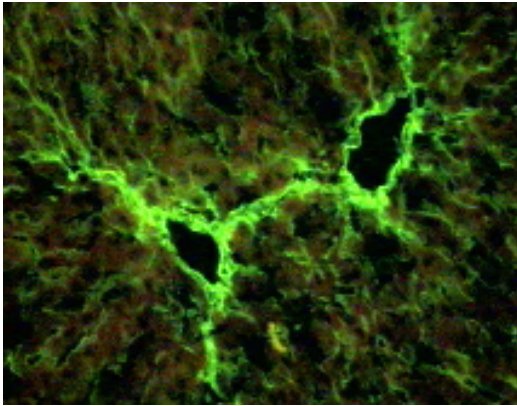
CCL



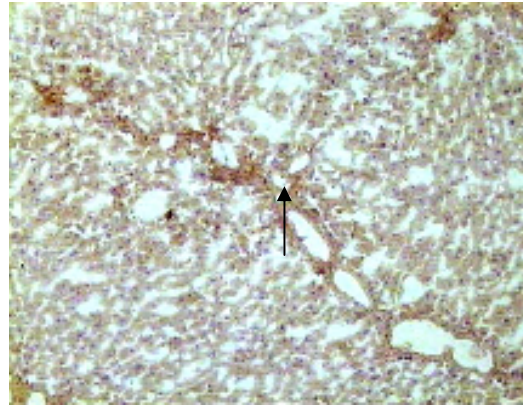
A



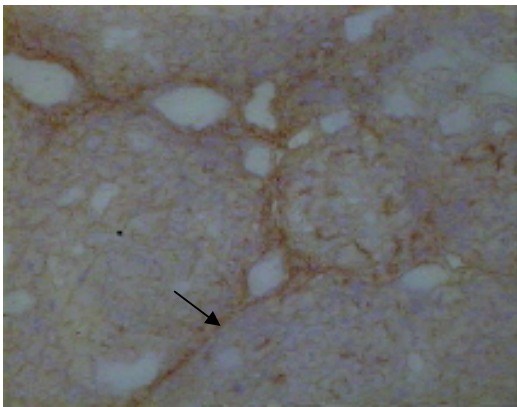
B



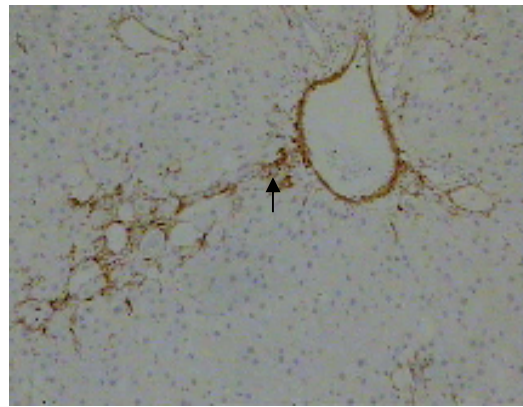
C



D



E



F

PRANCHA 5

Ligadura do Colédoco

Fig. A – Fígado de rato com ligadura do colédoco há 4 dias, exibindo sinais de proliferação ductular em torno de um ducto mediano e um infiltrado de células mononucleares. 200X.

Fig. B – Aspecto semelhante ao anterior mostrando que a maior parte das células peri-ductais proliferadas são α -actina-positivas, que aparecem também rodeando os vasos nos espaços periportais. 400X.

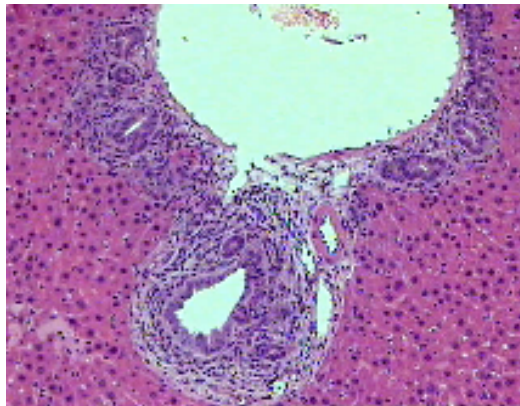
Fig. C – Início da proliferação ductular e vascular já demonstrando a presença de fibras colágenas aos 4 dias pós-ligadura. Imunofluorescência para colágeno IV. 200X

Fig. D – Proliferação ductular e vascular se irradiando para o interior do parênquima aos 7 dias após a ligadura do colédoco. Anti-laminina. 400X

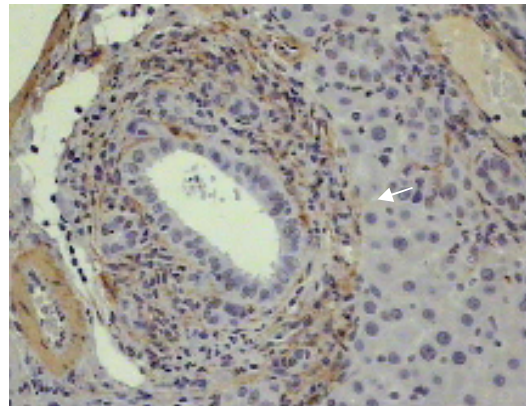
Fig. E – Presença de reatividade para VEGE em torno de vasos e ductos proliferados 7 dias após a ligadura do colédoco. Anti-VEGF. 200X

Fig. F – Presença de células positivas para fator VIII nos espaços periportais aos 7 dias da ligadura do colédoco. 400X.

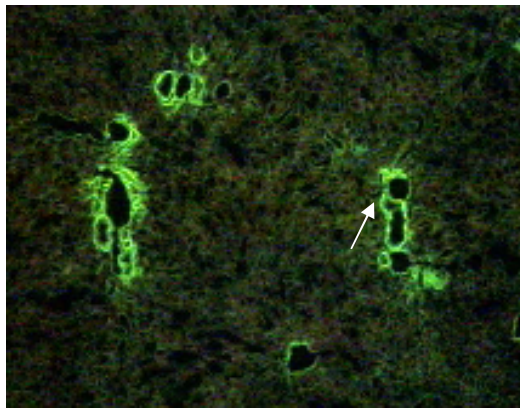
Ligadura do colédoco



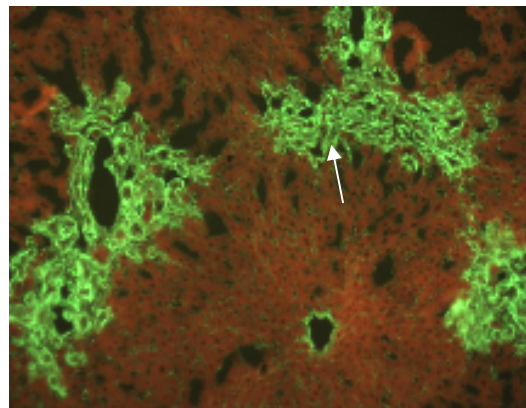
A



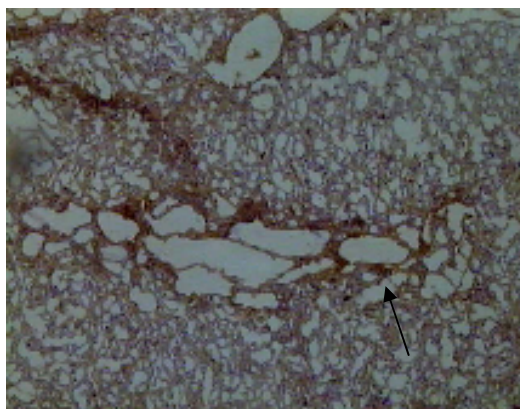
B



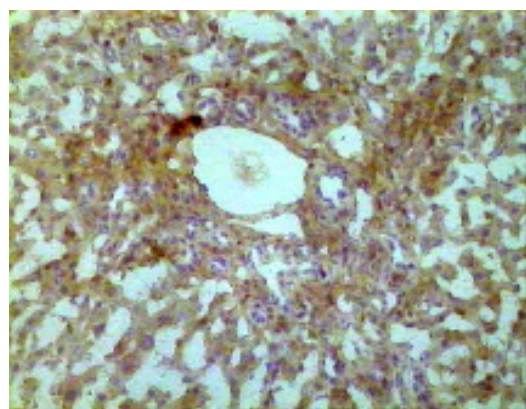
C



D



E



F

8 – DISCUSSÃO

8.1 - GENERALIDADES

Foi possível observar e documentar neste trabalho, através das marcações para os componentes vasculares do endotélio (fator VIII); membrana basal (laminina, fibronectina, colágeno tipo IV); parede vascular (actina, elastina) e fator pró-angiogênico (VEGF) a participação da angiogênese no desenvolvimento da fibrose nos cinco modelos experimentais propostos. Uma proeminente proliferação de vasos no início da formação dos septos fibrosos em todos os modelos foi observada com a marcação para laminina e colágeno IV de membrana basal vascular e confirmada com as marcações para VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) e fator VIII, que já se faziam presentes antes mesmo do aumento do colágeno. Estes achados sugerem que a angiogênese, de fato, exerce um papel importante no desencadeamento do processo fibroso como sugerido no estudo com o modelo da *Capillaria hepatica* realizado por SOUZA *et al.* (2006).

