



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CIRROSE HEPÁTICA E SUA REGRESSÃO:
ENFOQUE NA CAPILARIZAÇÃO SINUSOIDAL**

YÁNNICK DE OLIVEIRA FONSECA

Salvador
2011

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

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

**CIRROSE HEPÁTICA E SUA REGRESSÃO:
ENFOQUE NA CAPILARIZAÇÃO SINUSOIDAL**

YÁNNICK DE OLIVEIRA FONSECA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Área de Concentração em Biologia Celular, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Zilton de Araújo Andrade

Salvador
2011

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador

F676c Fonseca, Yánnick de Oliveira
Cirrose hepática e sua regressão: enfoque na capilarização sinusoidal [manuscrito] / Yánnick de Oliveira Fonseca. 2011.
73 f. : il.

Datilografado (fotocópia).
Mestrado (dissertação) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2011.
Orientador: Prof. Dr. Zilton de Araújo Andrade, Laboratório de Patologia Experimental.

1. Fígado. 2. Cirrose. 3. Fibrose. 4. Lesões vasculares.
5. Tetracloroeto de carbono. I. Título.

CDU 616.36-004

“CIRROSE HEPÁTICA E SUA REGRESSÃO: ENFOQUE NA CAPILARIZAÇÃO SINUSOIDAL”

YÁNNICK DE OLIVEIRA FONSECA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Daniel Abensur Athanázio
Professor Adjunto
UFBA



Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos
Pesquisador Titular
CPqGM / FIOCRUZ

Aos meus pais, pelo amparo, dedicação e exemplo.

Às minhas irmãs, pelos momentos compartilhados e valores que construímos juntos.

À Maria e à minha tia Jaci, pelo desvelo que nunca será esquecido.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Zilton Andrade, pela confiança e apoio ao longo dos anos de nossa convivência, por sua paciência e disponibilidade, pelo exemplo de cientista-professor e por todo o aprendizado que obtive sob sua orientação. Meu respeito e admiração.

À Dra. Márcia Souza, pela atenção com a qual sempre fui considerado ao longo de nosso convívio e por ter intermediado diversas situações nesse período.

À Manuela Caldas, por sua participação efetiva neste trabalho, por todo o apoio e pela amizade que construímos.

À Ana Cristina Gonzalez, por ter realizado a técnica de imunofluorescência e pela alegre convivência.

A Antônio Carlos Santos, por sua disposição em ajudar e por seu auxílio nas atividades rotineiras do Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX).

Ao Dr. Jackson Costa, coordenador do curso de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa (PgBSMI), pela atenção com a qual recebeu e considerou o pedido de inclusão de meu orientador ao corpo docente do referido curso, apresentando-o ao seu colegiado.

À Vanessa Nardy, por ter intermediado o contato entre mim e Dr. Jackson, ajudando-me com o cadastramento de meu orientador junto ao curso de PgBSMI.

À equipe de Microscopia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), especialmente à Dra. Maria Lucia Moreno e ao Dr. Cláudio Figueira, pela orientação e ajuda imprescindíveis à realização da técnica de microscopia eletrônica.

À equipe do Serviço de Histotecnologia do CPqGM, particularmente Cláudia Zubieta, Elisângela Dias e Elmir Silva, pela realização das técnicas histológicas.

À equipe do Biotério do CPqGM, particularmente à Rejane Menezes, pelos cuidados referentes aos animais utilizados neste trabalho.

Ao biólogo André Macêdo e ao biomédico Joaquim Pereira, por terem colaborado nas fases iniciais do projeto que deu origem a este trabalho.

Aos estudantes do LAPEX sob orientação de Dr. Zilton Andrade, entre os quais Elisângela Santos, Samaly Souza, Filip Polli, João Miranda, Florisvaldo Ramos e Thiago Pereira; à Dra. Maria Lourdes Vallve e aos seus estudantes Everton Batista, Marcelo Silva, Juliana Argôlo e Isabela Núñez. Meus agradecimentos pelo agradável convívio que tivemos e pelo coleguismo ao longo do mestrado.

À Dra. Sônia Andrade e aos funcionários do Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular (LACEI), pela disponibilidade de acesso a esse laboratório, e, também, aos seus estudantes Lorena Magalhães, Isa Moraes, Jorge Nihei, Márcio Almeida, Marcos Guerreiro, Mônica Rebouças, Renata Portella e Karina Garbelotto, pelo coleguismo e pelo bom convívio que tivemos.

À Mirela Castelo Branco e à Adivã Campos, pelo auxílio referente às questões burocráticas do CPqGM.

Ao Dr. Eduardo Ramos e à Dra. Delvone Almeida, por suas críticas e sugestões por ocasião do meu exame de qualificação.

Ao Dr. Aryon Barbosa, pela mensuração morfométrica apresentada neste trabalho e por suas sugestões quanto à análise estatística.

À Tâmara Nogueira, por todo carinho, apoio e compreensão, assim como por sua ajuda tanto ao longo do mestrado quanto na elaboração desta dissertação.

Aos professores e aos colegas do mestrado, pelo suporte dado em sala de aula e nos laboratórios.

Aos funcionários da Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna, especialmente à Martha Berbert e à Ana Maria Fiscina Sampaio, pela atenção com a qual sempre fui atendido e pela ajuda na obtenção de artigos citados nesta dissertação.

À Coordenação de Ensino do curso de PgBSMI, especialmente à Taise Caires, por sua presteza e competência exemplares.

Aos funcionários de todos os setores do CPqGM, pela ajuda dispensada.

Ao CPqGM e ao curso de PgBSMI, pelo apoio institucional e concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por intermédio do Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde (PAPES), pelo apoio financeiro.

Poderíamos ser muito melhores se não quiséssemos ser tão bons.

Sigmund Freud

FONSECA, Yánnick de Oliveira. Cirrose hepática e sua regressão: enfoque na capilarização sinusoidal. 73 f. il. Dissertação (Mestrado) – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2011.

RESUMO

Os achados morfológicos peculiares da cirrose hepática são representados por suas alterações vasculares, que ocorrem junto com a transformação nodular do parênquima do fígado. Essas alterações são fundamentais para explicar a fisiopatologia da cirrose. Como é sabido, o fígado é o órgão central do metabolismo intermediário; sua circulação interna permite o intercâmbio de macromoléculas que são transformadas e trocadas durante etapas bioquímicas fundamentais em todo o corpo; para tais funções, a existência de sinusóides hepáticos peculiarmente adaptados é crucial. As peculiares alterações vasculares vistas na cirrose hepática têm sido consideradas irreversíveis. O presente estudo se propôs a investigá-las em ratos induzidos à cirrose pelo tratamento com tetracloreto de carbono (CCl_4) após intervalos de tempo seguintes à sua interrupção. As mudanças estruturais das alterações sinusoidais foram particularmente estudadas por meio de técnicas histológicas, de imunofluorescência para laminina e de microscopia eletrônica de transmissão, quatro a seis meses após a interrupção do CCl_4 . Durante esse tempo, os nódulos regenerativos tornaram-se progressivamente alargados, enquanto o septos relacionados a eles tornaram-se delicados e fragmentados, especialmente em amostras coletadas seis meses após a interrupção do tratamento. Nossos achados estão de acordo com a sugestão de que, após a interrupção do tratamento durante quatro a seis meses, as mudanças de capilarização sinusoidal vistas na cirrose do rato induzida pelo CCl_4 tendem a reverter ao normal com o tempo, apesar da persistência da estrutura nodular do parênquima hepático, as quais estão de acordo com a sugestão de que a cirrose é funcionalmente, embora não morfológicamente, reversível.

Palavras-chave: Fígado. Cirrose. Fibrose. Lesões vasculares. Tetracloreto de carbono.

FONSECA, Yánnick de Oliveira. Liver cirrhosis and its regression: focus on sinusoidal capillarization. 73 f. il. Dissertação (Mestrado) – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2011.

ABSTRACT

Peculiar morphologic findings from hepatic cirrhosis are represented by its vascular changes, which runs along with the nodular transformation of the parenchyma. Such changes are fundamental to explain the physiopathology of cirrhosis. As it is well known, the liver is the central organ of intermediate metabolism. Its internal circulation allows for the exchanges of macromolecules which are transformed and exchanged during fundamental biochemical steps throughout the body; for such functions the existence of peculiarly-adapted fenestrated hepatic sinusoids is crucial. Peculiar vascular alterations seen in hepatic cirrhosis have been considered irreversible. Present study was concerned with investigating vascular changes in carbon tetrachloride (CCl₄)-induced cirrhosis in rats after intervals of times following interruption of CCl₄ treatment. The structural changes from sinusoidal alterations were particularly studied by means of histological, transmission electron microscopy and immunofluorescent technique for laminin, four to six months following discontinuation of CCl₄ treatment. During that time the regenerative nodules were seen to become progressively enlarged while their related septa became delicate and fragmented, especially in samples taken six months after treatment discontinuation. Our findings are in keeping with the suggestion that, following interruption of treatment during four to six months, the changes of sinusoidal capillarization seen in CCl₄-induced rat cirrhosis tended to revert to normal with time, in spite of the persistence of the nodular arrangement of the liver parenchyma, which are in agreement with the suggestion that cirrhosis is functionally, although not morphologically, reversible.

Keywords: Liver. Cirrhosis. Fibrosis. Vascular lesions. Carbon tetrachloride.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Desenho experimental	34
Gráfico 1	Área seccional da marcação fluorescente positiva para laminina de amostras de fígado coletadas em diferentes períodos pós-tratamento	39
Figura 2	Aspectos macroscópicos da superfície dos fígados em diferentes períodos após a interrupção do tratamento	41
Figura 3	Fotomicrografias ópticas de seções hepáticas coletadas logo após a interrupção do tratamento	42
Figura 4	Fotomicrografias ópticas de seções hepáticas coletadas quatro e seis meses após a interrupção do tratamento	43
Figura 5	Marcação para laminina em seções hepáticas observadas ao microscópio de fluorescência	44
Figura 6	Ultraestrutura de sinusóides hepáticos observados por microscopia eletrônica de transmissão	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação morfométrica de área seccional da marcação fluorescente positiva para laminina de amostras de fígado coletadas em diferentes períodos pós-tratamento	39
----------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	JUSTIFICATIVA	16
1.2	PROBLEMA	17
1.3	HIPÓTESE	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	FIBROSE HEPÁTICA.....	20
2.2	CIRROSE.....	22
2.2.1	Definição de cirrose	22
2.2.2	Alterações vasculares na cirrose	24
2.2.2.1	Fístulas vasculares hepáticas	25
2.2.2.2	Capilarização dos sinusóides hepáticos.....	26
2.3	REGRESSÃO DA FIBROSE E DA CIRROSE	27
2.4	O MODELO DO TETRACLORETO DE CARBONO.....	29
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	32
4.2	ANIMAIS.....	32
4.3	MODELO EXPERIMENTAL	32
4.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	33
4.4.1	Grupo I	33
4.4.2	Grupos II e III	34
4.5	TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	35
4.6	IMUNOFLOURESCÊNCIA	35
4.7	MORFOMETRIA.....	35
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36

4.9	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	36
5	RESULTADOS	37
5.1	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	37
5.1.1	Grupo I	37
5.1.2	Grupos II e III	38
5.2	ANÁLISE DA IMUNOFLUORESCÊNCIA	38
5.2.1	Grupo I	38
5.2.2	Grupos II e III	39
5.3	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL.....	40
5.3.1	Grupo I	40
5.3.2	Grupos II e III	40
6	DISCUSSÃO	46
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

O fígado é um órgão vital com uma variedade de funções, dentre as quais vias metabólicas cruciais, síntese de proteínas, desintoxicação e secreção biliar, entre outras. Indispensáveis à sobrevivência de um indivíduo, elas são realizadas, principalmente, pelos hepatócitos. A preservação dessas funções e das propriedades do fígado revela-se inteiramente dependente de elementos distintos da vasculatura hepática (ROBSON, 2011).

A vasculatura hepática é única em todos os níveis — desde o influxo e efluxo de sangue, a partir de vasos calibrosos, até os detalhes pertencentes à microvasculatura e aos sinusóides hepáticos (ROBSON, 2011). Nesse contexto, a doença hepática leva a importantes alterações nos elementos organizativos da vasculatura do fígado e, por conseguinte, no seu fluxo sanguíneo através dos sistemas venosos portal e hepático, assim como do sistema arterial hepático (BOSCH e ABRALDES, 2011; JAIN e WEST, 2011; LIM e GARCIA-TSAO, 2011). As perturbações resultantes concorrem para o agravamento da disfunção hepatocelular.

Várias doenças hepáticas crônicas culminam em um estágio final descrito como cirrose, no qual o fígado perde sua estrutura acinar para se tornar nodular. A cirrose está entre as dez causas de morte mais comuns no mundo ocidental, sendo seu estudo essencial para a saúde humana (LALEMAN et al., 2006). Só nos Estados Unidos, ela foi a décima principal causa de morte para os homens e a décima segunda para as mulheres, em 2001, matando cerca de 27.000 pessoas por ano (ANDERSON e SMITH, 2003). No Brasil, foram notificadas até o ano de 2000, em média, 12.800 mortes por ano (LOIOLA, 2000 apud PASSOS et al., 2010).

Considerações éticas limitam procedimentos em seres humanos. Por essa razão, são necessários modelos animais que reproduzam o quadro patológico da cirrose (LALEMAN et al., 2006). Dentre os modelos experimentais descritos na literatura científica, o mais extensamente utilizado para responder aos problemas da cirrose é o do rato submetido ao tratamento repetido pelo tetracloreto de carbono (PEREZ TAMAYO, 1983).

No processo de cirrose, ocorre uma profunda alteração da vasculatura hepática, bem como uma subversão da estrutura e uma mudança da ecologia dos elementos celulares do fígado (POPPER, 1977). Dentre as alterações vasculares presentes no fígado cirrótico, a capilarização dos sinusóides hepáticos (SCHAFFNER e POPPER, 1963) merece atenção especial. Por transformar esses sinusóides em verdadeiros capilares contínuos, ela priva, em maior ou menor grau, os hepatócitos do contato com sua matéria prima — proveniente da região esplâncnica, por intermédio da circulação porto-mesentérica — (POPPER, 1977), contribuindo de modo decisivo para a consequência clínica mais grave da cirrose: a insuficiência hepática.

Nas últimas décadas, houve inúmeros avanços sobre a biologia celular e molecular do fígado. Isso contribuiu para a discussão de um tópico tão interessante quanto controverso da hepatologia: o potencial de reversão da cirrose hepática em pacientes com essa doença crônica do fígado (FRIEDMAN e BANSAL, 2006).

Para discutir a possibilidade de reversão da cirrose, no entanto, é necessário que fique claro o que se está discutindo. Não se deve confundir cirrose com fibrose, uma vez que esta é apenas um dos componentes daquela (MCCORMICK, 2011). Muitos estudos, contudo, têm abordado o problema da reversão da cirrose atendendo-se, tão somente, ao seu componente fibrótico. Dessa maneira, o importante complexo de alterações vasculares que acompanha essa doença tem sido ignorado (WANLESS, 2010).

1.1 JUSTIFICATIVA

O processo patológico mais discutido da cirrose ainda é a fibrose hepática progressiva, entretanto, as alterações na micro e macrovasculatura do fígado têm sido apontadas como elementos fundamentais para explicar a fisiopatologia dessa doença, incluindo lesões como a capilarização dos sinusóides hepáticos (SCHAFFNER e POPPER, 1963; WISSE et al., 1985; ONORI et al., 2000).