A participação da angiogênese já está bem estabelecida no processo de cicatrização. Atualmente um maior interesse tem sido dado à ocorrência destas alterações em condições patológicas. Na cicatrização, após lesão tecidual uma intensa proliferação de vasos ocorre, formando um tecido designado como tecido de granulação devido ao aspecto granuloso de sua superfície. Há muitos anos esse evento tem sido interpretado como um recurso da natureza para fornecer aporte de oxigênio e nutrientes ao tecido cicatricial que está sendo formado. Após a cicatrização, o excesso de vasos é reabsorvido, deixando o novo tecido mais firme, esbranquiçado e compacto. Estudos recentes têm chamado a atenção para a importância da angiogênese relacionada à fibrose e outras doenças hepáticas como o câncer e a hepatite (CARMELIET & JAIN, 2002). Essa importante associação foi observada neste estudo uma vez que, tanto nos modelos de indução por infecções parasitárias (*C. hepatica* e *S. mansoni*), quanto nos modelos de indução por substância tóxica (CCl₄), soro de porco e ligadura do colédoco, a angiogênese esteve presente. A intensa proliferação de vasos demonstrada no início do desenvolvimento do processo fibroso pode realmente estar representando a formação de um arcabouço para um posterior depósito de material conjuntivo como sugerido por RAPAPPORT *et al.* (1983).

O aumento da expressão de VEGF demonstrada em associação com a intensa proliferação vascular e principalmente nos locais de posterior depósito do colágeno, precedendo o processo fibroso, ressalta a importância deste, como fator promotor da angiogênese na fibrogênese hepática. O VEGF pode ser produzido por vários tipos de células hepáticas inclusive pelas próprias células endoteliais. Segundo BEAUSSIER *et al* (2005), a hipóxia é o maior estímulo para a expressão do VEGF nesses diferentes tipos de células. Estudo *in vitro* demonstrou que a hipóxia pode induzir a expressão de VEGF em hepatócitos e também a produção de VEGF, receptores Flt-1 e colágeno I em células estreladas ativas (UENO *et al*, 2006).

A progressão da fibrose tem sido ligada às lesões associadas com a hipóxia e a neovascularização. CORPECHOT *et al.* (2002), após estudo com modelo experimental de indução de cirrose por dietilnitrosamina em ratos, também sugeriram que a hipóxia pode estar envolvida na progressão das doenças hepáticas crônicas através da participação tanto na angiogênese, quanto na fibrogênese, tendo demonstrado que apenas a hipóxia era suficiente para aumentar a expressão de VEGF e de colágeno I no fígado.

A estreita relação entre os dois processos é sugerida, dentre outros aspectos, devido ao fato de que fatores de crescimento que são atuantes no desenvolvimento do processo fibroso, também têm se revelado como potentes fatores pró-angiogênicos (KALLURI & SUKHATME, 2000).

Muitas células positivas para α -actina migrando para formarem os septos foram observadas e marcadas no início do desenvolvimento do tecido fibroso. Provavelmente se tratavam dos miofibroblastos, já descritos por outros autores como células imuno-reativas para α -actina de músculo liso responsáveis pelo excesso de depósito da matriz extracelular na fibrose. Eles são produzidos apenas após ativação de células precursoras em resposta à lesão tecidual, não estando presentes no fígado normal. Entretanto, a origem desses miofibroblastos ainda é um enigma a ser determinado.

Muitos trabalhos têm sido realizados com a finalidade de identificar a origem celular da síntese aumentada da matriz extracelular na fibrose hepática. O maior destaque tem sido dado às células estreladas hepáticas. No início do ano de 1970, essas células foram consideradas como as células de maior contribuição para o depósito da matriz na fibrogênese hepática. Muitos artigos vinham enfatizando que a ativação destas células era um evento fundamental para promover a fibrose. Foi demonstrado que em condições patológicas de estresse e lesão tecidual as células estreladas

eram ativadas e adquiriam um fenótipo de miofibroblastos e essa ativação incluía desde a síntese de colágeno fibrilar, atividade contrátil, secreção de fatores vasoativos, quanto a secreção de metaloproteinase e seus inibidores (GRIKO *et al*, 1995).

Acreditava-se que as células estreladas juntamente com os macrófagos residentes no fígado conhecidos como células de Kupffer formavam o eixo da resposta fibrogênica. Contudo, as células estreladas são células hepáticas perisinusoidais residentes nos espaços de Disse, localizado entre a lamina endotelial e os hepatócitos, o que justificaria a sua participação na fibrose perisinusoidal. Entretanto, estariam realmente estas células participando da fibrose que se estabelece em outras áreas do fígado, como observada nos modelos de ligadura do colédoco e CCl₄, onde a fibrose se inicia nos espaços porta e veias centrolobulares? Segundo RAMADORI (1991), essas células possuem a capacidade de proliferação e migração, que explicaria a sua atuação na resposta fibrogênica tanto na região centrolobular, septal, quanto portal. Entretanto FONSECA *et al*. (2005) estudando a participação dessas células na fibrogênese portal hepática na capilaríase, demonstrou que, apesar da capacidade dessas células migrarem para essa região, a sua presença não ocorreu de forma relevante durante o desenvolvimento do processo. Este achado reforçou a idéia da possível participação de outros tipos celulares na fibrose hepática.

Atualmente acredita-se que o fato das células estreladas armazenarem uma grande quantidade de lipídios no seu citoplasma, possivelmente facilitou o seu isolamento por gradiente de solução e conseqüentemente permitiu o seu estudo *in vitro*, destacando a sua importância em detrimento de outras possíveis células fibrogênicas (GUYOT *et al*, 2006; RAMADORI, 2004). De acordo com SANCHOBRU *et al*. (2005) o modelo de ativação de células estreladas em cultura não reproduz exatamente o fenótipo ativado achado no fígado humano cirrótico, sugerindo que estas células estreladas podem ter um papel importante na fibrogênese, mas que o dogma de que são as únicas células responsáveis pelo excesso da matriz nesse processo é algo a ser revisto (GUYOT *et al*, 2006).

Outras células atualmente têm sido implicadas no processo fibroso, como sendo capazes de se diferenciarem em miofibroblastos e possuindo a capacidade de síntese das proteínas do tecido conjuntivo (STATON, 2004). Dentre elas estão os fibroblastos do trato portal, residente do tecido conjuntivo que rodeia os vasos e ductos biliares; as células do músculo liso da parede dos vasos, os fibroblastos da

segunda camada da veia centrolobular; as células endoteliais e as células perivasculares denominadas de pericitos, que atualmente têm despertado o interesse de muitos pesquisadores pelo fato de se tratar de células mesenquimais que atuam como células tronco, tendo a capacidade de se diferenciarem, assumindo fenótipos variados conforme as circunstâncias (RAMADORI, 2004). Segundo GUYOT *et al.* (2006) a variação na distribuição da fibrose justamente decorre do fato de que diferentes células com potencial fibrogênico podem estar envolvidas no processo, ou diferentes tipos celulares podem predominar em diferentes modelos.

A proliferação de vasos precedendo a fibrose, observada em todos os modelos aqui estudados, chama a atenção para a provável participação das células vasculares no processo fibroso. Os vasos sanguíneos podem estar servindo como um suporte para o transporte de pericitos residentes na sua periferia. Como atualmente sabe-se que essas células têm a capacidade de se diferenciarem em fibroblastos ou miofibroblastos, poderiam estar representando uma conexão entre os processos angiogênico e fibrogênico. Contudo, as marcações realizadas neste trabalho não permitiram essa afirmação, uma vez que os pericitos são células que estão presentes em vários órgãos e a depender da sua localização e função, expressam moléculas diferentes, não exibindo apenas um único marcador específico. Entretanto, atualmente uma combinação de marcações para desmina, α -actina, receptor de PDGF e regulador da proteína G têm sido sugeridos para a sua possível identificação (GERHARDT & BETSHOLTZ, 2003).

Adicionalmente tem sido postulado que miofibroblastos hepáticos também podem surgir da transição epitelial mesenquimal e de células progenitoras multipotentes e migratórias, originárias da medula óssea (IREDALE, 2007). Essas células apresentam ampla distribuição em diferentes órgãos e estão presentes nos vasos sanguíneos, tornando-se uma fonte para obtenção de diferentes tipos celulares.

Após lesão hepática grave, onde a capacidade funcional e/ou proliferativa dos hepatócitos se acha comprometida, evidências indicam que também células progenitoras multipotentes conhecidas como células ovais podem ser recrutadas para proliferação e diferenciação em várias linhagens hepatocelulares. Células ovais consistem em uma população de células não parenquimatosas de pequeno porte, com citoplasma escasso e núcleo ovóide, que proliferam a partir da tríade portal e invadem o parênquima durante as etapas iniciais da carcinogênese experimental, humana e regeneração hepática pós lesão por agentes tóxicos. Acredita-se que essas células tenham origem em um compartimento de células progenitoras,

possivelmente localizadas nos canalículos biliares terminais, designados canais de Hering e/ou regiões periductulares (NAVES & MORENO 2000).

Para uma possível identificação da origem destes miofibroblastos, se faz necessário um estudo imuno-histoquímico complementar com outros marcadores, juntamente com um estudo ultra-estrutural para a caracterização das células mesenquimais presentes no tecido fibroso. De posse do perfil imunológico e morfológico possivelmente a identificação e avaliação do papel das mesmas no processo poderá vir a ser melhor analisado.

Um outro aspecto observado no presente estudo foi o padrão de distribuição da fibrose. Com exceção do modelo induzido pelo CCl₄, onde as lesões fibrosas evidentes ocorrem também na zona acinar 3, nos demais modelos aqui estudados, a fibrose parece se iniciar e se propagar predominantemente nas zonas periportais (zona acinar 1). O espaço porta é uma área de drenagem de todo o parênquima hepático onde os espaços de Disse funcionam como os capilares linfáticos iniciais convergindo para os espaços porta e se dirigindo progressivamente para o hilo hepático e, finalmente canal torácico. Assim os produtos gerados nas lesões que afetam o parênquima podem acabar como mediadores da inflamação e da fibrose se concentrando nos espaços porta, onde podem estimular várias estruturas e tipos celulares.

8.2 - PARTICULARIDADES

O modelo da *Capillaria hepatica*, seguido pelos modelos da Ligadura do Colédoco e da Esquistossomose, foram os que apresentaram angiogênese mais proeminente.

O modelo da *C. hepatica* nos permitiu acompanhar melhor a evolução das lesões uma vez que 100% dos animais infectados desenvolveram a fibrose de maneira uniforme. Um outro aspecto favorável no estudo utilizando esse modelo foi o fato de que, devido a estudos prévios, sabia-se o período exato do início do processo, o que dava uma certeza de que o material obtido dos animais sacrificados aos 20 dias pós-infecção permitiria se observar realmente as lesões iniciais. Nessa fase, documentamos uma intensa proliferação de células α -actina-positivas juntamente com células reativas para fator VIII e VEGF nas regiões portais migrando para os septos, sugerindo uma intensa proliferação vascular. Contudo, a partir da análise das secções marcadas para laminina e colágeno IV de membrana basal vascular,

comparadas com as secções do fígado do mesmo período submetidas à coloração pelo picrossírius-vermelho para colágeno, confirmamos a ocorrência da angiogênese nos espaços periportais no início da formação dos septos fibrosos. Esses achados corroboram o relato de SOUZA *et al.* (2006) em seu estudo ultrastrutural onde descreve uma intensa proliferação de células mesenquimais que se enfileiravam formando os septos que até então, 25º dias pós-infecção, apresentavam raras fibrilas colágenas. Segundo os autores citados acima, nessa fase se observa predominância de células endoteliais e fibroblastos e raras células estreladas foram observadas. Desta forma, as células α -actinas positivas que foram observadas podem representar células mesenquimais que foram transportadas com os vasos.

No modelo de indução da fibrose pela ligadura do colédoco, as marcações para colágeno IV e laminina não nos permitiram diferenciar proliferação ductular da vascular pelo fato dessas estruturas compartilharem esses dois elementos. No material obtido aos 4 dias pós-ligadura não foi observado positividade para Fator VIII de células endoteliais, contudo a presença de células reativas para VEGF já era abundante na periferia dos espaços portais, não permitindo confirmar a ocorrência de proliferação vascular nesse período, mas sugerindo que o processo já estava se iniciando, uma vez que esse fator de crescimento atua justamente na proliferação da células endoteliais vasculares. Aos 7 dias as marcações específicas para fator VIII juntamente com VEGF revelaram uma intensa proliferação de células endoteliais demonstrando um ativo processo angiogênico ocorrendo nesse período, onde já se observa o depósito do material conjuntivo juntamente com a intensa proliferação de ductos biliares e processo inflamatório moderado. Esses achados condizem com o que foi observado por ROSMORDUC *et al* (1999) que ressaltaram não ter observado uma proliferação acentuada de células endoteliais, através de marcações para Ki67, antes de uma semana.

MEDINA (2005) observou o aumento do número de estruturas vasculares no trato portal na cirrose biliar primária humana, contudo sugeriu que essa angiogênese era estimulada por fatores pró-angiogênicos liberados na região periportal pela inflamação crônica e fibrose, ou seja, acreditavam que a angiogênese ocorria em um estágio mais avançado do processo.

Nesse modelo as reações se iniciam com a degeneração de hepatócitos devido à retenção de ácido biliar; ocorre estase no ácino 1 devido às lesões nas membranas provocadas por esses ácidos, eventual infarto periportal e reação ductular progressiva. Segundo DESMET (1995) essa multiplicação de ductos pré-existent,

metaplasia de hepatócito periportal juntamente com a ativação de células progenitoras é que estariam associadas à fibrose periductular, sendo o passo para o aumento do depósito da matriz que resultaria na fibrose biliar e eventualmente em cirrose biliar verdadeira.

Segundo ROSMORDUC *et al* (1999) a angiogênese que ocorre no modelo de ligadura é primariamente estimulada pelo VEGF em resposta a hipóxia hepatocelular. Eles observaram um aumento de 95% da expressão do VEGF após 2 semanas de hipóxia nos hepatócitos. E relataram que nesse período ocorria o aumento da proliferação de células endoteliais vasculares periportais, seguida por um aumento significativo da densidade do fator de Von Willenbrand nas áreas fibróticas.

O desenvolvimento de *shunts* e capilarização de sinusóides devido à diminuição da perfusão microvascular, que é uma característica bem estabelecida em casos de cirrose e outras doenças hepáticas que restringe o acesso do soluto sanguíneo aos hepatócitos, promovem a hipóxia e assim estimulam a produção do VEGF. A estimulação da produção e liberação desses promotores angiogênicos vão estimular a migração e proliferação de células endoteliais de vasos pré-existentes (UENO *et al.*, 2006).

Foram observadas muitas células positivas para α -actina na periferia dos espaços portais, rodeando as estruturas vasculares e ductulares, e também migrando para o interior dos septos. O acúmulo de miofibroblastos juntamente com a matriz extracelular ao redor de ductos proliferados tem sido investigado na montagem da lesão colestática (KINMAN & HOUSSET, 2002). Contudo apesar do principal alvo da inflamação e destruição tecidual nesse modelo, ocorrer primariamente no ducto biliar, os vasos presentes ali na periferia também são afetados. Assim as células α -actinas positivas, poderiam tratar-se tanto de miofibroblastos originários das células periductulares como sugerido por alguns autores, como também de pericitos presentes na periferia dos vasos.

KINMAN *et al.* (2000) acreditavam que mesmo nesse modelo onde as reações ocorrem na região periportal, as células estreladas hepáticas estariam envolvidas no depósito da matriz extracelular devido à sua capacidade de migração e proliferação. Entretanto, esses autores mais tarde relataram ter observado nos estágios mais recentes do processo, o envolvimento dos fibroblastos que rodeavam as estruturas biliares do trato portal, chegando à conclusão de que seriam essas células as responsáveis pelo excesso da matriz nesse modelo. Entretanto sugeriram que

células estreladas possivelmente teriam uma participação no processo, contudo apenas quando a área portal, aumentada de tamanho, invadisse o parênquima (KINMAN *et al.*, 2003).