As alterações vasculares do fígado cirrótico têm despertado crescente interesse, mas pouco se sabe ainda sobre sua relação com as principais

complicações — como a hipertensão da veia porta e a insuficiência hepática — e, por conseguinte, sobre sua implicação prognóstica (MAEDA et al., 2008). Assim, evidencia-se a necessidade de caracterização mais detalhada sobre os aspectos arquiteturais e celulares dessas alterações.

Dados experimentais do nosso grupo de pesquisa (DI VINICIUS et al., 2005) indicaram que a cirrose é clinicamente reversível, mas anatomicamente persistente. No processo de regressão, os nódulos regenerativos se expandiram e os septos fibrosos ficaram mais finos e muitas vezes fragmentados, incompletos — quatro meses após a interrupção do tratamento com o tetracloreto de carbono.

Embora o padrão das lesões vasculares na cirrose hepática, humana ou experimental, seja bem conhecido, não há, ainda, estudos que mostrem qual o padrão vascular da cirrose após sua regressão ou reversão. O presente estudo visa a contribuir para essa área.

1.2 PROBLEMA

O que acontece com a capilarização dos sinusóides hepáticos quando a cirrose exhibe sinais de regressão?

1.3 HIPÓTESE

A capilarização dos sinusóides hepáticos é desfeita quando a cirrose regride.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O fígado humano é um órgão que apresenta um elevado fluxo sanguíneo, com dupla circulação aferente. Ele é perfundido com aproximadamente 1.050mL de sangue por minuto através da veia porta e com 300mL de sangue por minuto pela artéria hepática, algo equivalente a 27% do débito cardíaco (GUYTON e HALL, 2006).

A artéria hepática é um ramo do tronco celíaco; já a veia porta é formada pelas veias mesentérica superior e esplênica, além das veias tributárias gástricas esquerda e direita (NETTER, 2008). Assim, o sangue venoso que chega ao fígado é proveniente dos intestinos, do pâncreas, do baço e do estômago. Esse fluxo é crucial para o desempenho do papel do fígado nas funções orgânicas, pois ele carrega diretamente para tal órgão tanto nutrientes quanto fármacos recém-lançados na circulação mesentérica.

O fluxo da artéria hepática é importante para a oxigenação do fígado; o sangue da veia porta, no entanto, embora seja incompletamente saturado com oxigênio, supre cerca de 60% a 70% das necessidades de oxigênio do fígado (PORTH, 2004; KHALILI e NGUYEN, 2010).

A veia porta forma um leito capilar especializado no interior do fígado, onde o sangue venoso se mistura ao arterial. Esse leito constitui os sinusóides hepáticos, os quais são delimitados por placas de hepatócitos anastomosadas, geralmente com uma camada de espessura. Nos sinusóides, o sangue converge para a veia central do lóbulo hepático; as veias centrolobulares convergem para formar as veias sublobulares e o sangue retorna para a veia cava inferior, seguindo pelas veias coletoras e pelas veias hepáticas (KIERSZENBAUM, 2008).

Embora as mudanças patológicas no fígado sejam normalmente descritas em relação ao lóbulo clássico, essa não é a única interpretação conceitual sobre a arquitetura do parênquima hepático. O conceito clássico de lóbulo hepático (KIERNAN, 1833), baseado em parâmetros estruturais, descreve como unidade funcional do fígado uma estrutura, normalmente hexagonal, em cuja periferia estão

espaços-porta e, no centro, um ramo da veia porta, a veia centrolobular, para a qual convergem os sinusóides hepáticos.

O conceito de lóbulo portal (MALL, 1906) é baseado na função glandular exócrina do fígado. Nessa unidade funcional, também hexagonal, as veias hepáticas terminais são os limites, enquanto o espaço-porta é o eixo central, cujo ducto biliar drena a bile do parênquima hepático circunjacente.

Estudos minuciosos da microvasculatura hepática modificaram essa visão clássica e, em 1954, a proposta do ácino de Rappaport (RAPPAPORT, 1954) foi apresentada. No ácino hepático, os limites são determinados por um ramo terminal da artéria hepática, que drena o sangue para as veias terminais opostas. A direção desse fluxo determina um gradiente metabólico entre os hepatócitos situados no espaço entre a área periportal e a área de drenagem, o qual é dividido em três zonas.

Essa proposta é interessante para explicar diversas lesões hepáticas que apresentam distribuição zonal (ALVES e MELLO, 2006). Além disso, ela tem sido apropriada para o entendimento de padrões de regeneração hepática, de atividades metabólicas e do desenvolvimento de cirrose (KIERSZENBAUM, 2008).

Inconsistências na proposta de Rappaport, porém, foram identificadas a partir de estudo detalhado da arquitetura vascular hepática (MATSUMOTO et al., 1979). Assim, um novo conceito foi proposto: o lóbulo primário de Matsumoto, uma subunidade microvascular cônica do lóbulo clássico de Kiernan. Segundo esse conceito, seis lóbulos primários compõem um lóbulo clássico (lóbulo secundário). Cada lóbulo primário, perfundido por ramos terminais da veia porta e da artéria hepática, tem a forma de um cone com vértice na veia centrolobular.

Esses lóbulos primários, posteriormente, foram renomeados para “subunidades microvasculares hepáticas”. Demonstrou-se que elas consistem em um grupo de sinusóides abastecidos por uma única vênula e sua arteríola associada, a partir do espaço-porta adjacente (EKATAKSIN, ZOU et al., 1995 apud BUREAU, PÉRON e VINEL, 2007).

2.1 FIBROSE HEPÁTICA

A expressão fibrose hepática é utilizada para descrever a deposição extensiva de tecido fibroso que ocorre no fígado. Ela acontece após destruição tecidual substancial e decorre de um desequilíbrio entre as atividades hepáticas fibrogênicas e fibrolíticas (KUMAR et al., 2008b). A fibrose é uma resposta evolutiva altamente conservada para limitar o dano tecidual e serve como uma resposta genérica à lesão hepática crônica, independentemente da etiologia (FALLOWFIELD e IREDALE, 2004). Para Pinzani e Vizzutti (2008), a deposição de matriz extracelular fibrilar é a mais simples, a mais rápida e a única solução. Além disso, esse é um processo que, eventualmente, tem a “intenção de tratar”, visando preservar a continuidade do tecido.

A fibrose hepática é caracterizada por alterações quantitativas e qualitativas na matriz extracelular hepática normal, algo que é dado por uma proeminente expressão de colágenos formadores de fibrilas, principalmente os tipos I, III e IV (IREDALE et al., 1998), acompanhada por uma redução acentuada da atividade de collagenases que promovem a degradação da matriz fibrosa. Assim, a manutenção dessas alterações remodela, progressivamente, a matriz hepática normal associada aos espaços perissinusoidal e/ou periportal para uma matriz fibrosa (GIELING, BURT e MANN, 2008).

O fígado tem vários tipos celulares capazes de sintetizar e depositar os componentes de sua matriz extracelular. A célula estrelada hepática, no entanto, é considerada o principal deles no seu processo de fibrose, pois o postulado de que ela pode ser o precursor das células responsáveis pela síntese excessiva de matriz extracelular e fibrose hepática (POPPER e UENFRIEND, 1970) foi confirmado em uma série de estudos.

Uma resposta inicial à lesão hepática é a infiltração de células inflamatórias (linfócitos, granulócitos e monócitos/macrófagos), ligação à camada endotelial e transmigração através do revestimento sinusoidal para o parênquima (IMHOF e DUNON, 1995; BUTCHER e PICKER, 1996; LEY, 1996). Essas células inflamatórias participam na iniciação e progressão da fibrose hepática, liberando mediadores (TGF- β , TNF- α , PDGF, entre outros) que estimulam a síntese de componentes da

matriz extracelular (colágenos, elastina, proteoglicanos e proteínas de constituição) em células estreladas hepáticas (BERNUAU, ROGIER e FELDMANN, 1982; 1984; GRESSNER e BACHEM, 1994; GRESSNER, 1995).

A ativação das células estreladas hepáticas é uma resposta de reparo tecidual primária à lesão hepática de vários tipos. Ativadas, elas transdiferenciam-se em um fenótipo semelhante a um miofibroblasto. Esse processo inclui a perda progressiva de retinóides, proliferação, expressão de α -actina de músculo liso e aumento tanto da contratibilidade quanto da produção de matriz extracelular anormal.

Tanto a caracterização quanto o comportamento das células estreladas hepáticas na lesão do fígado têm sido bem descritos por meio de modelos *in vivo* e em cultura. O seu potencial de transdiferenciação, particularmente, vem sendo explorado em diversos experimentos *in vitro*, permitindo gerar evidências em relação aos mediadores e mecanismos de ativação e proliferação dessas células. Há diferenças, entretanto, entre as propriedades de células ativadas *in vitro* e *in vivo*, a exemplo do padrão de expressão gênica (DE MINICIS et al., 2007).

Embora a transdiferenciação de células estreladas hepáticas constitua a principal fonte de miofibroblastos hepáticos, outras origens celulares têm sido cada vez mais reconhecidas (HERNANDEZ-GEA e FRIEDMAN, 2011). Estudos sugerem que, assim como as células estreladas hepáticas, os miofibroblastos portais (WELLS, KRUGLOV e DRANOFF, 2004; JHANDIER et al., 2005; BEAUSSIER et al., 2007), os fibrócitos circulantes (KISSELEVA et al., 2006), a medula óssea (FORBES et al., 2004) e a transição celular epitélio-mesenquimal (KALLURI e NEILSON, 2003; ZEISBERG et al., 2007; CHOI e DIEHL, 2009) contribuem para a fibrose.

A fibrose hepática, em última análise, pode levar à cirrose (LEE e FRIEDMAN, 2011), contudo, apesar de o tecido fibroso ser um elemento essencial na transformação cirrótica do fígado, ele, *per se*, é desprovido tanto de efeitos funcionais significativos quanto clinicamente relevantes (VOIETA et al., 2010; PINZANI, ROSSELLI e ZUCKERMANN, 2011). Desse modo, a fibrose hepática não é suficiente para explicar a cirrose.

2.2 CIRROSE

A cirrose é convencionalmente caracterizada por parênquima nodular e fibrose generalizada, com necrose hepatocelular listada, às vezes, como um terceiro componente. Ela é mais bem descrita, no entanto, como o resultado da reconstrução anormal da arquitetura lobular preexistente (POPPER, 1977). Os componentes morfogenéticos principais na sua evolução são lesão parenquimatosa, atrofia, fibroplasia ativa e regeneração parenquimatosa nodular (RÖSSLE, 1930 apud DESMET, 1992).

A cirrose não é estritamente o estágio final da cicatrização hepática. Ela é, ao contrário, um processo dinâmico e bifásico; de um lado, dominado por fibrose progressiva do parênquima; de outro, por grave ruptura da arquitetura vascular e distorção da arquitetura lobular normal (CRAWFORD, 2007).

Segundo Popper, Elias e Petty (1952) e Popper (1977), as características morfológicas que melhor se correlacionam com as manifestações clínico-funcionais da cirrose são os nódulos regenerativos e os septos fibrosos que estabelecem fístulas porto-hepáticas. Os primeiros são porções circulares do parênquima, delimitadas por tecido conjuntivo, que correspondem a porções de um ou mais lóbulos; os segundos são membranas de tecido conjuntivo de diferentes espessuras que resultam de qualquer colapso do parênquima preexistente ou da formação de novas fibras de tecido conjuntivo (POPPER, 1977).

O processo de cirrose é iniciado, normalmente, com a necrose hepatocelular, mas só depois de ela ter ocorrido de forma suficientemente extensa ou repetida. Morte celular, porém, não define cirrose, uma vez que tal fenômeno pode ocorrer em qualquer tipo de lesão hepática.

2.2.1 Definição de cirrose

O termo “cirrose” foi usado pela primeira vez no século XIX, embora a doença referida por esse termo seja conhecida desde o século IV a.C., tendo sua

caracterização mais bem definida só após a introdução da Anatomia, no século XVI, e da Patologia, no século XVIII (SCHAFFNER e SIERATZKI, 1987 apud DESMET, 1992).

Em 1819, René Laennec publicou o seu clássico *De l'Auscultation Médiante*, onde cunhou o termo “cirrose” (LAENNEC, 1819). Tal nome foi dado a partir da palavra grega *kirrhos*, que significa amarelo acastanhado. Ele queria, então, se referir à cor amarelada que o fígado finamente nodular dos alcoólicos crônicos exibía ao ser examinado na mesa de necropsia, embora Laennec não tenha feito qualquer menção sobre o abuso de álcool. O termo, entretanto, foi interpretado, posteriormente, como sinônimo de um fígado duro, esquirroso, fibrosado, pois Laennec foi muito criticado pelo fato de a etimologia do nome “cirrose” dar ênfase à cor do órgão, e não à sua textura (DUFFIN, 1987; ANDRADE, 2005).

Definir cirrose, todavia, foi um problema até meados do século XX, quando houve, em 1956, uma conferência na cidade de Havana (Report of the board for classification and nomenclature of cirrhosis of the liver, 1956 apud POPPER e ZAK, 1958) para solvê-lo. Nesse encontro, foi estabelecido que o termo “fibrose” não deveria ser usado como sinônimo de “cirrose”. Uma classificação puramente morfológica, porém, foi generalizada nos anos subsequentes.

Havia uma tendência de se considerar a existência de dois tipos de cirrose, de acordo com o tamanho e a estrutura dos nódulos e segundo a espessura dos septos fibrosos (RUBIN e POPPER, 1967). Tal classificação, no entanto, não tinha significado algum, porque o mesmo tipo de cirrose poderia ser produzido por diferentes etiologias e a mesma etiologia poderia produzir diferentes tipos morfológicos de cirrose. Em outras palavras, a classificação morfológica nada acrescentava ao simples termo cirrose.

Ciente disso, um grupo internacional se reuniu para standardizar a nomenclatura e os critérios diagnósticos das doenças hepáticas (LEEVY, POPPER e SHERLOCK, 1977 apud ANDRADE, REESINK e MELRO, 1978). A partir de então, foi dada uma maior importância ao diagnóstico etiológico das cirroses, mais satisfatório por seu significado epidemiológico, prognóstico e terapêutico (ANDRADE, REESINK e MELRO, 1978).

Uma comissão da Organização Mundial de Saúde definiu, posteriormente, cirrose como “um processo difuso caracterizado por fibrose e pela conversão da arquitetura normal em nódulos estruturalmente anormais” (ANTHONY et al., 1978). Embora vigente, essa definição foi alvo de críticas pelo fato de ela não fazer referência às importantes alterações vasculares presentes na cirrose (RAPPAPORT et al., 1983).

O conceito mais aceito, atualmente, é o anatomoclínico. Do ponto de vista anatômico, a cirrose é caracterizada como uma condição que atinge todo o fígado e transforma sua estrutura em nódulos hepatocitários regenerativos de diâmetros variáveis, separados entre si por septos fibrosos de diferentes espessuras. O conceito clínico implica uma doença crônica do fígado que cursa com graus variáveis de insuficiência hepática e de hipertensão da veia porta (ANDRADE, 2005).

Nessa definição anatomoclínica, encontra-se, implicitamente, uma das particularidades mais importantes da cirrose: seu complexo de alterações vasculares.

2.2.2 Alterações vasculares na cirrose

O que realmente dá peculiaridade à cirrose não é só a fibrose difusa do fígado acompanhada de regeneração nodular do parênquima, mas as profundas alterações vasculares que a ela estão associadas (ANDRADE, 2005). Segundo Wanless (2010), a definição de cirrose em termos de acumulação de fibrose é baseada em estudos histológicos que têm ignorado a lesão vascular progressiva que acompanha essa doença.

As lesões vasculares são um componente crucial para a evolução do estado cirrótico (POPPER, 1977; RAPPAPORT et al., 1983) e acompanham os processos patogênicos básicos que atuam no desenvolvimento da cirrose (DESMET, 2005). Tais lesões, apontadas como elementos fundamentais para explicar a fisiopatologia da cirrose, resultam em distorção, conexões anômalas, compressão e mesmo obliteração dos vasos (BLENDIS e WONG, 2001; SCHUPPAN e AFDHAL, 2008).

Elas consistem na formação de fístulas vasculares intra-hepáticas (porto-hepática e artério-venosa) e extra-hepáticas (circulação colateral), arterialização do parênquima e capilarização dos sinusóides hepáticos (POPPER, ELIAS e PETTY, 1952; SCHAFFNER e POPPER, 1963).

As alterações da vasculatura do fígado cirrótico decorrem da transformação nodular a qual seu parênquima, originalmente acinar, é submetido. Nessas circunstâncias, os eventos de necrose hepatocelular resultam em uma perda focal de hepatócitos contíguos — a denominada “extinção do parênquima” (WANLESS, NAKASHIMA e SHERMAN, 2000).

2.2.2.1 Fístulas vasculares hepáticas

Quando uma região do parênquima torna-se extinta, ela colapsa de modo que um espaço-porta torna-se intimamente associado com uma veia hepática terminal adjacente (WANLESS et al., 1995). Nesse momento, muitos sinusóides são destruídos, mas alguns, situados nos septos fibrosos, mantêm-se permeáveis, comunicando-se diretamente com as veias hepáticas. Assim, a formação de septos fibrosos em ponte entre espaços-porta e veias hepáticas estabelece fístulas porto-venosas e artério-venosas. Estas, por sua vez, ignoram, efetivamente, o parênquima do fígado. O desvio de sangue resultante dessas conexões provoca alterações marcantes na dinâmica de fluidos (VARIN e HUET, 1985; PICCHIOTTI et al., 1994).

Na cirrose avançada, a maior parte do fluxo sanguíneo hepático parece passar através do fígado por essas fístulas (SHERMAN, PAPPAS e FISHER, 1990). Uma vez que tal fluxo é desviado através desses canais vasculares, o restante do parênquima hepático é deixado quase desprovido de uma fração notável de sangue. Isso explica o aumento do fluxo observado em sinusóides do fígado com cirrose, bem como a subperfusão relativa do parênquima hepático como um todo (VOLLMAR, SIEGMUND e MENGER, 1998). Desse modo, essas fístulas contribuem para a necrose hepatocelular em curso, assim como para a extinção do parênquima e para as lesões subsequentes.

Ademais, devido à resistência oferecida pelo fígado fibrosado ao fluxo sanguíneo portal, uma parte deste é desviado, ainda, para a circulação sistêmica, por circulação colateral, através de fístulas extra-hepáticas (porto-cava). O resultado de tudo isso é uma dificuldade na perfusão sanguínea do fígado.

2.2.2.2 Capilarização dos sinusóides hepáticos

Na cirrose, o parênquima do fígado torna-se predominantemente irrigado pelos ramos derivados da artéria hepática — fenômeno conhecido há muito tempo.

No início do século passado, Herrick (1907) perfundi fígados de cadáver e demonstrou que a resistência ao fluxo na artéria hepática de fígados cirróticos foi marcadamente diminuída. Moschowitz (1952), décadas depois, empregou, pela primeira vez, o termo capilarização para descrever a aparência histológica de arterialização no fígado cirrótico como uma resposta do tecido de granulação, ou seja, o crescimento arterial em tecido inflamado. Schaffner e Popper (1963), posteriormente, usaram esse termo para designar um conjunto de alterações ultraestruturais nos sinusóides do fígado cirrótico.

No fígado normal, os sinusóides hepáticos não possuem uma membrana basal e exibem fenestras com cerca de 160nm de diâmetro e porosidade aproximada entre 6% e 10% ao longo da superfície microvascular hepática (WISSE, 1970; 1972). No fígado cirrótico, entretanto, os sinusóides hepáticos sofrem modificações estruturais devido à arterialização do parênquima hepático. Submetidos à alta pressão do fluxo sanguíneo arterial, eles passam a exibir um endotélio contínuo, não mais fenestrado, e adquirem uma membrana basal sobre a qual se acomodam. Essas modificações podem ser explicadas pela lei de Thoma, a qual preceitua que as paredes de um vaso têm espessura proporcional à pressão existente no seu interior (ANDRADE e FERRAZ, 1971). Desse modo, os sinusóides hepáticos tornam-se semelhantes a um capilar comum.

Um dos componentes mais importantes da membrana basal é a laminina. Ela é uma grande glicoproteína (1000kD) e, no fígado normal, é produzida por células estreladas e células endoteliais. A laminina promove adesão, migração,

diferenciação e crescimento celulares (KLEINMAN et al., 1986; CARLEY, MILICI e MADRI, 1988; HERBST et al., 1988; CASTRONOVO, TARABOLETTI e SOBEL, 1991; MCGUIRE et al., 1992), além de ser um importante mediador da formação do capilar por células endoteliais (KUBOTA et al., 1988; GRANT et al., 1989; GRANT et al., 1991).

No decurso da capilarização dos sinusóides hepáticos, há, ainda, aumento do número e da espessura dos feixes de colágeno nos espaços perissinusoidais de Disse, achatamento das vilosidades no pólo vascular dos hepatócitos e aumento de diâmetro dos hepatócitos tumefeitos (SCHAFFNER e POPPER, 1963; STENGER, 1966). Além disso, acontecem mudanças nas interações célula-célula e célula-matriz nos sinusóides hepáticos (WISSE et al., 1985).

2.3 REGRESSÃO DA FIBROSE E DA CIRROSE

Já não há mais dúvidas sobre a capacidade do fígado em reabsorver seu tecido cicatricial (PINZANI, ROSSELLI e ZUCKERMANN, 2011). Sabe-se hoje que a fibrose hepática é um processo dinâmico e bidirecional (FALLOWFIELD e IREDALE, 2004), a todo momento ela está sendo alterada e remodelada.

Inúmeros estudos demonstraram a regressão significativa da fibrose do fígado sob condições experimentais, seja em modelos nutricionais (GYORGY e GOLDBLATT, 1949), por toxicidade pelo tetracloreto de carbono (RUBIN, HUTTERER e POPPER, 1963; IREDALE et al., 1998) ou etionina (HUTTERER, RUBIN e POPPER, 1964), obstrução do ducto biliar (ABDEL-AZIZ et al., 1990; ZIMMERMANN et al., 1992) ou na esquistossomose (ANDRADE, COX e CHEEVER, 1993; DUNN et al., 1994), entre outros.

Evidências semelhantes também foram obtidas em todo o espectro de doenças hepáticas humanas, dentre as quais hepatite autoimune (DUFOUR, DELELLIS e KAPLAN, 1997), obstrução biliar (HAMMEL et al., 2001), hemocromatose (MURETTO, ANGELUCCI e LUCARELLI, 2002), esteatohepatite não alcoólica (DIXON et al., 2004; KRAL et al., 2004) e hepatite viral (SHIRATORI et al., 2000;

KWEON et al., 2001; POYNARD et al., 2002; DIENSTAG et al., 2003; FARCI et al., 2004).

A regressão da fibrose hepática requer a perda de células fibrogênicas, bem como a degradação da matriz extracelular e a remodelação arquitetônica do fígado. Segundo Hernandez-Gea e Friedman (2011), a apoptose de células estreladas ativadas é a melhor explicação validada para a referida regressão (ISSA et al., 2004). Isso é facilitado pela estimulação de receptores de morte nessas células, assim como pela diminuição dos níveis de fatores para a sua sobrevivência (SCHINONI e PARANA, 2006).

As evidências que favorecem essa hipótese, contudo, embora sejam bem caracterizadas em modelos experimentais em ratos — a exemplo da indução de fibrose por CCl₄ e por ligadura do ducto biliar —, ainda são limitadas na doença humana (HERNANDEZ-GEA e FRIEDMAN, 2011). Além disso, células estreladas hepáticas de humanos apresentam níveis relativamente elevados de Bcl-2 em relação aos níveis presentes em ratos e são, portanto, menos suscetíveis à apoptose, pondo em questão a relevância da apoptose na doença humana (NOVO et al., 2006).

A degradação da matriz extracelular por meio da ação de metaloproteinases é, também, um importante mecanismo atuante na regressão da fibrose hepática. Prova disso está em camundongos que expressam uma forma de colágeno tipo I resistente à colagenase. Nesses animais, a regressão da fibrose é diminuída, ressaltando a importância da degradação de matriz extracelular (ISSA et al., 2003).

Os dados sobre a regressão da fibrose se acumularam ao longo de décadas, dando espaço à discussão sobre a regressão da cirrose. Tal discussão ganhou credibilidade (DESMET e ROSKAMS, 2004) e numerosos relatos clínicos foram apresentados indicando que com a remoção da causa da cirrose, os sinais e sintomas de pacientes com essa doença podem regredir (BUNTON e CAMERON, 1963; WILLIAMS et al., 1969; YEONG, NICHOLSON e LEE, 1982; WANLESS, NAKASHIMA e SHERMAN, 2000).

Esses relatos incluem pacientes cuja cirrose, em pleno desenvolvimento, resultou em uma forma de cirrose septal incompleta ou em redução ou ausência aparente de fibrose após tratamento bem sucedido de hemocromatose hereditária

(POWELL e KERR, 1970; BLUMBERG et al., 1988), hepatite autoimune (DUFOUR, DELELLIS e KAPLAN, 1997), doença de Wilson (FALKMER, SAMUELSON e SJOLIN, 1970), hepatites virais crônicas B e C (ARTHUR, 2002; POYNARD et al., 2002; MASSARRAT, FALLAHAZAD e KAMALIAN, 2004), entre outras causas.

A regressão da cirrose, entretanto, é mais complicada do que a regressão da fibrose. Dependendo da causa subjacente da doença hepática e de sua gravidade, pode levar anos para que uma regressão significativa seja alcançada (BATALLER e BRENNER, 2005), algo tão demorado que, do ponto de vista da sobrevivência humana, pode ser admitido como irreversível (DESMET e ROSKAMS, 2004). Assim, a cirrose e suas alterações vasculares têm sido consideradas, tradicionalmente, como irreversíveis (SCHUPPAN e AFDHAL, 2008).

2.4 O MODELO DO TETRACLORETO DE CARBONO

O tetracloreto de carbono (CCl_4) é um protótipo de droga que lesa as células indiretamente, após sua conversão em um intermediário reativo. Essa modificação, em geral, é realizada pelas oxidases de função mista P-450 no retículo endoplasmático liso do órgão onde a reação metabólica ocorre, usualmente o fígado (SHI et al., 1998; SUN et al., 2001).

A consequência mais importante do metabolismo do CCl_4 é a formação do radical livre tóxico triclorometil (CCl_3^+). Ele causa a peroxidação autocatalítica dos fosfolípidos de membrana, com rápida degradação do retículo endoplasmático (RECKNAGEL et al., 1989). Em menos de 30min após exposição ao CCl_4 , há um declínio de síntese protéica hepática de enzimas e proteínas plasmáticas; dentro de 2h, observa-se tumefação e desprendimento dos ribossomos no retículo endoplasmático liso (KUMAR et al., 2008a).

A diminuição na síntese de receptores de proteínas lipídicas leva ao acúmulo intracelular de triglicerídeos, visíveis como gotículas claras no citoplasma das células lesadas. Essa reação ao CCl_4 é reversível, se a exposição for breve e em baixas doses. Altas doses ou exposições prolongadas, entretanto, podem causar a morte celular.

A extensa peroxidação da membrana plasmática lesa sua barreira de permeabilidade iônica, levando a um massivo influxo de sódio e água que resulta em edema celular, algo potencialmente reversível. A peroxidação da membrana, porém, leva também ao influxo de cálcio para dentro da célula, resultando na desnaturação protéica com aparência histológica de necrose de coagulação. Em contraste com o edema celular, o influxo de cálcio, secundário ao extenso dano na permeabilidade da membrana citoplasmática, é um evento irreversível (TSUKAMOTO, MATSUOKA e FRENCH, 1990; WU e NORTON, 1996).

Em 1936, Cameron e Karunaratne relataram que a administração repetida de CCl_4 em ratos resulta em cirrose (CAMERON e KARUNARATNE, 1936). Embora precedido por outros (LAMSOM e WING, 1926; BOLLMAN e MANN, 1931; LACQUET, 1932), esse estudo sistemático estabeleceu a morfologia e padronizou as condições experimentais do modelo. Desde então, a cirrose induzida pelo CCl_4 tem sido objeto de muitos estudos com ratos e com outras espécies animais, assim como diferentes vias de administração e doses dessa droga. A maioria deles baseia-se, explícita ou implicitamente, na aceitação da cirrose induzida pelo CCl_4 como um modelo experimental adequado para a cirrose do homem (PEREZ TAMAYO, 1983).

Apesar de o fígado dos ratos apresentar uma aparência mais lobulada em relação àquele da espécie humana, há uma correspondência entre os seus lobos e os setores hepáticos do fígado humano. Ambas as espécies pertencem à classe dos mamíferos e, portanto, apresentam desenvolvimento embriológico semelhante (LANGSCH et al., 2009), fator que contribui para o rato servir de modelo experimental.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a capilarização dos sinusóides hepáticos e a possibilidade de sua regressão em ratos com cirrose induzida pelo tetracloreto de carbono (CCl₄).

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Estudar a estrutura das alterações sinusoidais (capilarização) por meio de técnicas histológicas, de imunofluorescência para laminina e de microscopia eletrônica de transmissão para a demonstração morfológica da membrana basal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo e os procedimentos descritos a seguir foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM).

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados 30 ratos noruegueses (*Rattus norvegicus*) da linhagem albina Wistar, provenientes do biotério do CPqGM, local onde foram mantidos ao longo de todo o estudo. Esses animais permaneceram em gaiolas convencionais e sob condições ambientais de umidade e temperatura controladas, com iluminação artificial mantida em ciclo claro-escuro de 12h. A água e a ração balanceada para ratos foram fornecidas em regime *ad libitum*.

4.3 MODELO EXPERIMENTAL

Os ratos foram tratados com tetracloreto de carbono (CCl_4) por 17 semanas. Com o objetivo de provocar indução enzimática e abreviar o tempo necessário para o desenvolvimento da cirrose, foi adicionado fenobarbital à dieta básica diária desses animais, diluído na água de beber, em uma concentração de 0,4g/L, duas semanas antes da primeira dose de CCl_4 e durante todo o experimento, até a dose final.

O tratamento com CCl_4 foi realizado de acordo com o descrito por Rosa e colaboradores (1991). Os animais foram tratados duas vezes por semana e cada

rato recebeu uma dose inicial de 0,04mL de CCl₄ em óleo mineral, administrada por via orogástrica. Antes de cada administração do CCl₄, os animais foram pesados; quando houve uma perda ponderal de 5% ou mais, a dose foi diminuída por 0,02mL (metade da dose inicial); quando houve um ganho ponderal de 5% ou mais, a dose foi acrescida de 0,02mL.

4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

4.4.1 Grupo I

Após a interrupção do tratamento, cinco ratos foram eutanasiados e dez, submetidos a uma hepatectomia parcial. Tais animais compuseram o grupo I.