KINMAN & HOUSSET (2002), evidenciaram que as células estreladas hepáticas submetem-se a uma transição para miofibroblastos após a ligadura do ducto e mostram quimioatração para ductos biliares na colestase hepática. Contudo também sugeriram que a origem dos miofibroblastos peribiliares pode ser atribuída à ativação e proliferação de fibroblastos portais. De acordo com os autores as células epiteliais do ducto biliar também demonstraram contribuir ativamente para a promoção e regulação dessa fibrogênese, através da síntese e liberação de inúmeros mediadores tais como: fator transformador de crescimento beta (TGF- β), fator de aumento do tecido conjuntivo, fator de crescimento derivado de plaquetas e endotelina-1, que têm como alvo diferentes tipos de células hepáticas, incluindo células estreladas e fibroblastos portais. Acredita-se que a fibrose periportal se desenvolva na colestase e provavelmente também em outros tipos de doenças hepáticas através da interação entre células epiteliais do ducto e miofibroblastos peribiliares.

De acordo com relatos de KINMAN *et al* (2003), quando ocorre à redução do fluxo biliar na cirrose colestática, a intensa proliferação ductular leva à destruição dos hepatócitos que estão mais próximos do campo portal e conseqüentemente desencadearia a ativação de fibroblastos periductulares.

Sabe-se que o principal fator responsável pela indução das lesões no modelo da ligadura do colédoco além da composição da bile, é o aumento da pressão na região portal. O recrutamento de células inflamatórias que chegam a esta região em resposta as lesões teciduais promove a destruição dos ductos biliares e da primeira camada de hepatócitos levando ao aumento desse campo. Este fato poderia justificar a ativação dos fibrobrastos portais, uma vez que já foi demonstrado que para os mesmos assumirem um fenótipo de miofibroblastos necessitaria serem submetidos a grandes pressões. Contudo, uma vez que os pericitos também estão próximos aos nos ductos biliares, esses também poderiam estar contribuindo para o depósito da matriz extracelular no espaço porta nesse modelo.

No modelo de indução de fibrose com a infecção com *S. mansoni*, a participação dos fibroblastos portais também tem sido sugerida. A ativação dessas células poderia ser justificada pelo alargamento dessa área devido ao constante depósito de ovos e

também proliferação ductular, que podem promover um aumento de pressão nessa região.

O modelo murino de esquistossomose nos permitiu estudar tanto a fibrose granulomatosa, quanto a fibrose periportal. Camundongos infectados com o *S. mansoni* podem desenvolver as duas formas de esquistossomose observadas em humanos: A forma hépato-intestinal, caracterizada pela presença de granulomas periovulares e a forma mais grave, hepatoesplênica, caracterizada pela grande concentração de granulomas e intensa fibrose periportal, conhecida como fibrose tipo *pipestem*.

Após infecção, vermes adultos instalam-se nos vasos sanguíneos mesentéricos e no sistema portal hepático do hospedeiro. Nesse local ocorre a postura dos ovos que serão carregados pelo sistema circulatório até os capilares hepáticos. A contínua chegada de ovos nos capilares promovendo lesões obstrutivas nos vasos e abertura de vasos colaterais nos espaços portais aonde os ovos irão se acumular, juntamente com fatores liberados pelos mesmos após amadurecimento, irão desencadear intensa reação granulomatosa e depósito de matriz nos espaços portais, revelando um quadro de fibrose periportal.

Dos camundongos que infectamos poucos apresentaram a fibrose periportal. O tempo de infecção dos animais foi de grande importância para a obtenção desse tipo de fibrose, uma vez que só foram vistas nos animais que foram sacrificados após os 60 dias de infecção. A maioria apresentou apenas granulomas periovulares isolados, distribuídos pelo parênquima hepático, preservando a arquitetura normal do fígado.

No passado acreditava-se que camundongos infectados por longos períodos desenvolveriam sistematicamente uma fibrose periportal devido a um depósito maciço de ovos ao longo das veias periportais intra-hepáticas. Mais tarde foi demonstrado que até mesmo, em camundongos isogênicos infectados, apenas 30-50% desenvolvem esse tipo de lesão (Andrade & Cheever, 1993). Hoje se sabe que o período de infecção não é o único fator determinante para o desenvolvimento desse tipo de fibrose, outros fatores parecem estar envolvidos. Grimaud & Borojevic (1977,1986) baseado em estudos estruturais sugeriram que lesões hepáticas severas na esquistossomose dependem de uma série de fatores que culminam em danos vasculares, proliferação de miofibroblastos e produção excessiva de matriz por essas células e não apenas dos ovos do parasito.

Alterações vasculares são reconhecidamente proeminentes na forma hepatoesplênica da doença. Andrade & Cheever (1971) já haviam descrito a ocorrência de

distorções nos pequenos e médios capilares e brotamento de vasos a partir da veia porta, promovido pela embolização de grande número de ovos na fase crítica da infecção. Andrade (1987) havia relatado que a presença desses ovos no interior de veias e capilares dilatados precedia a concentração de granulomas periportais, o que indicava que as mudanças vasculares que precedem à fibrose periportal eram realmente importantes para o seu desenvolvimento. Entretanto na fibrose focal, os granulomas isolados eram até pouco tempo conhecidos e descritos em livros de texto como estruturas avasculares. SILVA *et al.* (2006) também os descreveram em seus estudos como estruturas avasculares que apresentavam apenas uma corôa de vasos sanguíneos na sua periferia. Contudo é de se estranhar desde o início do processo a ocorrência de infiltração celular, proliferação fibroblástica e depósito de colágeno sem a participação dos vasos sanguíneos.

Diferentemente do que foi observado por esses autores, utilizando as marcações para os elementos vasculares, pudemos observar intensa vascularização tanto nos espaços periportais fibrosos, quanto nos granulomas periovulares isolados. Possivelmente a descrição de SILVA *et al.* (2006) decorreu do fato de terem avaliado secções de fígado de animais sacrificados em períodos mais tardios, uma vez que, apesar do depósito de ovos ocorrer de forma contínua, nessa fase da infecção, se observa uma predominância de granulomas maduros que são mais fibrosos e pouco vascularizados.

As marcações para fator VIII, laminina e colágeno IV confirmaram a intensa proliferação vascular observada nos espaços portais e nos granulomas esquistossomóticos registrados nesse trabalho. A dilatação do espaço porta ocorre tanto pelo agregado de granulomas periovulares, devido à maciça deposição de ovos, quanto pela formação de um tecido de granulação. Essas evidências de proliferação vascular nesse modelo indicam que a angiogênese tem um papel na formação do tecido de granulação que precede a fibrose periportal. A distribuição dos vasos na fibrose granulomatosa esquistossomótica se assemelha ao tecido de granulação que antecede o processo de reparo. Granulomas recentes identificados pela presença de ovos íntegros no interior, apresentavam grande número de vasos distribuídos de maneira mais uniforme e, à medida que iam se tornando mais maduros, ou seja, mais compactamente fibrosos, os vasos tendiam a se posicionarem na periferia desses granulomas. Essas observações corroboram o que foi publicado por BAPTISTA & ANDRADE (2005), os quais concluíram que a

associação do tecido conjuntivo neo-formado e diferenciação com proliferação vascular é bem representada durante a formação do granuloma esquistossomótico. Nesse modelo também se pôde verificar muitas células α -actinas positivas presentes tanto nos granulomas periovulares, no início do processo, quanto no denso tecido fibroso periportal. Segundo estudo experimental realizado por BARBOSA *et al.* (1993) miofibroblastos derivados de células estreladas participariam da formação de granulomas periovulares nos espaços-portais. Entretanto na fibrose periportal ANDRADE *et al.* (1999) em estudo ultrastrutural em humanos, não evidenciaram importância das células estreladas, demonstrando a participação de células do músculo liso vascular, que gradualmente tendiam a desaparecer.