Os animais eutanasiados foram anestesiados com solução de ketamina e xilazina — 2,5mL de ketamina : 0,5mL de xilazina : 1mL de solução salina 0,85% —, numa proporção de 0,2mL para cada 100g de massa corpórea, depois exsanguinados por seção da aorta abdominal. Nestes, uma parte do lobo direito lateral do fígado foi imediatamente removida, cujos fragmentos foram submetidos às técnicas histológicas, de imunofluorescência e de microscopia eletrônica de transmissão, objeto de maior detalhamento abaixo.

O aspecto da superfície do fígado desses animais foi documentado com fotos por meio de uma máquina fotográfica digital Sony Cyber-shot DSC-W50. Outras técnicas (não apresentadas) foram realizadas nesses animais, razão pela qual eles foram submetidos à eutanásia, e não à hepatectomia parcial.

Os animais submetidos à hepatectomia parcial também foram anestesiados segundo o descrito acima e, em condições de rigorosa assepsia, sofreram uma laparotomia, tendo o aspecto da superfície do fígado sido registrado de acordo com o descrito anteriormente. Foi coletada também desses ratos uma parte do lobo direito lateral do fígado, da qual se retirou um fragmento para exame histológico.

4.4.2 Grupos II e III

Dos dez animais submetidos à hepatectomia parcial após a interrupção do tratamento, pertencentes ao grupo I, cinco foram eutanasiados quatro meses depois e os outros cinco, seis meses depois — períodos suficientes para que as evidências de regressão da cirrose sejam observadas em ratos. Esses animais compuseram os grupos II e III, respectivamente. Tais ratos sofreram os mesmos procedimentos, inclusive as técnicas não apresentadas, aos quais foram submetidos os animais anteriormente eutanasiados logo após a interrupção do tratamento, pertencentes ao grupo I.

Cada animal serviu como seu próprio controle, uma vez que o material obtido por biópsia, aquando da realização da hepatectomia parcial, sempre foi comparado com o material obtido, posteriormente, por ocasião da eutanásia.

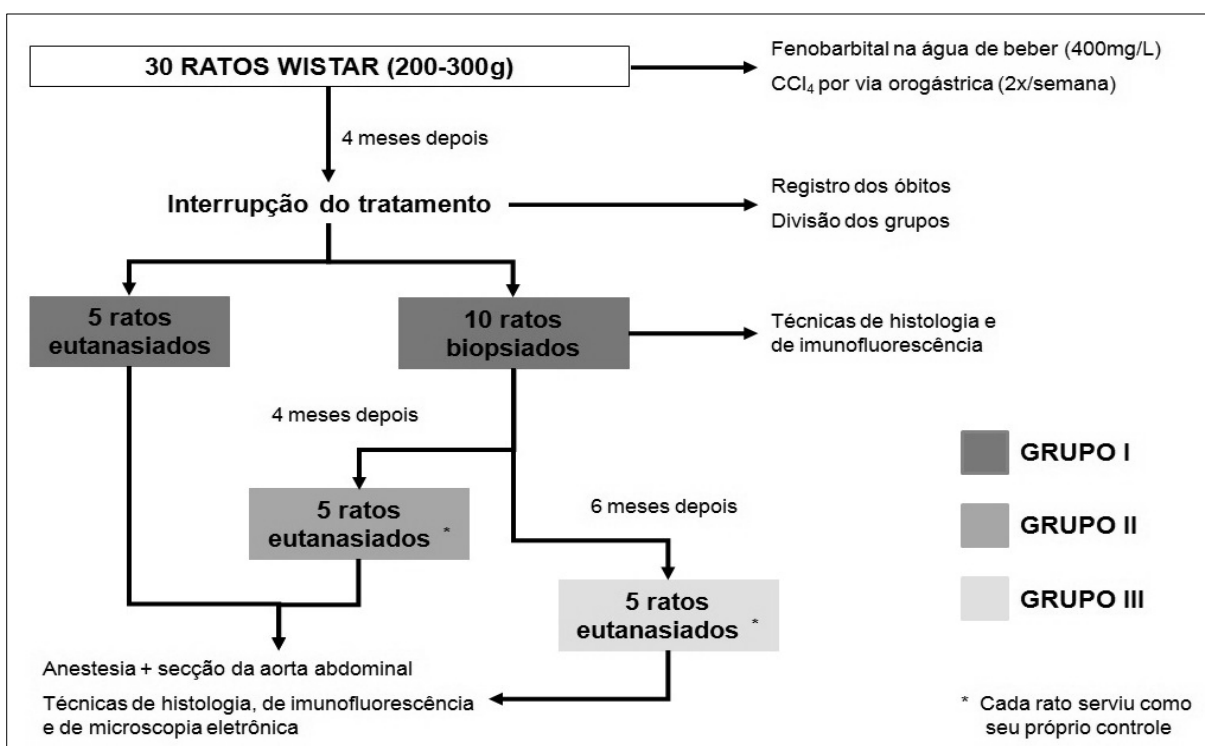


Figura 1 – Desenho experimental

4.5 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Os fragmentos de fígado foram fixados em formol Millonig (pH 7.4), depois desidratados, diafanizados e inclusos em parafina histológica. De cada bloco de parafina das amostras em análise, seções de 5 μ m de espessura foram cortadas em micrótomo. Elas foram coradas por hematoxilina e eosina (HE) para evidenciação de núcleos e componentes basófilos, em azul, e de citoplasma e componentes acidófilos, em rosa. A coloração por picrossírius vermelho, específica para fibras de colágeno, também foi empregada. As lâminas confeccionadas foram analisadas em microscópio óptico Zeiss Axioskop 2.

4.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os fragmentos de fígado coletados foram imediatamente criopreservados em nitrogênio líquido e acondicionados em recipientes estocados a -80°C. Esses fragmentos, posteriormente, foram seccionados em criostato a -20°C, fixados em acetona e hidratados em solução PBS com pH 7.4. O anticorpo anti-laminina foi utilizado como anticorpo primário diluído na proporção 1:100. O anticorpo secundário utilizado foi o anti-IgG de coelho fluoresceinado (SIGMA). Entre as reações, os cortes foram lavados em solução de PBS com pH 7.4. A visualização das lâminas confeccionadas foi realizada por meio de um microscópio de fluorescência Olympus BX51.

4.7 MORFOMETRIA

A estimativa quantitativa da marcação fluorescente positiva para laminina foi realizada em seção hepática obtida do lobo direito lateral dos animais sob análise — cinco de cada grupo experimental, num total de 15 amostras. Para a mensuração morfométrica em valores micrométricos e percentuais, uma área seccional total de 1,1

$\times 10^6 \mu\text{m}^2$, selecionada aleatoriamente de cada amostra, foi avaliada. As medições foram feitas por intermédio do programa de processamento e análise de imagens Leica QWin 3.11.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças entre as médias foram testadas por meio da análise de variância com um fator (ANOVA) complementada pelo pós-teste não-paramétrico de Newman-Keuls. Os resultados que revelaram $p < 0.05$ foram considerados significativos. Os dados foram calculados por meio do programa de análise estatística GraphPad Prism 5.01.

4.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Pequenos fragmentos de fígado foram imediatamente fixados, por imersão, em uma solução de glutaraldeído a 4%, em tampão cacodilato de sódio a 0,2M, com pH 7.4, na proporção de 1:1, por 1h, a 4°C, e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato a 0,3M, também na proporção 1:1, por 1h, a 4°C. Esses fragmentos foram lavados, rapidamente, em tampão cacodilato a 0,3M. Eles foram, em seguida, desidratados em um gradiente de acetonas, depois embebidos em resina polybed 812. Dentre os blocos obtidos após a polimerização da resina, foram selecionadas, aleatoriamente, amostras de dois casos de cada grupo experimental; os cortes ultrafinos foram coletados, montados em grades de cobre e contrastados com citrato de chumbo e acetato de uranila. Tais grades foram examinadas em um microscópio eletrônico Zeiss EM-109.

5 RESULTADOS

O modelo experimental foi satisfatório em demonstrar a cirrose nos animais submetidos ao tratamento com fenobarbital e tetracloreto de carbono (CCl₄). Todos eles, logo após a interrupção do tratamento, apresentaram o quadro morfológico de cirrose esperado.

Ao término do experimento, foi contabilizada uma perda amostral de 50%, correspondente a 15 óbitos. Destes, dez (33,33%) ocorreram ao longo do período de tratamento. Devido ao tempo indeterminado entre a sua ocorrência e a sua identificação, a interpretação de sua possível etiologia foi comprometida. Os outros cinco (16,67%) óbitos ocorreram após o período de tratamento e foram resultantes de complicações decorrentes do procedimento cirúrgico ao qual os animais foram submetidos. Assim, 15 animais estiveram disponíveis para os estudos morfológicos.

Os animais do grupo I apresentaram um fígado de cor relativamente opaca, consistência endurecida e aspecto granular difuso, visível em sua superfície externa (vide figura 2A). Os ratos dos grupos II e III exibiram um fígado de superfície mais ou menos lisa e brilhante, quando comparados àqueles do grupo I, além de consistência relativamente macia (vide figura 2B e 2C).

5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

5.1.1 Grupo I

As técnicas histológicas evidenciaram, no grupo I, o comprometimento difuso da arquitetura do fígado. Sua estrutura acinar foi subvertida a uma estrutura nodular, a qual incluiu a deposição difusa de colágeno nos espaços-porta e no parênquima, o espessamento de traves hepáticas e a perda de veias centrolobulares (vide figura 3A, 3B, 3C e 3D). A fibrose se deu sob a forma de septos, delimitando os nódulos regenerativos e, frequentemente, esteve presente nas áreas perissinusoidais (vide

figura 3E e 3F). Os hepatócitos apresentaram sinais de alterações degenerativas, especialmente tumefação e esteatose (vide figura 3C e 3D). A presença ocasional de infiltrado mononuclear em focos isolados do parênquima e nos espaços-porta foi registrada (vide figura 3C).

5.1.2 Grupos II e III

Foi constatada uma melhora no quadro de cirrose nos grupos II e III, comparativamente ao grupo I. Nestes, foram encontradas áreas do parênquima de aspecto próximo ao normal, com traves hepáticas com uma célula de espessura (vide figura 4A, 4B e 4C). A estrutura nodular, no entanto, persistiu, tanto no grupo II quanto no grupo III, tendo ocorrido um adelgaçamento com fragmentação dos septos fibrosos, tornando os nódulos pouco evidentes. Estes, quando presentes, tornaram-se expandidos e delimitados por finos septos fibrosos (vide figura 4D e 4E), comparativamente aos resultados do grupo I. Ademais, foi registrada a ausência de fibrose perissinusoidal (vide figura 4F), achado evidente nos animais do grupo I. As mudanças inflamatórias e degenerativas desapareceram.

5.2 ANÁLISE DA IMUNOFLOURESCÊNCIA

5.2.1 Grupo I

A exibição da membrana basal, por meio da marcação fluorescente positiva para laminina, em seções hepáticas do grupo I, permitiu revelar uma rica rede vascular nos nódulos regenerativos (vide figura 5A). Os vasos estavam presentes tanto no seu interior quanto dentro dos septos fibrocelulares que os delimitavam (vide figura 5B). Foi observado, também, no interior desses nódulos, um depósito aumentado de laminina no espaço entre as traves e os sinusóides hepáticos (vide figura 5C).

5.2.2 Grupos II e III

Comparativamente ao grupo I, os grupos II e III apresentaram uma diminuição significativa (vide tabela 1, gráfico 1 e figura 5D e 5E) da marcação fluorescente positiva para laminina, sobretudo nas áreas perissinusoidais (vide figura 5F). Alguns vasos, contudo, persistiram dentro dos finos septos fibrosos (vide figura 5D, 5E e 5F). Não houve diferenças significativas entre os grupos II e III (vide tabela 1 e gráfico 1).

Tabela 1 – Avaliação morfométrica de área seccional da marcação fluorescente positiva para laminina de amostras de fígado coletadas em diferentes períodos pós-tratamento

Variáveis	Período pós-tratamento (meses)		
	0	4	6
Área seccional (μm^2)	498.019 \pm 228.735	149.397 \pm 53.450**	194.478 \pm 52.489**
Área seccional (%)	10,8 \pm 4,9	3,2 \pm 1,3**	4,0 \pm 1,3**

Valores apresentados em média \pm desvio padrão; n = 5 ratos por grupo; ** diferenças entre o grupo I (0 meses) e os grupos II (4 meses) e III (6 meses) foram significativas ($p < 0,01$).

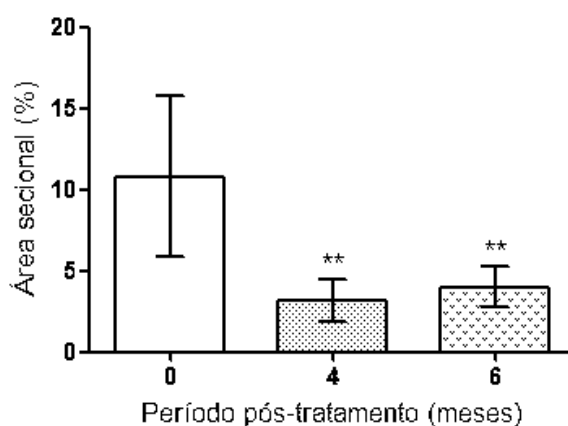


Gráfico 1 – Área seccional da marcação fluorescente positiva para laminina de amostras de fígado coletadas em diferentes períodos pós-tratamento

n = 5 ratos por grupo; ** diferenças entre o grupo I (0 meses) e os grupos II (4 meses) e III (6 meses) foram significativas ($p < 0,01$).

5.3 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

5.3.1 Grupo I

Ao microscópio eletrônico, foi possível observar, com riqueza de detalhes, as alterações nos sinusóides hepáticos. Estes, nos nódulos cirróticos, exibiram endotélio contínuo e sem fenestras, além de uma membrana basal, semelhante a um capilar comum (vide figura 6A, 6B, 6C e 6D) — fenômeno descrito como capilarização dos sinusóides hepáticos.

5.3.2 Grupos II e III

Problemas técnicos impediram a análise do material coletado quatro meses após a interrupção do tratamento. Seis meses após a interrupção do tratamento, no entanto, constatou-se o desaparecimento da membrana basal nas amostras analisadas. Os sinusóides hepáticos apresentaram endotélio fenestrado e pólo vascular de hepatócitos com vilosidades exuberantes (vide figura 6E e 6F).

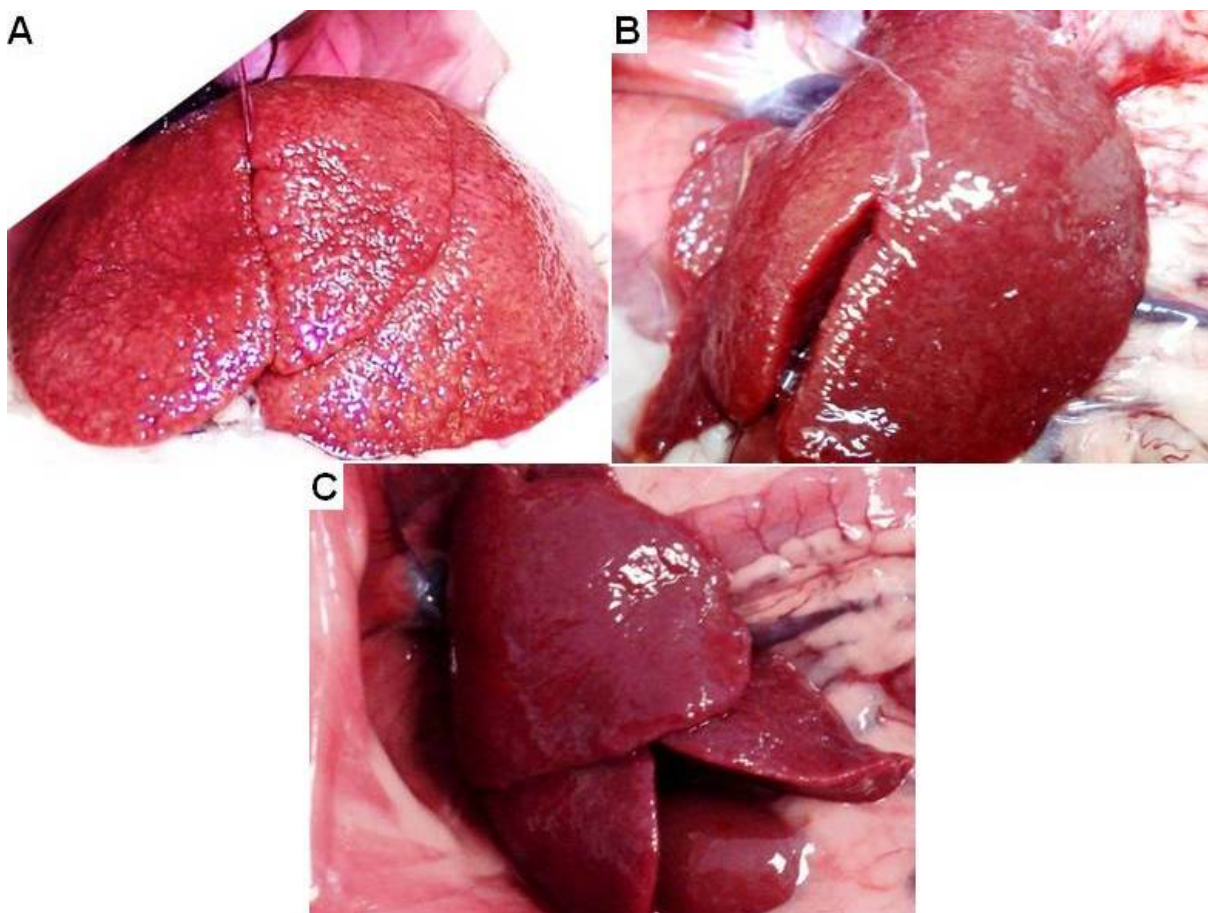


Figura 2 – Aspectos macroscópicos da superfície dos fígados em diferentes períodos após a interrupção do tratamento

A – Fígado com superfície opaca de notável granulosidade difusa uniforme, no qual se registra espessamento da cápsula, logo após a interrupção do tratamento. **B** e **C** – Fígados com cápsula menos espessada, cuja superfície mais ou menos lisa tende a assumir brilho e coloração normais, quatro e seis meses pós-tratamento, respectivamente.

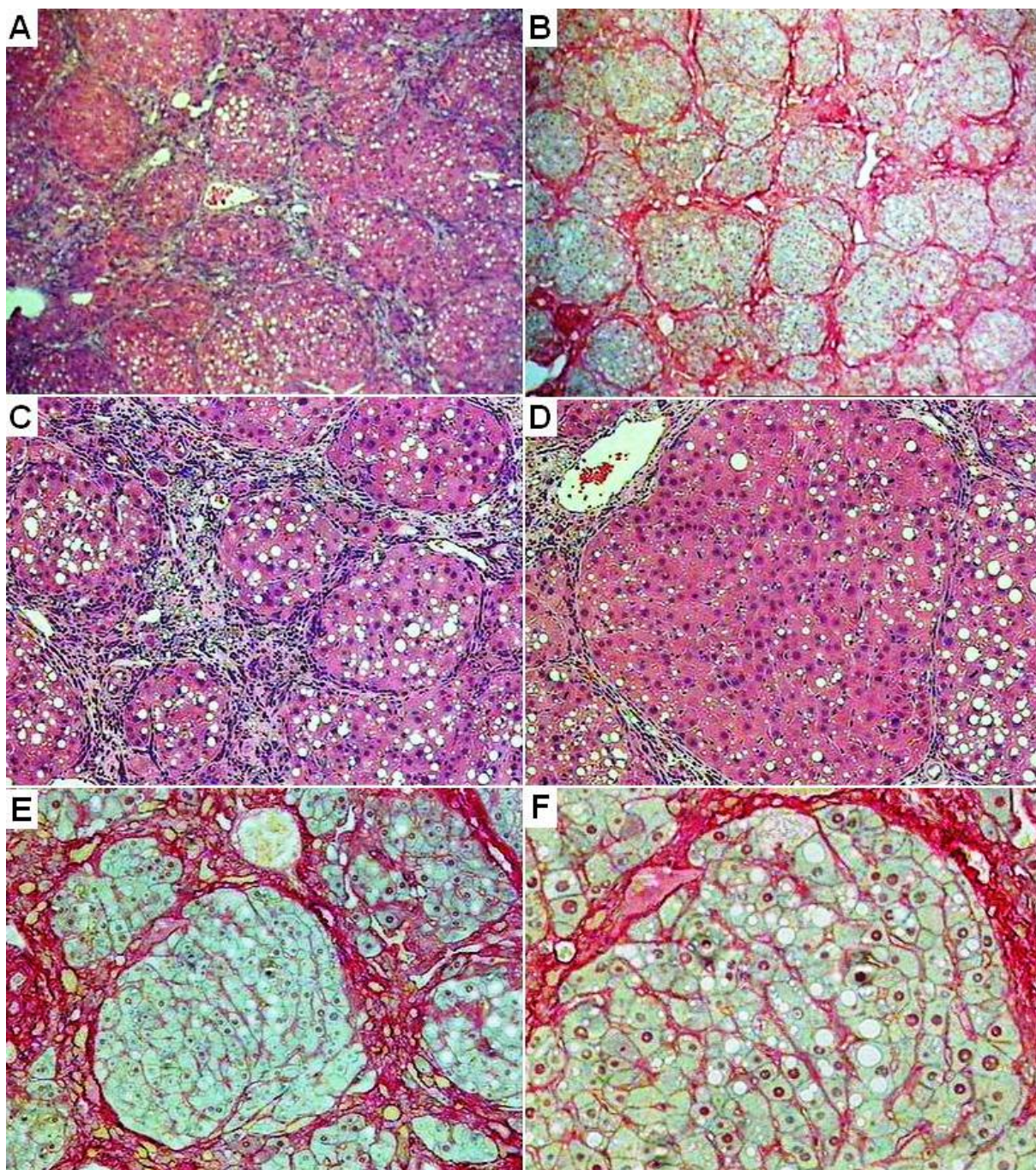


Figura 3 – Fotomicrografias ópticas de seções hepáticas coletadas logo após a interrupção do tratamento

A (HE, 10x) e **B** (Picrossírius, 10x) – Parênquima com nódulos regenerativos delimitados por septos fibrosos. **C** (HE, 100x) – Infiltrado mononuclear e esteatose. **D** (HE, 100x) – Hepatócitos tumefeitos em travess hepáticas espessadas e veia centrolobular ausente no interior de um nódulo regenerativo. **E** (Picrossírius, 100x) – Fibrose perissinusoidal no interior de nódulos regenerativos. **F** (Picrossírius, 200x) – Detalhe de E.

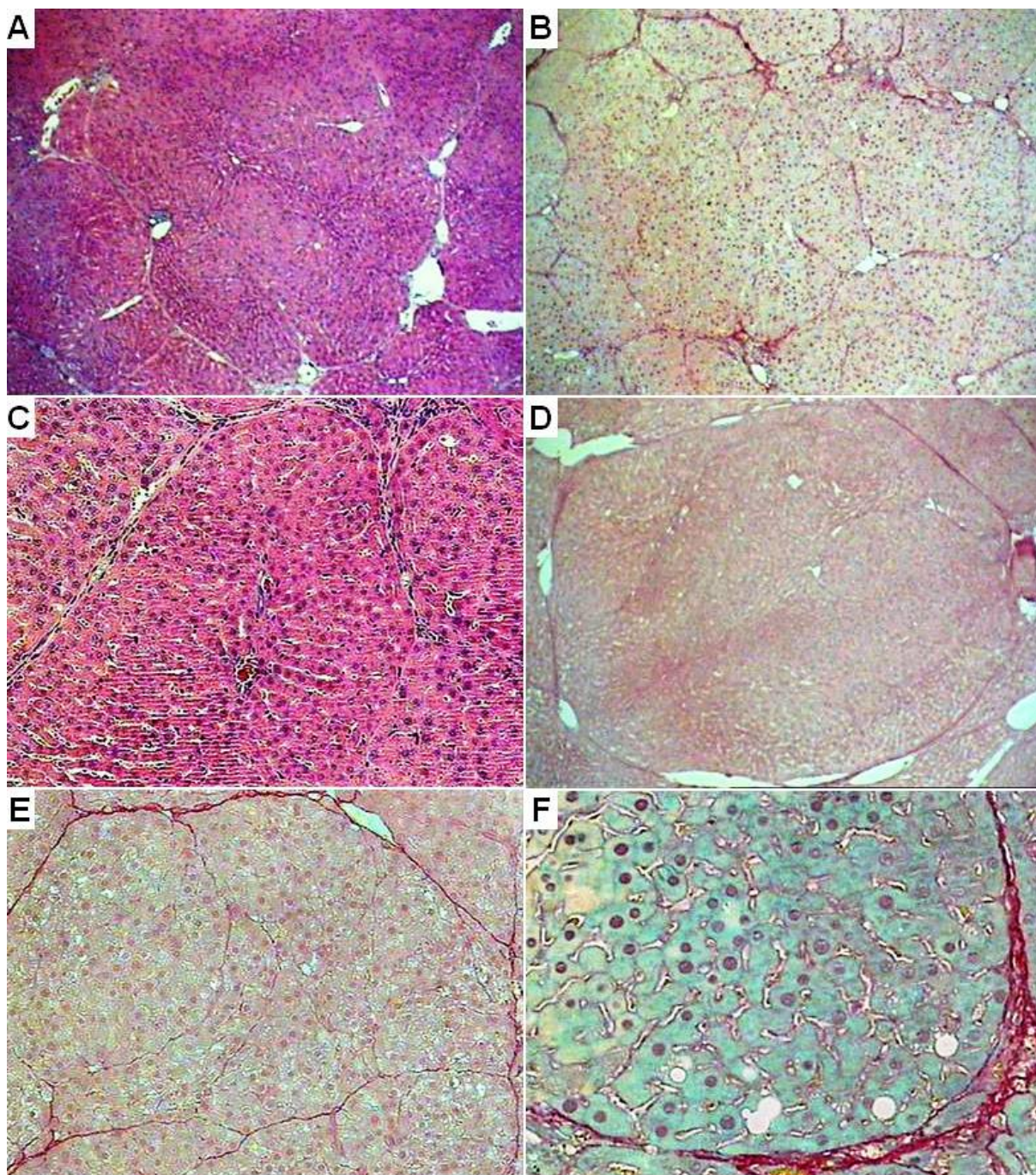


Figura 4 – Fotomicrografias ópticas de seções hepáticas coletadas quatro e seis meses após a interrupção do tratamento

A (HE, 10x) e **B** (Picrossírius, 10x) – Parênquima ainda com estrutura nodular, quatro meses após a interrupção do tratamento, onde são observados adelgaçamento e fragmentação dos septos fibrosos. **C** (HE, 100x) – Área de aspecto próximo ao normal com veia centrolobular e com traves hepáticas constituídas por uma célula de espessura. **D** (Picrossírius, 10x) e **E** (Picrossírius, 100x) – Nódulos regenerativos expandidos delimitados por finos septos fibrosos, quatro e seis meses pós-tratamento, respectivamente. **F** (Picrossírius, 200x) – Ausência de fibrose perissinusoidal evidenciada seis meses pós-tratamento.

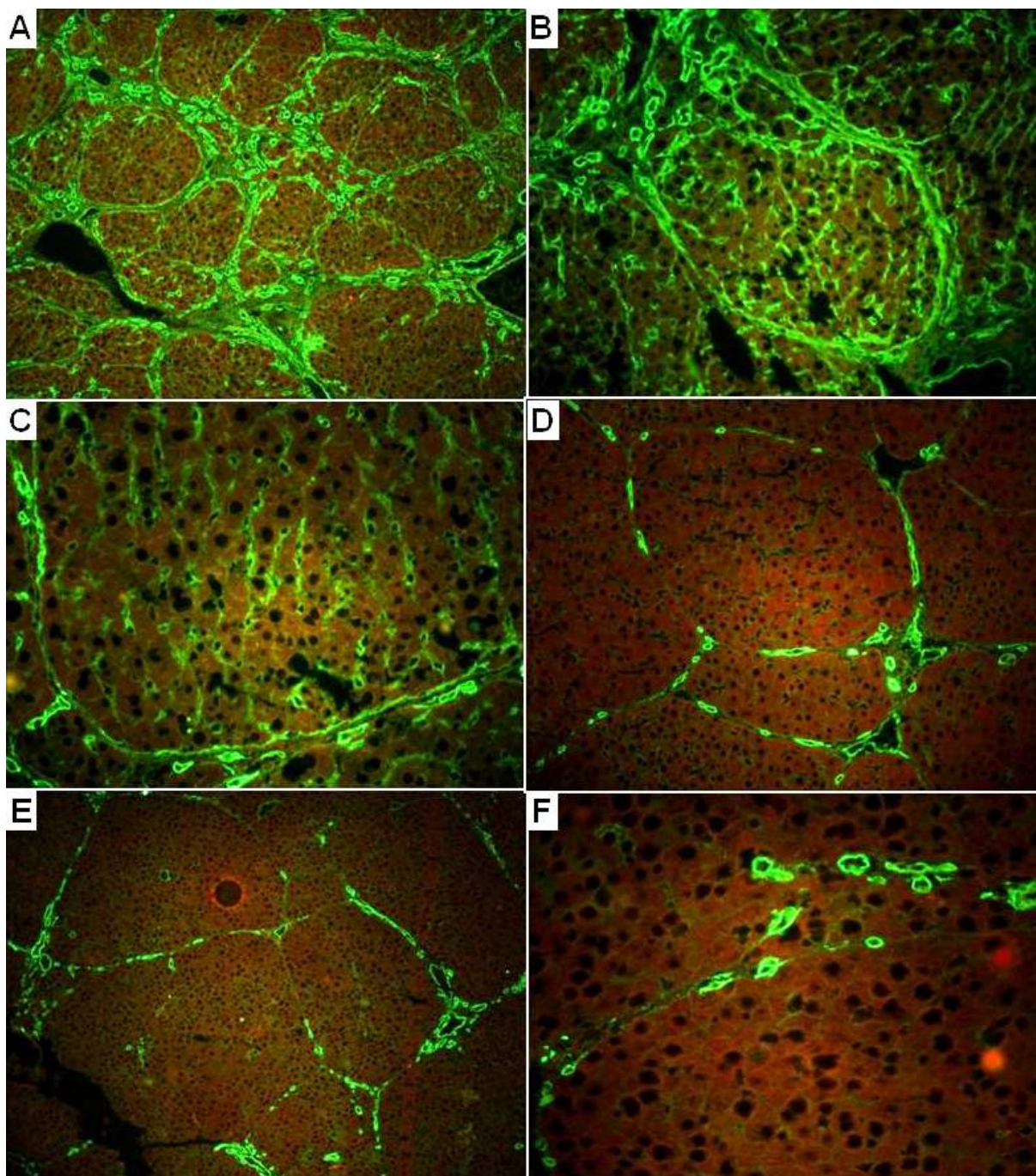


Figura 5 – Marcação para laminina em seções hepáticas observadas ao microscópio de fluorescência

A (100x) – Nódulos regenerativos entremeados por rica rede vascular, logo após a interrupção do tratamento. **B** (200x) – Vasos presentes tanto dentro dos septos fibrocelulares quanto no interior de nódulos regenerativos, logo após a interrupção do tratamento. **C** (400x) – Depósito aumentado de laminina em área perissinusoidal, logo após a interrupção do tratamento. **D** (200x) e **E** (100x) – Diminuição clara da marcação para laminina, além da persistência de vasos nos finos septos fibrosos remanescentes, quatro e seis meses após a interrupção do tratamento, respectivamente. **F** (400x) – Detalhe da presença de vasos em um fino septo fibroso remanescente e a ausência de marcação para laminina em área perissinusoidal, seis meses pós-tratamento.