Como após infecção os ovos do parasito migram para o fígado através do sistema porta, ficando retidos nas porções mais estreitas dos vasos portais, possivelmente a obstrução dos microvasos dos espaços periportais promovem lesões microvasculares como demonstrado por ANDRADE (1987) que, conseqüentemente, estimulariam as células endoteliais a proliferarem e a migrarem a fim de restabelecer o fluxo sanguíneo normal, promovendo também a liberação de vários fatores tanto fibrogênicos (TGF- β) quanto angiogênicos (VEGF e PDGF) antes mesmo de uma reação inflamatória crônica, levando à ativação de células fibrogênicas ali presentes. Diferentemente dos dois modelos anteriores, nos animais tratados com CCl₄ as lesões hepáticas se concentraram principalmente ao redor dos vasos centrais. Pode-se observar necrose hepatocelular, reação inflamatória e grande concentração de células α -actina-positivas ao redor das veias centrolobulares. Essas células, provavelmente são as responsáveis pelo depósito da grande quantidade da matriz e início da formação dos septos nessa região. Alguns autores acreditam tratar-se de células da segunda camada dos vasos centrais que teriam um importante papel nesse tipo de fibrose (fibrose pericentral). Outros acreditam tratar-se das células estreladas, devido à proximidade do local em que residem (REEVES & FRIEDMAN 2004).

O aumento da expressão de VEGF foi observado nessa região provavelmente devido à redução do oxigênio comprometido pelo tratamento com o CCl₄. Tem-se demonstrado que após intoxicação com tetracloreto de carbono, além dos hepatócitos, as células estreladas hepáticas também expressam VEGF e seus receptores (ISHIKAWA *et al.*, 1999). Seguindo o aumento do VEGF foi observada uma intensa proliferação de células positivas para fator VIII.

Paralelo às reações na região centrolobular, a coloração do picrossírius-vermelho para colágeno nos revelou concomitante desenvolvimento de fibrose também nos espaços periportais e proliferação de células endoteliais visualizadas pela positividade para fator VIII. Como nos outros modelos, a participação da angiogênese no início dessa fibrose periportal foi confirmado também com as marcações para colágeno IV e laminina.

Na fibrose induzida por CCl₄ foi observado que o TGFβ pode diretamente ou através de outras células, induzir a formação de novos vasos sanguíneos *in vivo*, principalmente quando associado com o fator de crescimento de fibroblasto (FGF). O TGFβ é uma citocina identificada durante o estágio inicial da resposta fibrótica antes mesmo dos sinais de inflamação e aumento de número de fibroblastos. Ele é expresso em células perisinusoidais estreladas, em miofibroblastos e em fibroblastos portais durante processo fibroso. Acredita-se que essa citocina também exerça um papel importante na maturação das células da periferia dos vasos, os pericitos (KALLURI & SUKHATMA, 2000). O TGFβ estimularia a expressão de colágeno I e III em células mesenquimais (RAMADORI, 2004).

No modelo do Soro de Porco, assim como no modelo de indução de fibrose pelo CCl₄, a fibrose também se desenvolveu tanto na região centrolobular quanto nas zonas periportais. Os septos se irradiavam das zonas portais para as centrolobulares resultando na formação de pseudolóbulos. O depósito de colágeno tipo IV foi demonstrado por ser predominante na matriz da fibrose principalmente nos estágios mais recentes, juntamente com a intensa proliferação de células positivas para fator VIII e VEGF que se iniciava nos espaços periportais e migravam para os septos, sugerindo a participação das células endoteliais sinusoidais na produção do colágeno nesse modelo. Estes achados corroboram o que foi descrito por SHIGA *et al* (1998) que demonstraram que desde o início até o período mais avançado do processo se observa deposição de colágeno tipo I, III e IV, com predominância do colágeno IV nas fases mais iniciais.

Segundo SHIGA *et al* (1997), a fibrogênese neste modelo segue as mudanças vasculares ou hemodinâmicas da circulação hepática. Alterações hemodinâmicas da circulação intrahepática induziriam necrose, apoptose e degeneração hepatocelular e estas mudanças teriam um importante papel na patogênese da fibrose induzida pelo soro de porco, contudo não detectadas muitas vezes devido ao pequeno número de células lesadas e rápida fagocitose pelos macrófagos. Estes autores demonstraram a presença de macrófagos e de células desmina e α-actina positivas

rodeando as veias centrolobulares e os septos fibrosos e também proliferação de fibras elásticas nos septos em estágios mais avançados indicando uma gradual ocorrência de necrose hepatocelular. Em nossas secções não observamos necrose e apoptose de hepatócitos, só moderado processo inflamatório nas áreas periportais.

BHUNCHET *et al* (1992) acreditavam que a resposta imune aos antígenos era realmente o fator decisivo para a indução da fibrose. Através dessa resposta, macrófagos incluindo células de Kupffer seriam ativados e estimulariam as células estreladas perisinusoidais e fibroblastos intersticiais (portais, capsular e células da segunda camada da parede da veia portal) iniciando o processo fibroso. Mais tarde esses mesmos autores (BHUNCHET *et al*, 1996) demonstraram que ratos neonatos tolerizados com soro de porco não desenvolviam fibrose quando submetidos na fase adulta. Eles acreditavam que a necrose de hepatócitos pode ser ignorada como fator da fibrogênese nesse modelo.

A gênese da fibrose induzida por soro de porco é ainda bastante controversa. PARONETO & POPPER (1966), foram os primeiros a considerarem o modelo como a forma de se obter fibrose, sem precedentes de necrose e inflamação crônica, possivelmente induzida por complexos imunes, contudo não esclarecendo como esses complexos atuariam para desencadear o processo. Entretanto, esses mesmos autores também observaram uma grande proliferação de ductos biliares na rota dos septos periportais, sugerindo que os mesmos poderiam ter um papel no desenvolvimento da cirrose nesse modelo. Essa proliferação ductular foi confirmada nos trabalhos de SHIGA *et al.* (1997), que também demonstraram em estudo estrutural a presença de células endoteliais expressando Fator VIII nos septos fibrosos, sugerindo o aumento do fluxo sanguíneo no início do processo. A positividade para laminina e para colágeno IV que foi demonstrada nesse trabalho rodeando os espaços periportais e veias centrolobulares, poderia representar tanto uma proliferação ductular, quanto vascular uma vez que, como já mencionado, esses elementos estão presentes nas duas estruturas, e assim, como nos outros modelos, a proliferação de muitas células positivas para fator VIII e VEGF foi observada nos septos.

NAKANO (1986) após observarem um espessamento da parede da veia portal levando a um estreitamento do lúmen do vaso, alterações de hepatócitos e restos de células antes do início da fibrose, sugeriu que a fibrose resultava de lesões hepáticas que poderiam ter sido causadas por distúrbio da veia portal.

O fato de a angiogênese ter se mostrado presente em todos os modelos, precedendo o depósito da matriz conjuntiva, chama a atenção para a sua importância no desenvolvimento do processo fibroso. Entretanto, um estudo mais profundo tanto dos elementos celulares, quanto dos fatores envolvidos no processo fibrogênico, se faz necessário para uma maior compreensão do papel da mesma no processo fibroso.

9- CONCLUSÕES

1. A angiogênese se mostrou como um importante fator no desenvolvimento do processo fibroso, uma vez que precedeu o depósito do colágeno, em todos os modelos estudados, independente do agente etiológico.
2. A angiogênese se apresentou mais proeminente nos modelos da Capilaríase hepática do rato, na ligadura do colédoco e na Esquistossomose murina.
3. O espaço porta se revelou como foco da resposta fibrosa em todos os modelos, independente do estímulo usado para indução da fibrose.

10- PERSPECTIVA FUTURA

- Realizar estudo ultra-estrutural e análise imuno-histoquímica para identificar os elementos celulares envolvidos na fibrogênese hepática experimental.
- Avaliar a resposta fibrogênica após a utilização de drogas anti-angiogênicas.

11- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Aziz G, Rescan PY, Clement B, Lebeau G, Rissel M, Grimaud JA, et al. A Cellular sources of matrix proteins in experimentally induced cholestatic rat liver. *J Pathol* 1991; 164: 167-74.

Akiyoshi F, Sata M, Suzuki H, Uchimura Y, Mitsuyama K, Matsuo K, et al. Serum vascular endothelial growth factor levels in various liver diseases. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 41-5.

Alcolado R, Arthur MIP, Iredali JP. Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin Sci* 1997; 92: 103-12.

Al Admani MS. Concomitant immunohistochemical localization of fibronectin and collagen in schistosome granulomata. *J Pathol* 1985; 147(2):77-85.

Andrade ZA. Pathogeneses of pipe-stem fibrosis of the liver (Experimental observation on murine schistosomiasis). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; 82: 325-34.

Andrade ZA. Contribution to the study of septal fibrosis of the liver. *Internat J Exper Pathol* 1991; 72: 553-62.

Andrade ZA. Evolution and involution of hepatosplenic schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989; 84: 58-75.

Andrade ZA, Brito PA. Evolution of schistosomal hepatic vascular lesions after specific chemotherapy. *Am J Trop Med Hyg* 1981; 30(6):1223-7.

Andrade ZA, Cheever AW. Alterations of the intrahepatic vasculature in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Am J Trop Med Hyg* 1971; 20(3):425-32.

Andrade ZA, Cheever AW. Characterization of the murine of schistosomal hepatic periportal fibrosis (pipstem fibrose). *Int J Exp Pathol* 1993; 74:195-202.

Andrade ZA, Freitas LA. Hyperplasia of elastic tissue in hepatic schistosomal fibrosis. Mem Inst Oswaldo Cruz 1991; 86(4):447-56.

Andrade ZA, Godoy A. Influence of the route of administration of pig serum in the induction of hepatic septal fibrosis in rats. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91: 769.

Andrade ZA, Guerret S, Fernandes AL. Myofibroblasts in schistosomal portal fibrosis of man. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(1):87-93.

Andrade ZA, Peixoto E, Guerret S, Grimaud J-A. Hepatic connective tissue changes in hepatosplenic schistosomiasis. Human Pathol 1992; 23: 566-73.

Andrade ZA, Silva LM, Souza, MM, Sadigursky M, Barbosa Junior A, Oliveira IR. Role of the spleen on the pathogenesis of schistosomal periportal (pipestem) fibrosis of the liver: an experimental approach. Am J Trop Med Hyg 1998; 59(4):557-62, 1998.

Andrade ZA, Warren KS. Mild prolonged schistosomiasis in mice: Alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1964; 58: 53-57.

Ankoma-Sey V, Wang Y, Dai Z. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. Hepatology 2000; 31(1): 141-8.

Ariosto F, Riggio O, Cantafora A, Colucci S, Gaudioi E, Mechelli C, Merli M. Carbon tetrachloride-induced experimental cirrhosis in the rat: a reappraisal of the model. Eur Surg Res 1989; 21: 280-6.

Areson DM, Friedman SI, Bissel D.M. Formation of extracellular matrix in normal rat liver: Lipocytes as a major source of proteoglycan. Gastroenterology 1988; 95: 441-7.

Arthur MJP. Degradation of Matrix Proteins in Liver Fibrosis. Pathol Res Pract 1994; 190; 825-33.

Arthur MJP. Fibrogenesis: II Metalloproteinases and Their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physic* 2000; 279: G245-G249.

Barbosa Jr AA, Pfeiffer U, Andrade ZA. Role of fat-storing cell (FSC) in schistosomal hepatic fibrosis of mice. *Virchow's Arch B* 1993; 64:91-96.

Barnett JL, Appelman HD, Moseley RH. A Familial form of incomplete septal cirrhosis. *Gastroenterology* 1992; 102: 674-78.

Baptista AP, Andrade ZA. Angiogenesis and schistosomal granuloma formation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2005; 100(2): apr.

Bauditz J, Wedel S, Lochs H. Thalidomide reduces tumour necrosis factor α and interleukin 12 production in patients with chronic active Crohn's disease. *Gut* 2002; 50: 196-200.

Beaussier M, Wendum D, Fouassier L, Rey C, Barbu V, Lasnier E, et al. Adaptative bile duct proliferative response in experimental bile duct ischemia. *J Hepatol* 2005; 42(2): 257-5.

Bergman I, Loxley R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyprolin. *Anlytical Chemistry* 1963; 35: 1961-5.

Bertolini F. Thalidomide in multiple myeloma, myelodysplastic syndromes and histiocytosis. Analysis of clinical results and of surrogate angiogenesis markers. *Ann. Oncol.*, 12: 987-990, 2001.

Bhunchet E, Eishi Y, Wake K. Contribution of immune response to hepatic fibrosis induced by porcine serum. *Hepatology* 1996; 23:811-7.

Bhunchet E, Wake K. Role of mesenchymal cell populations in porcine serum-induced rat liver fibrosis. *Hepatology* 1992; 16(6): 1452-73.

Boehm T, Folkman J, Browder T, O'reilly M S. Anti-angiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997; 390: 404-7.

Bogliolo L. The anatomical picture of the liver in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Am Trop Med Parasitol* 1957; 51:1-14.

Branton Mh, Jeffrey Bk. TGF-B and Fibrosis. *Microbes Infect* 1999; 1:1349-65.

Brogi, E, Wu, T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 1994; (90): 649-52.

Brouty BD, Zetter BR. Inhibition of cell motility by interferon. *Science* 1980; 208: 516-8. .

Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS* 1997; 79: 233-69.

Burt AD. Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. *J Pathol* 1993; 170; 105-14.

Caballero-Mendonza E, Ridaura-Sanz C, Angeles- Ángeles A. La célula estelar hepática (célula de Ito). *Patologia* 1999; 37: 307-14.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases *Nature* 2002; 407 249–59.

Carlson G, Zukoski CF, Campbell J, Chvapil M. Morphologic, biophysical and biochemical consequences of ligation of the common biliary duct in the dog. *Amer. J. Pathol.* 86:301-12, 1977.

Cheever AW. Quantitative comparison of the intensity of *Schistosoma mansoni* infections in man and experimental animal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1969; 63:781-95.

Cheever AW, Andrade ZA. Comparison of pathological changes in the liver of subjects with compensated and decompensated hepatosplenic schistosomiasis. *Gaz Med Bahia* 1970; 70: 67-74.

Chojkier M, Lyche K, Filip M. Increased production of collagen in vivo by hepatocytes and nonparenchymal cells in rats with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *Hepatology* 1988; 8 :808-14.

Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R. et al. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 2002; 35(5): 1010-21.

Coussens L M. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 1999; 13: 1382-97.

D'Amato RJ, Lentzsch S, Anderson KC, Rogers M S. Mechanism of action of thalidomide and 3-amido-thalidomide in multiple myeloma. *Semin Oncol* 2001; 28: 597-601.

D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4082-5.

Day CP. Is Necroinflammation a Prerequisite for Fibrogenesis. (Review) *Hepato-Gastroenterol* 1996; 43: 104-20.

Desmet VJ. Histopathology of cholestasis. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 79:233-40. 1995.

Dvorak HF, Gresser I. Microvascular injury in pathogenesis of interferon-induced necrosis of subcutaneous tumours in mice. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 497-502.

El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi M, Igarashi M, Yamamoto A. et al. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology* 1998; 27(6): 1554-62.

Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrin Rev* 1997; 18: 4-25.

Ferreira LA, Andrade ZA. *Capillaria hepatica*: a cause of septal fibrosis of the liver. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993; 88: 441-7.

Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1997; 235: 442-7.

Folkman J. In: Brauwald E. et al. *Harrison's Textbook of Internal Medicine*. 15th ed. New York: McGraw-Hill; 2001a. p. 517-30.

Folkman J. Angiogenesis-dependent disease. *Semin Oncol* 2001; 28: 536-42.

Folkman J, Mulliken JB, Ezekowitz RAB. In the *Clinical Applications of the interferons* (eds Stuart-Harris, R. & Penny, R.) London: Chapman & Hall Medical, 1997b. p. 255-65.

Fonseca YO, Lima CB, Santos ET, Andrade ZA. On the presence of hepatic stellate cells in portal spaces. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100(3): 289-91. Epub.

Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-35.

Friedman SL. Cytokines and Fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 129-37.

Friedman SL. Mechanisms of Disease: mechanisms of hepatic and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol & Hepatol* 2004; 1: 98-105.

Galvão VA. *Capillaria hepatica*. Estudo da incidência em ratos de Salvador- Bahia e dados imunopatológicos preliminares. *Rev Soc Bras Med Trop* 1976; 10: 333-337.

Gerber MA, Vernances S. Chronic septal hepatitis. *Virchow's Archiv Ser A Pathol Anat Histopathol* 1974; 362: 303-9.

Gerhardt H, Beltsholtz C. Endothelial-pericyte interations in angiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003;314: 15-23.