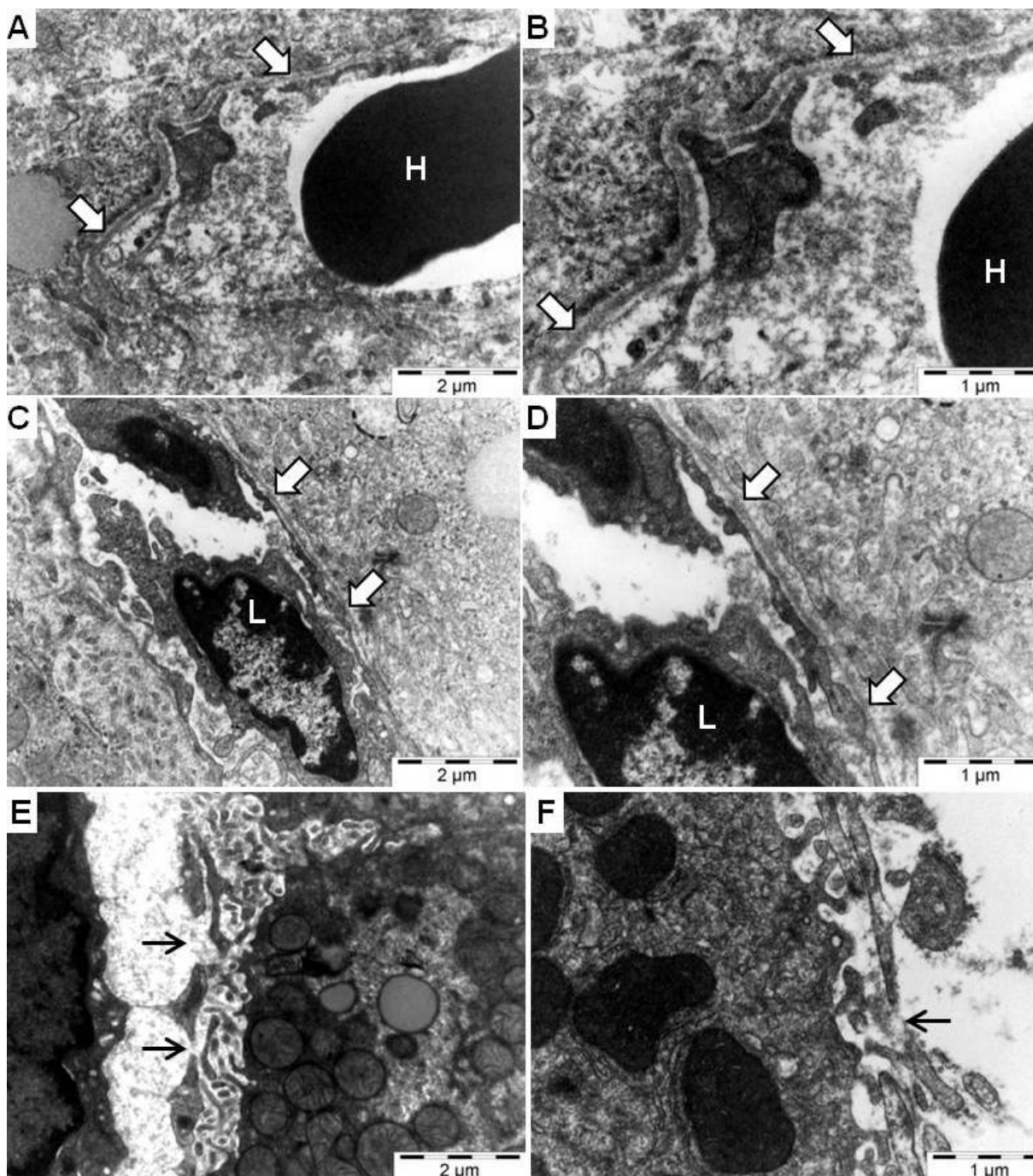


Figura 6 – Ultraestrutura de sinusóides hepáticos observados por microscopia eletrônica de transmissão

A e C – A presença de uma membrana basal (setas grossas) no espaço perissinusoidal de Disse evidencia a capilarização dos sinusóides hepáticos, constatada logo após a interrupção do tratamento. **B e D** – Ampliações de A e C, respectivamente. **E e F** – Vilosidades do pólo vascular de hepatócitos exibidas em contato direto com células endoteliais, cujas fenestras (setas finas) conectam o lúmen do sinusóide hepático ao espaço perissinusoidal de Disse, seis meses pós-tratamento. Tanto em E quanto em F nota-se a ausência de membrana basal. H = Hemácia; L = Leucócito

6 DISCUSSÃO

O tetracloreto de carbono (CCl_4) é uma potente droga hepatotóxica e a exposição prolongada a ele provoca degeneração dos hepatócitos, ativando mecanismos que culminam em fibrose e, posteriormente, em cirrose (MANIBUSAN, ODIN e EASTMOND, 2007; WEILER-NORMANN, HERKEL e LOHSE, 2007).

Os limites entre a agressão necessária para a produção da cirrose e a manutenção da sobrevivência dos animais são muito tênues. Desse modo, a perda amostral ao longo do desenvolvimento do modelo experimental é praticamente inevitável. O cuidado quanto à dose do CCl_4 e quanto ao intervalo entre as sessões de tratamento, entretanto, permite um razoável controle da mortalidade (ROSA et al., 1991).

A mortalidade observada na presente investigação esteve dentro do esperado em estudos experimentais de mesma natureza. Segundo Jeong e colaboradores (2001) e Li, Benjamin e Alexander (2002), a indução de cirrose em roedores de laboratório, por meio do CCl_4 , apresenta mortalidade entre 30% e 50% ou mais.

A mortalidade causada pelo CCl_4 , comparativamente às drogas alternativas de indução de cirrose, é menor em relação àquela provocada pela dimetilnitrosamina — a qual pode chegar até 100% (JEONG et al., 2001) —, embora seja maior do que aquela resultante da tioacetamida, cujo máximo foi apontado como 35% (LALEMAN et al., 2006; GUERRA et al., 2009).

Apesar de seu considerável percentual de mortalidade no presente estudo, o tratamento com o CCl_4 resultou em um padrão de cirrose evidente em todos os animais analisados ao fim dele. O quadro morfológico de nódulos regenerativos delimitados por septos fibrosos, entre outros aspectos, manifesto no fígado desses animais corroborou a administração repetida de CCl_4 em ratos como um modelo experimental adequado para a cirrose do homem (PEREZ TAMAYO, 1983).

Além de adequado, o modelo do CCl_4 é bem padronizado (CAMERON e KARUNARATNE, 1936; PROCTOR e CHATAMRA, 1984; ARIOSTO et al., 1989; ROSA et al., 1991) e tem sido amplamente utilizado em estudos morfológicos e funcionais do fígado cirrótico ao longo das últimas décadas. Dentre os diferentes

modelos experimentais, ele é, a partir de um ponto de vista morfológico, o que melhor se assemelha à cirrose humana (CAMERON e KARUNARATNE, 1936; PROCTOR e CHATAMRA, 1984; ARIOSTO et al., 1989).

As mudanças histológicas mais importantes observadas no fígado dos ratos analisados quatro e seis meses pós-tratamento foram representadas pela expansão dos nódulos regenerativos e pelo adelgaçamento e fragmentação dos septos fibrosos, de modo que não foram constatadas diferenças marcantes entre esses dois períodos de observação.

Esses resultados ratificaram os achados publicados por Di Vinicius e colaboradores (2005), os quais relataram que os aspectos de regressão da cirrose supracitados estabilizam-se quatro meses após a interrupção do CCl₄, não se modificando significativamente daí por diante. Além disso, tais achados estiveram de acordo com o proposto por Wanless, Nakashima e Sherman (2000), que afirmaram que a regressão da cirrose imita os aspectos descritos como característicos da denominada cirrose septal incompleta.

O interesse sobre a regressão da cirrose experimental difundiu-se a partir de Cameron e Karunaratne (1936), os quais descreveram dois estágios no desenvolvimento da cirrose induzida pelo CCl₄ em ratos:

[...] (1) um estágio pré-cirrótico reversível, com características histológicas indistinguíveis da cirrose efetiva e (2) um estágio cirrótico com um fígado fina ou grosseiramente granular. No primeiro caso, o fígado volta ao normal com a interrupção da droga. (CAMERON e KARUNARATNE, 1936, p. 19)

Para Perez-Tamayo (1979), há um estágio (inicial) específico da cirrose no qual a reversibilidade se aplica e outro em que o processo é, aparentemente, irreversível ou muito lento. A cirrose produzida nos animais da presente investigação não pode ser considerada como característica de um estágio avançado, entretanto, não se pode excluir a possibilidade de regressão completa da cirrose em casos mais leves (DI VINICIUS et al., 2005). Perez-Tamayo (1979) considerou, ainda, que todos os modelos experimentais de cirrose do fígado são reversíveis, desde que o agente causador seja interrompido e que haja tempo suficiente para permitir que o efeito torne-se aparente. As colocações desse autor, todavia, segundo seu próprio destaque, referem-se à reversibilidade da fibrose na cirrose, e não à reversibilidade da cirrose.

A discussão sobre a reversibilidade da cirrose tem sido apresentada como um assunto controverso. Parte desse problema decorre da terminologia empregada, uma vez que não há uma linguagem clara e comum para tratar do assunto (PINZANI, ROSSELLI e ZUCKERMANN, 2011). Muitos autores fazem confusão entre os termos “regressão” e “reversão” e outros, quando não os mesmos, empregam, por vezes, os termos “fibrose” e “cirrose” como sinônimos.

Segundo Friedman (2007), o termo “reversão” deve ser aplicado com cautela, uma vez que implica retorno completo à histologia normal. Muitos dos estudos que abordam a reversão da cirrose, entretanto, não consideram todas as características dessa doença. Eles fazem referência apenas à reversão da fibrose na cirrose. Assim, tem-se demonstrado uma diminuição do teor de matriz extracelular do fígado, e não a reversão completa da cirrose. Nesse contexto, Friedman (2007) sugeriu que seria mais preciso referir-se ao termo “regressão”, o qual indica melhora na fibrose sem, necessariamente, um retorno à histologia normal.

Os termos “regressão” e “reversão”, contudo, trazem consigo uma ambiguidade intrínseca, pois ambos podem representar uma condição mínima, parcial, substancial ou completa, caso uma especificação adicional não seja oferecida (DESMET, 2005). Além disso, o cuidado quanto ao uso deles suscita uma discussão sobre a maneira pela qual o comportamento da fibrose deve ser avaliado. Em outras palavras, se os métodos de análise de sua regressão devem ser os mesmos para avaliar sua progressão (FRIEDMAN e BANSAL, 2006).

Para tanto, deve-se considerar o fato de os três sistemas de avaliação de fibrose mais utilizados (KNOVELL et al., 1981; DESMET et al., 1994; POYNARD, BEDOSSA e OPOLON, 1997) terem sido desenvolvidos antes de a ideia de regressão de fibrose ganhar notoriedade. Vale ressaltar, também, que embora a biópsia hepática percutânea seja o padrão-ouro para a avaliação de fibrose em indivíduos humanos, tem-se reconhecido, cada vez mais, suas limitações (COUTO, 2007; SCHULZ, 2010). Ademais, esses métodos revelam uma avaliação estática do processo de fibrose, comprometendo a interpretação de seus aspectos dinâmico e bidirecional, ou seja, o remodelamento ao qual ele é constantemente submetido.

As limitações dos métodos de análise supracitados tornam-se mais evidentes quando eles são utilizados para avaliar a cirrose, especialmente sua regressão e/ou reversão. O problema reside, fundamentalmente, no fato de a cirrose ser sempre

representada pelo maior escore dos sistemas de avaliação de fibrose (PINZANI, ROSSELLI e ZUCKERMANN, 2011) — algo inadequado, uma vez que escores baixos não descartam a possibilidade de uma cirrose menos óbvia, como a cirrose septal incompleta (DESMET e ROSKAMS, 2004). As limitações referidas são agravadas pela variabilidade inter-observadores na classificação do estágio da doença ou mesmo por uma interpretação inadequada por meio desses sistemas, seja devido ao tamanho inadequado da amostra sob análise ou à sua fragmentação (IMPERIALE et al., 2000; PARK et al., 2000).

Por fim, é necessário levar em conta, ainda, que os quadros anatômico e clínico de um indivíduo com cirrose podem estar dissociados. Há aqueles que apresentam sinais de hipertensão da veia porta e de insuficiência hepática de graus variáveis, mas que não têm o quadro anatômico de cirrose. A recíproca também é verdadeira, de modo que isso contribui ainda mais para a controvérsia a respeito da reversibilidade da cirrose (ANDRADE, 2005).

Outro achado frequente nas amostras de fígado coletadas logo após a interrupção do tratamento foi o depósito de matriz extracelular na periferia dos sinusóides hepáticos, identificada como uma fibrose perissinusoidal por meio do picrossírius vermelho. Quanto a esse resultado é necessário ressaltar que as alterações da matriz extracelular têm um profundo efeito sobre a regeneração das células hepáticas e a redistribuição vascular (CRAWFORD, 2007).

No fígado cirrótico, todos os tipos de colágeno, de glicoproteína e de proteoglicano podem aumentar até três vezes ou mais do que as quantidades normalmente encontradas no fígado sadio (MURATA, OCHIAI e AKASHIO, 1985; GRESSNER, 1992). Estudos em ratos demonstraram que o total de componentes da matriz extracelular pode aumentar para 25% a 40% na cirrose (JAMES et al., 1986). Esse acúmulo anormal dentro do parênquima hepático produz um ambiente no qual as proteínas da matriz extracelular normalmente presentes na membrana basal são depositadas no espaço perissinusoidal de Disse.

A laminina é a glicoproteína mais importante da membrana basal (MARTINEZ-HERNANDEZ e AMENTA, 1995). Pequenas quantidades dela estão normalmente presentes no espaço perissinusoidal de Disse, mas quantidades aumentadas são encontradas na capilarização dos sinusóides hepáticos (ROSKAMS, DESMET e

VERSLYPE, 2007), circunstância em que os hepatócitos, além das células estreladas hepáticas, passam a produzi-la (CLEMENT et al., 1988).

O presente estudo comprovou esse depósito aumentado de laminina, por morfometria, nas amostras de fígado coletadas logo após a interrupção do tratamento. Segundo Lin e colaboradores (1998), a matriz extracelular de um fígado normal compreende menos de 3% da área relativa a uma seção de tecido. Na presente investigação, a análise morfométrica do material coletado logo após a interrupção do tratamento revelou uma ocupação média de 10,8% de laminina nas seções avaliadas, resultado de acordo com estudos anteriores que consideraram a deposição aumentada de matriz extracelular na cirrose (MURATA, OCHIAI e AKASHIO, 1985; JAMES et al., 1986; GRESSNER, 1992; LIN et al., 1998).