Gimbrone Jr MA, Cotran RS, Leapman SB, Folkman J. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using rabbit cornes. *J Natl Cancer Inst* 1974; 52: 413-27.

Guyot C, Lepreux S, Combea C, Doudnikoff E, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Desmouli`ere A. Hepatic fibrosis and cirrhosis: The (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 135–51.

Golbey DH, Purcell H, Kominami S, Takemori S, Kassor DC. Adrenal activation of carbon tetrachloride: role of microsomal P 450 isozymes. *Toxicology* 1994; 94:31-40.

Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocrine Rev* 1987; 8:95-114.

Gressner AM. Liver Fibrosis: Perspectives in pathobiochemical research and clinical outlook. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29: 293-311.

Grinko I, Geerts A, Wisse E. Experimental biliary fibrosis correlates with increased numbers of fat-storing and Kupffer cells, and portal endotoxemia. *J Hepatol* 1995; 23(4): 449-58.

Grimaud JA, Borojevic R. Miofibroblasts in hepatic schistosomal fibrosis. *Experiencia* 1977; 33: 890-2.

Grimaud JA, Borojevic R. Portal fibrosis: intrathepatic portal vein pathology in chronic human schistosomiasis mansoni. *J Submicrosc Cytol* 1986; 18: 783-93.

Hall MC. Nematode parasites of mammals of the orders rodentia, lagomorpha and hyracoidea. Proc U S Nat Mus 1916; 50: 1-528.

Ikeda H, George YW, Caaterine HW. Lipocytes from fibrotic rat liver have an impaired feedback response to procollagen propeptides. Am J Phys Soc 1993; 264:157-62.

Iredale JP. Models of liver fibrosis: Exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. Jour Clin Invest 2007; 117: 539-47.

Ishikawa K, Mochida S, Masiva S, Inao M, Matsui A, Ikeda H, Ohno A. Expression of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis. Biochem Biophys Res Commun 1999; 27: 587-93.

Juncker-Voss M, Prosl H, Lussy H, Enzenberg U, Auer H, Nowwotny N. Serological detection of *Capillaria hepatica* by indirect immunofluorescence assay. J Clin Microbiol 2000; 38: 431-3.

Kalluri R, Sukhatme VP. Fibrosis and angiogenesis. Review Article. Curr Opin Nephrol Hypert 2000; 9(4):413-8.

Kanta J, Kuasnickorá E, Bartos F. Prolonged reduction of hepacyte proliferative ability in rats after a single treatment with carbon tetrachloride. Int J Exp Pathol 1992; 73: 1-6.

Kerbel RS. Inhibition of tumour angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anticancer therapeutic agents. Bioessays 1991; 13: 31-6.

Kerbel RS, Vilorio-Petit A, Okada FF, Rak J. Establishing a link between oncogenes and tumor angiogenesis. Mol Med 1998 4: 286-95.

Kerbel RS; Folkman J. Clinical Translation of Angiogenesis Inhibitors. Nat Rev 2002; 2: 727-39.

Koeppel TA, Trauner M, Baas JC, Thies JC, Schlosser SF, Posy S, Gebhard MM, Herfarth C, Boyer JL, Otto G. Extrahepatic biliary obstruction impairs microvascular perfusion and increases leukocyte adhesion in rat liver. *Hepatology* 1997; 26(5): 1085-91.

Kinnman N, Hultcrantz R, Barbu V. PDGF-mediated chemoattraction of stellate cell by bile duct segments in cholestatic liver injury. *Lab Invest* 2000;80:697-707.

Kinnman N, Housset C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7:d496-503. Review.

Kinnman N, Francoz C, Barbu V. The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cell distinct from hepatic stellate cell is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Lab Invest* 2003; 83:163-173.

Lai WK, Adams, DH. Angiogenesis and chronic inflammation; the potential for novel therapeutic approaches in chronic liver disease. Editorial. *J Hepatol* 2005 ; 42: 7-11.

Legg W. Biliary Cirrhosis. *St. Bart's Hosp. Rev.* 9 :161, 1873. (Dissertação de Mestrado de Maria Vilma Matos Jurema Medeiros)

Lemos QT, Magalhães-Santos IF, Andrade ZA. Immunological basis of septal fibrosis of the liver in *Capillaria hepática*-infected rats. *Braz J Med Biol Res* 2003 ; 36 :1201-07.

Leveen P, Pekín M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C. Mice deficient of PDGF B show renal, cardiovascular and hematological abnormalities. *Genes Dev* 1994; 8: 1875-87.

Lima CB, Iglesias KB, Andrade ZA. Thalidomide failed to inhibit angiogenesis and fibrosis in hepatic schistosomiasis of the mouse. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2007; 102: 883-85.

Loeffler DA, Lundy, SK, Singh KP, Gerard HC, Hunson AP, Boros DI. Soluble egg antigens from *Schistosoma mansoni* induce angiogenesis-related processes by up-

regulating vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Infect Dis* 2002; 185: 1650-6.

Loréal O, Levavasseur F, Fromaget C, Gros D, Guillouzo A, Clément B. Cooperation of Ito cells and hepatocytes in the deposition of an extracellular matrix in vitro. *Am J Pathol* 1993; 143: 538-544.

Ma XM, Wang YL, Pan B R. The development of researches on VEGF. *Shijie Huaren Zazhi* 1999; 7: 695-696.

Macswween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ. *Pathology of the liver*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987. p. 342-63.

Marler JJ. Successful anti-angiogenic therapy of giant cell angioblastoma with interferon- α 2 β : report of two cases. *Pediatrics* 2002; 109: 1-2.

Martinez-Hernandez A, Martinez J. The role of capillarization in hepatic failure: studies in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Hepatology* 1991; 14: 864-74.

Martinez-Hernandez A. The hepatic extracellular matrix. I. Electron immunohistochemical studies in normal rat liver. *Lab Invest* 1984; 51: 57-74.

Martinez-Hernandez A. The hepatic extracellular matrix. II. Electron immunohistochemical studies in rats with CCl₄ -induced cirrhosis. *Lab. Invest* 1985; 53: 166-86.

Mcgree JOD, Patrick RS. The Role of perisinusoidal cells in Hepatic fibrogenesis. An Electron Microscopic study of acute carbon tetrachloride liver injury. *Inter Acad Pathol* 1972; 26: 429.

Maher JJ. Cytokines: Overview. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 109-115.

Myren JS, Bang P, Stave RL, Hassen LE, Dolva LO, Serck Há. et al. Liver cell necrosis and regeneration following injections of tetrachloride. Effects of the thyrotropin-releasing hormone and somatostatin. *APMIS* 1989; 97: 334-42.

Miyazaki H, Van EP, Roskams T, De Vos R, Desmet VJ. Transient expresión of tenascin in experimentally induced cholestatic fibrosis in rat liver: An immunohistochemical study. *J Hepathol* 1993; 19: 353-66.

Mustonen T, Alitalo K. Endotelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol* 1995; 129: 895-8.

Nagy JA, Dvorak AM, Devorak HF. VEGF-A and the induction of Pathological Angiogenesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2007; 2: 251-75.

Nakano M. Early morphological changes of porcine serum-induced hepatic fibrosis. *Acta Pathol Jpn* 1986; 36(3): 415-22.

Naves MM, Moreno FS. Diferenciação celular: Importância na hepatocarcinogênese e papel modulador do β -caroteno. *Revista Brasileira de Cacerologia* 2000;46:389-99.

Nakata M, Nakamura K, Koda Y, Kaminou T, Ugami M, Kaneda K, Yamada R. Hemodynamics in the microvasculature of thioacetamide-induced cirrhotic rat livers. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 652-6.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13: 9-22.

Nyindo M, Farah IO. The baboon as a non-human primate model of human schistosomose infection. *Parasitol Today* 1999; 12: 478-82.

Ogata T. Biliary Cirrhosis. *Beitr. Pathol. Anat.* 55 :236, 1913 (Dissertação de mestrado de Maria Vilma Matos Jurema Medeiros)

Orellana M, Rodrigo R, Thielemann L, Guajardo V. Bile duct ligation and oxidative stress in the rat: effects in liver and Kidney. *Comp. Biochem. Physiol Part C* 2006; 126: 105-11.

Paronetto F, Popper H. Chronic liver injury induced by immunologic reactions. Cirrhosis following immunization with heterologous sera. Am J Pathol 1966; 49(6): 1087-10.