A matriz complexa do espaço perissinusoidal de Disse é essencial para manter a integridade e a função dos hepatócitos e de células sinusoidais (WELLS, 2011). A matriz extracelular, em um sentido geral, fornece a estrutura para a regulação da polarização, da migração, da proliferação, da diferenciação, da sobrevivência e da morte celular. Isso ocorre através de sinalização entre matriz extracelular e células, através de receptores transmembrana, como as integrinas ou proteoglicanos transmembrana (CRAWFORD, 2007).

Assim, a diferenciação de hepatócitos em um estado polarizado requer uma matriz extracelular com proporções adequadas de laminina, bem como de colágeno tipo IV, fibronectina, entactina e heparansulfato (FRIEDMAN et al., 1992). O contato apenas com uma matriz de colágeno leva à perda da polaridade e à desdiferenciação dos hepatócitos, medida pela expressão de suas proteínas específicas (KLEINMAN et al., 1986; BISSELL et al., 1987; SCHUETZ et al., 1988). Dessa maneira, lesão hepática que altera a matriz subendotelial sinusoidal pode resultar em perda diferenciada de função hepatocelular.

A análise ultraestrutural da presente investigação permitiu a identificação de uma membrana basal sob um endotélio contínuo e sem fenestras nos sinusóides das amostras de fígado coletadas logo após a interrupção do tratamento, constatando sua capilarização. Quanto a esse resultado é necessário considerar que a mudança do espaço perissinusoidal de Disse de conter delicados fios entremeados de colágeno fibrilar a uma matriz densa de proteínas típicas de

membrana basal fecha-o para o intercâmbio entre hepatócitos e sangue sinusoidal (MARTINEZ-HERNANDEZ e MARTINEZ, 1991).

Onori e colaboradores (2000), entretanto, relataram que o processo de capilarização dos sinusóides hepáticos não pode ser considerado como um dos principais motivos para a redução da captação hepática de componentes do plasma e para a insuficiência hepática, embora Martinez-Hernandez e Martinez (1991) tenham correlacionado a captação hepática ao referido processo.

O argumento de Onori e colaboradores (2000) baseia-se na evidência de que a presença de tecido conjuntivo no espaço perissinusoidal de Disse foi localizada apenas em sinusóides periportais ou próximos a grandes áreas fibróticas de fígados de rato induzido à cirrose pelo CCl₄. Esses dados foram obtidos por microscopia eletrônica de transmissão e confirmados por imunohistoquímica para laminina.

Ao contrário do relatado por Onori e colaboradores (2000), os resultados do presente estudo quanto à imunofluorescência para laminina revelaram o depósito aumentado dessa glicoproteína nos espaços perissinusoidais de Disse dentro dos nódulos regenerativos das amostras avaliadas logo após a interrupção do tratamento. Tais resultados foram validados pela constatação da capilarização dos sinusóides hepáticos por meio da microscopia eletrônica de transmissão.

A matriz subendotelial sinusoidal, segundo o mencionado anteriormente, também ajuda a preservar as funções e as atividades das células endoteliais sinusoidais hepáticas e das células estreladas hepáticas. Quando as células estreladas hepáticas são mantidas em ambiente diferente daquele de onde são originalmente encontradas (espaço perissinusoidal de Disse), elas assumem o seu fenótipo ativado (FRIEDMAN et al., 1989). Do mesmo modo, as células endoteliais sinusoidais hepáticas fenestradas perdem suas fenestras em associação com alterações na matriz extracelular (MCGUIRE et al., 1992).

Esses eventos favorecem a redução da porosidade dos sinusóides hepáticos, comprometendo o movimento de solutos e macromoléculas no espaço perissinusoidal de Disse. Assim, além de a capilarização dos sinusóides hepáticos resultar em uma importante barreira entre o sangue e os hepatócitos, ela também pode provocar a ativação de novas células estreladas hepáticas.

Deleve, Wang e Guo (2008) relataram, a partir de estudos *in vitro*, que células endoteliais sinusoidais hepáticas mantêm a quiescência de células estreladas hepáticas e induzem a reversão do fenótipo ativado destas para quiescente. Quando células endoteliais sinusoidais hepáticas se desdiferenciam para um fenótipo capilarizado, esse efeito parácrino sobre as células estreladas hepáticas é perdido, de modo que estas se tornam ativadas. Esses dados sugerem que a capilarização de células endoteliais sinusoidais hepáticas favorece a fibrose. Deleve (2011), tendo isso em vista, supôs que a reversão da capilarização promove a resolução da fibrose.

A cirrose e suas alterações vasculares, entre as quais a capilarização dos sinusóides hepáticos, contudo, têm sido descritas, tradicionalmente, como irreversíveis. Para Quinn e Higginson (1965), tudo na cirrose experimental é reversível, exceto os nódulos hepatocitários regenerativos. Segundo Wanless, Nakashima e Sherman (2000), Desmet e Roskams (2004) e Pinzani, Rosselli e Zuckermann (2011), embora a regressão da fibrose ocorra no fígado cirrótico, as alterações vasculares presentes nele parecem persistir mesmo após reduções significativas no teor de sua matriz extracelular. Tugues e colaboradores (2007), Semela e colaboradores (2008) e Mejias e colaboradores (2009) acreditam que a regressão das alterações vasculares da cirrose exige mais do que antifibróticos, e sim agentes antiangiogênicos.

Desmet (2005) cita, a partir de um ponto de vista patológico, as fístulas vasculares intra-hepáticas como o maior determinante para o ponto de não retorno da cirrose, sendo elas o fator crucial para a interpretação de irreversibilidade dessa doença. Em estudo experimental com o modelo do CCl₄, os já mencionados Di Vinicius e colaboradores (2005) concluíram que a cirrose é clínica ou funcionalmente reversível, mas anatomicamente persistente, com septos fibrosos remanescentes vascularizados.

Segundo esses autores, tais septos, em preparações com injeções vasculares de nanquim, mostraram-se vascularizados, com vasos que carreavam material diretamente da veia porta para os sinusóides situados entre as traves hepáticas que formavam os nódulos persistentes. Esses septos eram, portanto, fisiologicamente ativos. A partir desses resultados, Di Vinicius e colaboradores (2005) supuseram que tais septos fibrosos e os seus vasos foram conservados quando, após a interrupção

do CCl₄, houve uma extensa degradação do excesso de tecido fibroso. Eles afirmaram, ainda, que isso contribuiu para a persistência do padrão anatômico da cirrose, embora todos os indícios tenham apontado que os distúrbios clínicos desapareceram por completo nos ratos após a interrupção do CCl₄. O presente estudo confirmou a persistência desse padrão anatômico, por meio das técnicas histológicas e de imunofluorescência, quatro e seis meses pós-tratamento.

Embora a discussão sobre o potencial de reversão da cirrose esteja amplamente documentada na literatura científica, pouco se sabe ainda sobre a reversibilidade de suas lesões vasculares, inclusive a capilarização dos sinusóides hepáticos. Apesar de se ter conhecimento, há várias décadas, a respeito dessa lesão (SCHAFFNER e POPPER, 1963; STENGER, 1966) e sobre a estrutura dos capilares do fígado cirrótico (HAHN et al., 1980; MARTINEZ-HERNANDEZ, 1985), não há registro, na literatura científica, sobre a possibilidade de sua reversão na cirrose. Um estudo (MORI et al., 1994), entretanto, investigou tal possibilidade em modelo experimental; sua análise histológica, porém, não foi precisa o suficiente, deixando dúvidas se o parênquima hepático dos animais avaliados apresentou um quadro morfológico de cirrose ou apenas fibrose.

A capilarização dos sinusóides hepáticos foi observada no início da doença alcoólica hepática, ocorrendo independentemente de necrose do parênquima, de hepatite alcoólica ou da presença de corpos de Mallory em humanos (HORN, CHRISTOFFERSEN e HENRIKSEN, 1987). Horn, Junge e Christoffersen (1985) demonstraram, por meio de estudo com microscopia eletrônica de varredura, em amostras coletadas de pacientes alcoólicos não cirróticos, a perda de fenestras na zona perivenular do fígado, ocorrendo tanto na presença quanto na ausência de colagenização do espaço perissinusoidal de Disse.

Segundo Sztark e colaboradores (1986), a alteração das células endoteliais sinusoidais hepáticas pode ser um passo necessário e inicial no desenvolvimento da fibrose hepática, como suposto por Deleve, Wang e Guo (2008). Horn, Lyon e Christoffersen (1986) também sugeriram essa hipótese a partir da demonstração de correlação positiva entre a perda de fenestras e a presença de uma membrana basal subendotelial, e entre esta última e a ocorrência de colágeno no espaço de Disse.

Outros autores sugeriram, ainda, que a perda de fenestras nos sinusóides hepáticos pode contribuir para a esteatose hepática (FRASER, BOWLER e DAY,

1980) e pode causar hiperlipoproteinemia em alcoólicos crônicos (CLARK et al., 1988). Esse processo de perda de fenestras também foi associado ao aumento da resistência vascular no leito sinusoidal, sugerindo que alterações no revestimento dos sinusóides hepáticos podem estar envolvidas na patogênese da hipertensão da veia porta (ODA et al., 1989).

A reversibilidade das alterações sinusoidais acima descritas no decurso da regressão da cirrose, entretanto, não foi documentada na literatura científica, até o presente estudo. Os achados, aqui apresentados, revelaram que o depósito aumentado de laminina no espaço entre as traves e os sinusóides hepáticos desapareceu quatro e seis meses após a interrupção do tratamento. A avaliação estatística demonstrou diferença significativa entre as amostras coletadas nos três períodos de observação, por ANOVA, e deles entre si quando os últimos períodos (quatro e seis meses) foram comparados com o primeiro (logo após a interrupção do tratamento) pelo pós-teste de Newman-Keuls. Não houve, porém, diferenças significativas entre os últimos períodos de observação, corroborando o preconizado por Di Vinicius e colaboradores (2005) quanto à estabilidade do padrão morfológico persistente nos meses subsequentes ao quarto mês após a interrupção do tratamento com CCl₄.

Esses dados foram confirmados pela análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão, seis meses após a interrupção do tratamento, período no qual se constatou o desaparecimento da membrana basal e o reaparecimento das fenestras nos sinusóides hepáticos das amostras analisadas. Tais dados corroboraram os achados de Mori e colaboradores (1994) a respeito da reversão da capilarização dos sinusóides hepáticos, obtidos no modelo experimental de indução de fibrose em ratos pelo tratamento com tioacetamida.

Estudos recentes realizados por Xie, Kanel e Deleve (2010), apresentados sob a forma de resumo, relataram, a partir de estudos *in vivo*, que a reversão da capilarização promove a reversão de células estreladas hepáticas à quiescência e, por conseguinte, a reversão da fibrose.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A capilarização sinusoidal transforma os sinusóides hepáticos, altamente permeáveis às macromoléculas, em capilares comuns, não adequados para a especial passagem de tais metabólitos, resultando em uma importante barreira em um sítio anatômico essencial para o metabolismo do organismo.

Os resultados do presente estudo sugerem que, após a interrupção do tratamento com CCl_4 , o fígado volta, com o tempo, a assumir uma estrutura próxima do normal, todavia, com padrão nodular ainda persistente, mas onde a capilarização dos sinusóides hepáticos sofre progressiva reversão ao normal.

Estudos futuros devem considerar a contribuição da reversão da capilarização sinusoidal sobre os distúrbios clínicos da cirrose durante o seu processo de regressão.

REFERÊNCIAS

ABDEL-AZIZ, G. et al. Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat. **Am J Pathol**, v. 137, n. 6, p. 1333-42, Dec 1990.

ALVES, V. A. F.; MELLO, E. S. Fígado e Vias Biliares. In: BRASILEIRO FILHO, G. (Ed.). **Bogliolo, Patologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

ANDERSON, R. N.; SMITH, B. L. Deaths: leading causes for 2001. **Natl Vital Stat Rep**, v. 52, n. 9, p. 1-85, Nov 7 2003.

ANDRADE, Z. A. [Regression of hepatic fibrosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, n. 6, p. 514-20, Nov-Dec 2005.

ANDRADE, Z. A.; COX, T. M.; CHEEVER, A. M. Regression of hepatic lesions after treatment of *Schistosoma mansoni* or *Schistosoma japonicum* infection in mice: a comparative study. **Am J Trop Med Hyg**, v. 49, n. 1, p. 1-9, Jul 1993.

ANDRADE, Z. A.; FERRAZ, G. S. A hepatopatia esquistossomótica. **Arq. Gastroenterol**, v. 8, n. 3, p. 131-36, Jul-Set 1971.

ANDRADE, Z. A.; REESINK, M.; MELRO, M. C. B. F. O diagnóstico etiológico das cirroses em material de necrópsias. **Rev Ass Med Brasil**, v. 24, n. 5, p. 152-56, Maio 1978.

ANTHONY, P. P. et al. The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. **J Clin Pathol**, v. 31, n. 5, p. 395-414, May 1978.

ARIOSTO, F. et al. Carbon tetrachloride-induced experimental cirrhosis in the rat: a reappraisal of the model. **Eur Surg Res**, v. 21, n. 5, p. 280-6, 1989.

ARTHUR, M. J. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. **Gastroenterology**, v. 122, n. 5, p. 1525-8, May 2002.

BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. **J Clin Invest**, v. 115, n. 2, p. 209-18, Feb 2005.

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

BERNUAU, D.; ROGIER, E.; FELDMANN, G. A quantitative ultrastructural analysis of the leukocytes in contact with hepatocytes in chronic active hepatitis, with a cytochemical detection of mononuclear phagocytes. **Am J Pathol**, v. 109, n. 3, p. 310-20, Dec 1982.

_____. In situ ultrastructural detection and quantitation of liver mononuclear phagocytes in contact with hepatocytes in chronic type B hepatitis. **Lab Invest**, v. 51, n. 6, p. 667-74, Dec 1984.

BISSELL, D. M. et al. Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. **J Clin Invest**, v. 79, n. 3, p. 801-12, Mar 1987.

BLENDIS, L.; WONG, F. The hyperdynamic circulation in cirrhosis: an overview. **Pharmacol Ther**, v. 89, n. 3, p. 221-31, Mar 2001.

BLUMBERG, R. S. et al. Primary hepatocellular carcinoma in idiopathic hemochromatosis after reversal of cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 95, n. 5, p. 1399-402, Nov 1988.

BOLLMAN, J. L.; MANN, F. C. Experimentally produced lesions of the liver. **Ann Intern Med**, v. 5, p. 699-712, 1931.

BOSCH, J.; ABRALDES, J. G. Portal Hypertension: Extrahepatic Mechanisms. In: DELEVE, L. D. e GARCIA-TSAO, G. (Ed.). **Vascular Liver Disease: Mechanisms and Management**. New York: Springer, 2011.

BUNTON, G. L.; CAMERON, R. Regeneration of Liver after Biliary Cirrhosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 111, p. 412-21, Dec 30 1963.

BUREAU, C.; PÉRON, J.-M.; VINEL, J.-P. Hepatic circulation. In: RODES, J. et al. (Ed.). **Textbook of hepatology: from basic science to clinical practice**. 3. ed. Malden, Massachusetts: Blackwell, v.1, 2007.

BUTCHER, E. C.; PICKER, L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. **Science**, v. 272, n. 5258, p. 60-6, Apr 5 1996.

CAMERON, G. R.; KARUNARATNE, W. A. E. Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 42, n. 1, p. 1-21, 1936.