Perez-Tamayo R, Montfort L, Gonzalez E. Collagenolytic activity in experimental cirrhosis of the liver. Exp Mol Pathol 1987; 47: 300-8.

Piazza R, Corrêa MOA, Fleury Rn. Sobre um caso de infecção humana por *Capillaria hepática*. Rev Inst Méd Trop São Paulo 1963; 5: 37-41.

Pinedo H M, Verheul HM, D'ámato RJ, Folkman J. Involvement of platelets in tumour angiogenesis? Lancet 1998; 352: 1775-7.

Popper H, Udenfriend S. Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic observations. Am J Med 1970; 49: 707-72.

Proctor E, Chatamara K. Standardized micronodular cirrhosis in the rat. Eur Surg Res 1984; 16: 182-6.

Rajkumar VS, Howell K, Csiszar K, Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. Arthritis Res Ther 2005; 7: 1113-1123.

Rak J, YU JI, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. J Invest Dermatol Symp Proc 2000; 5: 24-33.

Rak J, YU JI, Kerbel RS, Coomber BL. What do oncogenic mutations have to do with angiogenesis / vascular dependence of tumors? Cancer Res 2002; 62: 1931-34.

Ramadori G. The stellate cell (Ito-cell, fat-storing cell, lipocyte, perisinusoidal cell) of the liver. New insights into pathophysiology of an intriguing cell. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1991; 61(3):147-58. Review.

Ramadori G. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest* 2004; 84(2):153-9. Review.

Rappaport AM, Mac Phee PI, Fisher MM, Phillips MJ. The scarring of the liver acini (cirrhosis): Three-dimensional and microcirculatory consideration. *Virch Arch Pathol Anat* 1983; 402: 107-37.

Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 1:7: 808-26.

Robbins SL, Contran RS. Lesão celular e morte celular. In: *Patologia-Estrutural e Funcional*. Rio de Janeiro: Interamericana 1983. p.18-30.

Rosa H. Controlled production of cirrhosis in the rats liver. *Arq Gastroenterol* 1991; 28: 39.

Rosmorduc O, Wendum D, Corpechot C, Galy B, Sebbagh N, Raleigh J, Housser C. Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. *Am J Pathol* 1999; 155: 1065-73.

Rubin E, Hutterer F, Popper H. Experimental hepatic fibrosis without hepatocellular regeneration. A kinetic study. *Am J Pathol* 1968; 52(1): 111-20.

Sadun EH, Lichtenberg F, Cheever AW, Erikson DG. Schistosomiasis mansoni in the chimpanzee. The natural history of chronic infections after single and multiple exposures. *Am J Trop Med Hyg* 1970; 19:258-77.

Sancho-Bru P, Bataller R, Gasull X, Colmenero J, Khurdayan V, Gual A, Nicolás JM, Arroyo V, Ginès P. Genomic and functional characterization of stellate cells isolated from human cirrhotic livers. *J Hepatol*. 2005 Aug;43(2):272-82.

Sawamura R, Fernandez, MIM, Peres LC, Galvão C, Goldani HAS, Jorge SM, Rocha GM Souza NM. Hepatic Capillarization in children: Report of 3 cases in Brazil. Am J Med Hyg 1999; 61: 642-7.

Schaffner F, Popper H. Capillarization of hepatic sinusoids in man. Gastroenterology 1963; 44: 239-42.

Schaper W, Ito WD. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. Circ Res 1996; 79: 911-919,

Schiff L, Schiff ER. Diseases of the liver. Philadelphia: JB Lippincott, 1993.

Sciot R, Staessen D, Van Dame B, Van Steenberg W, Fevery J, Groote DJ et al. Incomplete septal cirrhosis: histopathological aspects. Histopathology 1988; 13: 593-603.

Seljelid R, Jozefowski S, Sveinbjornsson B. Tumor stroma. Anticancer Res 1999; 19: 4809-22.

Settles B, Stevenson A, Wilson K, Mack C, Ezell T, Davis MF, Taylor LD. Down-regulation of cell adhesion molecules LFA-1 and ICAM-1 after *in vitro* treatment with the anti-TNF- α agent thalidomide. N Cell Mol Biol 2001; 47: 1105-14.

Shi J, Aisakik K, Ikawa Y, Wakek. Evidence of Hepatocyte Apoptosis in Rat Liver after The Administration of Carbon Tetrachloride. Am J Pathol 1998; 153: 515-25.

Shiga A, Shirota K, Ikeda T, Nomura Y. Morphological and immunohistochemical studies on porcine serum-induced rat liver fibrosis. J Vet Med Sci 1997; 59(3):159-67.

Shiga A, Shirota K, Nishita T, Nomura Y. Study on the pathogenesis of porcine serum-induced liver fibrosis in rats with special reference to the effects of hypertension. J Vet Med Sci 1998; 60(1):29-34.

Shibuya M. Role of VEGF-flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. Adv. Cancer Res 1995; 67: 281-316.

Sidky YA, Borden EC. Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumour- and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer Res* 1987; 47: 5155-61.

Silva LM, Ribeiro Dos Santos R, Soares MB, Andrade ZA. Characterization of the vascular changes in schistosomal portal (pipestem) fibrosis of mice. *Acta Trop* 2006; 98(1): 34-42.

Slaton JW, Perrotte P, Inoue K, Dinney CPN, Fidler IJ. Interferon- α -mediated down-regulation of angiogenesis-related genes and therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and achedule. *Clin. Cancer Res* 1999; 5: 2726-34.

Souza MM, Silva LM, Barbosa JR, Oliveira IR, Parana R, Andrade ZA. Hepatic capillariasis in rats: a new model for testing antifibrotic drugs. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 1329-34.

Souza MM, Junior MT, Assis BCA, Gonzales ACO, Silva TMC, Andrade ZA. Pathogenesis of septal fibrosis of the liver. An experimental study with a new model. *Pathol Res Pract* 2006; 883-9.

Symmers WSTC. Note on a new form of liver cirrhosis due to presence of the ova of *Bilharzia haematobia*. *J Pathol Bacteriol* 1904; 9: 237-9.

Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, Lewis CE. Currentes methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int. J. Exp. Path* 2004;85:233-48.

Stenger RJ. Hepatic sinusoids in carbon tetrachloride-Induced cirrhosis-Na electron Microscopic Stude. *Arch Pathol* 1966; 81:439.

Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis. A Review. *Semin Liver Dis* 1990; 10: 56-65.

Tuchweber B, Desmoulière A, Bochaton-Pillat ML, Rubia-Brandt L, Gabbiani G. Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest* 1996; 74(1): 265-78.

Ueno T, Nakamura T, Torimura T, Sata M. Angiogenic cell therapy for hepatic fibrosis. *Med Mol Morphol* 2006; 39: 16-21.

Vaubourdolle M, Guffet V, Guecho J, Ballet F, Jaillon P, Giboudeau J. Evidence of the intact hepatocyte theory in alcoholic cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24: 467-74.

Yanconpoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-8.

Yamane A, Seetharam L, Yamaguchi S, Gotoh N, Takahashi T, Neufeld G et al. A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1). *Oncogene* 1994; 9:2683-90.

Yan JC, Chen WB, Ma Y, Shun XH. Expression of vascular endothelial growth factor in liver tissues of hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zaah* 1999; 7: 837-40.

Yokoi Y, Namihisa T, Matsuzaki K, Miazaki A, Yamaguchi Y. Distribution of Ito cells in experimental hepatic fibroses. *Semin Liver Dis* 1988; 8 : 48-52.

Warren KS. The pathogenesis of "clay-pipe atem cirrhosis" in mice with chronic schistosomiasis mansoni, with a note on the leneevity of the schistosomiase. *Am J Pathol* 1966; 49:477-89.

Winwood PJ, Arthur MJ. Kupffer cells: Their activation and role in animal models of liver injury and human liver disease. *Semin Liver Dis* 1993; 30: 50-9.

Walsh DA, Pearson CI. Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases, *Arthritis Res* 2001; 3: 147-53.

WU J, Norton PA. Animal models of liver fibrosis (Review). *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 1137-43.

L557

Lemos, Queli Teixeira

Angiogênese e fibrose hepática experimental / Queli Teixeira Lemos.
– Rio de Janeiro, 2008.

xii, 73 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e
Molecular, 2008.

Bibliografia: f. 57-73

1. Fibrose. 2. Angiogênese. 3. Modelos experimentais. I. Título.

CDD 616.362