CARLEY, W. W.; MILICI, A. J.; MADRI, J. A. Extracellular matrix specificity for the differentiation of capillary endothelial cells. **Exp Cell Res**, v. 178, n. 2, p. 426-34, Oct 1988.

CASTRONOVO, V.; TARABOLETTI, G.; SOBEL, M. E. Laminin receptor complementary DNA-deduced synthetic peptide inhibits cancer cell attachment to endothelium. **Cancer Res**, v. 51, n. 20, p. 5672-8, Oct 15 1991.

CHOI, S. S.; DIEHL, A. M. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. **Hepatology**, v. 50, n. 6, p. 2007-13, Dec 2009.

CLARK, S. A. et al. Defenestration of hepatic sinusoids as a cause of hyperlipoproteinaemia in alcoholics. **Lancet**, v. 2, n. 8622, p. 1225-7, Nov 26 1988.

CLEMENT, B. et al. Hepatocytes may produce laminin in fibrotic liver and in primary culture. **Hepatology**, v. 8, n. 4, p. 794-803, Jul-Aug 1988.

COUTO, O. F. D. M. **Validação e comparação de testes laboratoriais simples como preditores de fibrose hepática em portadores de hepatite C crônica**. 2007. (Dissertação). Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CRAWFORD, J. M. Basic mechanisms in hepatopathology. In: BURT, A. D.; FERRELL, L. D. e PORTMANN, B. (Ed.). **MacSween's pathology of the liver**. 5. ed. London: Churchill Livingstone/Elsevier, 2007.

DE MINICIS, S. et al. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. **Gastroenterology**, v. 132, n. 5, p. 1937-46, May 2007.

DELEVE, L. D. Vascular liver disease and the liver sinusoidal endothelial cell. In: DELEVE, L. D. e GARCIA-TSAO, G. (Ed.). **Vascular liver disease: mechanisms and management**. New York: Springer, 2011.

DELEVE, L. D.; WANG, X.; GUO, Y. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. **Hepatology**, v. 48, n. 3, p. 920-30, Sep 2008.

DESMET, V. Liver cirrhosis: evolving aspects of an old problem. In: CLÉMENT, B. e GUILLOUZO, A. (Ed.). **Cellular and molecular aspects of cirrhosis**. Paris: Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd, v.216, 1992.

DESMET, V. J. Comments on cirrhosis reversal. **Dig Liver Dis**, v. 37, n. 12, p. 909-16, Dec 2005.

DESMET, V. J. et al. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. **Hepatology**, v. 19, n. 6, p. 1513-20, Jun 1994.

DESMET, V. J.; ROSKAMS, T. Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. **J Hepatol**, v. 40, n. 5, p. 860-7, May 2004.

DI VINICIUS, I. et al. Morphological signs of cirrhosis regression. Experimental observations on carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis of rats. **Pathol Res Pract**, v. 201, n. 6, p. 449-56, 2005.

DIENSTAG, J. L. et al. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. **Gastroenterology**, v. 124, n. 1, p. 105-17, Jan 2003.

DIXON, J. B. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. **Hepatology**, v. 39, n. 6, p. 1647-54, Jun 2004.

DUFFIN, J. M. Why does cirrhosis belong to Laennec? **CMAJ**, v. 137, n. 5, p. 393-6, Sep 1 1987.

DUFOUR, J. F.; DELELLIS, R.; KAPLAN, M. M. Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. **Ann Intern Med**, v. 127, n. 11, p. 981-5, Dec 1 1997.

DUNN, M. A. et al. Reversal of advanced liver fibrosis in rabbits with Schistosomiasis japonica. **Am J Trop Med Hyg**, v. 50, n. 4, p. 499-505, Apr 1994.

EKATAKSIN, W. et al. HMS, hepatic microcirculatory subunits in mammalian species: intralobular "grouping" of liver tissue with definition enhanced by the "drop-out" sinusoids. In: WISSE, E.;KNOOK, D. L. e WAKE, D. (Ed.). **Cells of the hepatic sinusoid**. Leiden: Kupffer Cell Foundation, v.5, 1995.

FALKMER, S.; SAMUELSON, G.; SJOLIN, S. Penicillamine-induced normalization of clinical signs, and liver morphology and histochemistry in a case of Wilson's disease. **Pediatrics**, v. 45, n. 2, p. 260-8, Feb 1970.

FALLOWFIELD, J. A.; IREDALE, J. P. Reversal of liver fibrosis and cirrhosis--an emerging reality. **Scott Med J**, v. 49, n. 1, p. 3-6, Feb 2004.

FARCI, P. et al. Long-term benefit of interferon alpha therapy of chronic hepatitis D: regression of advanced hepatic fibrosis. **Gastroenterology**, v. 126, n. 7, p. 1740-9, Jun 2004.

FORBES, S. J. et al. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. **Gastroenterology**, v. 126, n. 4, p. 955-63, Apr 2004.

FRASER, R.; BOWLER, L. M.; DAY, W. A. Damage of rat liver sinusoidal endothelium by ethanol. **Pathology**, v. 12, n. 3, p. 371-6, Jul 1980.

FRIEDMAN, S. L. Reversibility of hepatic fibrosis and cirrhosis--is it all hype? **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol**, v. 4, n. 5, p. 236-7, May 2007.

FRIEDMAN, S. L.; BANSAL, M. B. Reversal of hepatic fibrosis -- fact or fantasy? **Hepatology**, v. 43, n. 2 Suppl 1, p. S82-8, Feb 2006.

FRIEDMAN, S. L. et al. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture. **Hepatology**, v. 15, n. 2, p. 234-43, Feb 1992.

FRIEDMAN, S. L. et al. Maintenance of differentiated phenotype of cultured rat hepatic lipocytes by basement membrane matrix. **J Biol Chem**, v. 264, n. 18, p. 10756-62, Jun 25 1989.

GIELING, R. G.; BURT, A. D.; MANN, D. A. Fibrosis and cirrhosis reversibility - molecular mechanisms. **Clin Liver Dis**, v. 12, n. 4, p. 915-37, xi, Nov 2008.

GRANT, D. S. et al. Intracellular mechanisms involved in basement membrane induced blood vessel differentiation in vitro. **In Vitro Cell Dev Biol**, v. 27A, n. 4, p. 327-36, Apr 1991.

GRANT, D. S. et al. Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. **Cell**, v. 58, n. 5, p. 933-43, Sep 8 1989.

GRESSNER, A. M. Hepatic fibrogenesis: the puzzle of interacting cells, fibrogenic cytokines, regulatory loops, and extracellular matrix molecules. **Z Gastroenterol**, v. 30 Suppl 1, p. 5-16, Mar 1992.

_____. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. **J Hepatol**, v. 22, n. 2 Suppl, p. 28-36, 1995.

GRESSNER, A. M.; BACHEM, M. G. Cellular communications and cell-matrix interactions in the pathogenesis of fibroproliferative diseases: liver fibrosis as a paradigm. **Ann Biol Clin (Paris)**, v. 52, n. 3, p. 205-26, 1994.

GUERRA, R. R. et al. Modulation of extracellular matrix by nutritional hepatotropic factors in thioacetamide-induced liver cirrhosis in the rat. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 11, p. 1027-34, Nov 2009.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. O Fígado como um Órgão. In: GUYTON, A. C. e HALL, J. E. (Ed.). **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

GYORGY, P.; GOLDBLATT, W. Treatment of experimental dietary cirrhosis of the liver in rats. **J Exp Med**, v. 90, n. 1, p. 73-84, Jul 1949.

HAHN, E. et al. Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: collagen type IV, laminin, and fibronectin. **Gut**, v. 21, n. 1, p. 63-71, Jan 1980.

HAMMEL, P. et al. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. **N Engl J Med**, v. 344, n. 6, p. 418-23, Feb 8 2001.

HERBST, T. J. et al. Differential effects of laminin, intact type IV collagen, and specific domains of type IV collagen on endothelial cell adhesion and migration. **J Cell Biol**, v. 106, n. 4, p. 1365-73, Apr 1988.

HERNANDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN, S. L. Pathogenesis of liver fibrosis. **Annu Rev Pathol**, v. 6, p. 425-56, Feb 28 2011.

HERRICK, F. C. An Experimental Study into the Cause of the Increased Portal Pressure in Portal Cirrhosis. **J Exp Med**, v. 9, n. 1, p. 93-104, Jan 23 1907.

HORN, T.; CHRISTOFFERSEN, P.; HENRIKSEN, J. H. Alcoholic liver injury: defenestration in noncirrhotic livers--a scanning electron microscopic study. **Hepatology**, v. 7, n. 1, p. 77-82, Jan-Feb 1987.

HORN, T.; JUNGE, J.; CHRISTOFFERSEN, P. Early alcoholic liver injury: changes of the Disse space in acinar zone 3. **Liver**, v. 5, n. 6, p. 301-10, Dec 1985.

HORN, T.; LYON, H.; CHRISTOFFERSEN, P. The blood hepatocytic barrier: a light microscopical, transmission- and scanning electron microscopic study. **Liver**, v. 6, n. 4, p. 233-45, Aug 1986.

HUTTERER, F.; RUBIN, E.; POPPER, H. Mechanism of Collagen Resorption in Reversible Hepatic Fibrosis. **Exp Mol Pathol**, v. 86, p. 215-23, Jun 1964.

IMHOF, B. A.; DUNON, D. Leukocyte migration and adhesion. **Adv Immunol**, v. 58, p. 345-416, 1995.

IMPERIALE, T. F. et al. Need for validation of clinical decision aids: use of the AST/ALT ratio in predicting cirrhosis in chronic hepatitis C. **Am J Gastroenterol**, v. 95, n. 9, p. 2328-32, Sep 2000.

IREDALE, J. P. et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. **J Clin Invest**, v. 102, n. 3, p. 538-49, Aug 1 1998.

ISSA, R. et al. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. **Gastroenterology**, v. 126, n. 7, p. 1795-808, Jun 2004.

ISSA, R. et al. Mutation in collagen-1 that confers resistance to the action of collagenase results in failure of recovery from CCl₄-induced liver fibrosis, persistence of activated hepatic stellate cells, and diminished hepatocyte regeneration. **FASEB J**, v. 17, n. 1, p. 47-9, Jan 2003.

JAIN, D.; WEST, B. Vascular Liver Disease: Mechanisms and Management. In: DELEVE, L. D. e GARCIA-TSAO, G. (Ed.). **Histological Diagnosis**. New York: Springer, 2011.

JAMES, J. et al. Histophotometric estimation of volume density of collagen as an indication of fibrosis in rat liver. **Histochemistry**, v. 85, n. 2, p. 129-33, 1986.

JEONG, D. H. et al. Expression patterns of cell cycle-related proteins in a rat cirrhotic model induced by CCl₄ or thioacetamide. **J Gastroenterol**, v. 36, n. 1, p. 24-32, Jan 2001.

JHANDIER, M. N. et al. Portal fibroblasts regulate the proliferation of bile duct epithelia via expression of NTPDase2. **J Biol Chem**, v. 280, n. 24, p. 22986-92, Jun 17 2005.

KALLURI, R.; NEILSON, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1776-84, Dec 2003.

KHALILI, M.; NGUYEN, T. T. Liver Disease. In: MCPHEE, S. J. e HAMMER, G. D. (Ed.). **Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine**. 6. ed. New York: McGraw-Hill, 2010.

KIERNAN, F. The anatomy and physiology of the liver. **Philos Trans R Soc Lond**, v. 123, p. 711-770, 1833.

KIERSZENBAUM, A. L. Glândulas digestórias. In: KIERSZENBAUM, A. L. (Ed.). **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

KISSELEVA, T. et al. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. **J Hepatol**, v. 45, n. 3, p. 429-38, Sep 2006.

KLEINMAN, H. K. et al. Basement membrane complexes with biological activity. **Biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 312-8, Jan 28 1986.

KNODELL, R. G. et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. **Hepatology**, v. 1, n. 5, p. 431-5, Sep-Oct 1981.

KRAL, J. G. et al. Effects of surgical treatment of the metabolic syndrome on liver fibrosis and cirrhosis. **Surgery**, v. 135, n. 1, p. 48-58, Jan 2004.

KUBOTA, Y. et al. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. **J Cell Biol**, v. 107, n. 4, p. 1589-98, Oct 1988.

KUMAR, V. et al. Lesão Celular, Morte Celular e Adaptações. In: KUMAR, V. et al. (Ed.). **Robbins, Patologia Básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008a.

_____. Reparo Tecidual: Regeneração, Cicatrização e Fibrose. In: KUMAR, V. et al. (Ed.). **Robbins, Patologia Básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008b.

KWEON, Y. O. et al. Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B. **J Hepatol**, v. 35, n. 6, p. 749-55, Dec 2001.

LACQUET, A. M. Experimental pathology of the liver: effects of carbon tetrachloride on the normal and on the restored liver after partial hepatectomy. **Arch Pathol**, v. 14, p. 164-74, 1932.

LAENNEC, R. T. H. **De l'Auscultation Médiante ou Trait du Diagnostic des Maladies des Poumon et du Coeur**. Paris: Brosson & Chaudé, 1819.

LALEMAN, W. et al. A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: thioacetamide revisited. **Eur J Clin Invest**, v. 36, n. 4, p. 242-9, Apr 2006.

LAMSOM, P. D.; WING, R. Early cirrhosis of the liver produced in dogs by carbon tetrachloride. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 29, p. 191-202, 1926.

LANGSCH, A. et al. Interspecies difference in liver-specific functions and biotransformation of testosterone of primary rat, porcine and human hepatocyte in an organotypical sandwich culture. **Toxicol Lett**, v. 188, n. 3, p. 173-9, Aug 10 2009.

LEE, U. E.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 25, n. 2, p. 195-206, Apr 2011.

LEEVY, C. M.; POPPER, H.; SHERLOCK, S. **Diseases of the liver and biliary tract: standardization of nomenclature, diagnostic criteria, and diagnostic methodology**. Washington: Fogarty International Center proceedings, 1977.

LEY, K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. **Cardiovasc Res**, v. 32, n. 4, p. 733-42, Oct 1996.

LI, X.; BENJAMIN, I. S.; ALEXANDER, B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. **J Hepatol**, v. 36, n. 4, p. 488-93, Apr 2002.

LIM, J. K.; GARCIA-TSAO, G. Management: Cirrhotic Portal Hypertension. In: DELEVE, L. D. e GARCIA-TSAO, G. (Ed.). **Vascular Liver Disease: Mechanisms and Management**. New York: Springer, 2011.

LIN, X. Z. et al. Computer morphometry for quantitative measurement of liver fibrosis: comparison with Knodell's score, colorimetry and conventional description reports. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 13, n. 1, p. 75-80, Jan 1998.

LOIOLA, A. Planilhas e estatísticas online. **Ministério da Saúde do Brasil**, 2000. Disponível em: < <http://www.saude.gov.br> >.

LUBISCO, N. M.; VIEIRA, S. C.; SANTANA, I. V. **Manual de estilo acadêmico: monografias, dissertações e teses**. 4. ed. Salvador: EDUFBA, 2008.

MAEDA, M. F. Y. et al. [Vascularization in hepatic cirrhosis: an immunohistochemical study on necropsies]. **Arq Gastroenterol**, v. 45, n. 1, p. 38-45, Jan-Mar 2008.

MALL, F. P. A study of the structural unit of the liver. **Am J Anat**, v. 5, p. 227-308, 1906.

MANIBUSAN, M. K.; ODIN, M.; EASTMOND, D. A. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev**, v. 25, n. 3, p. 185-209, Jul-Sep 2007.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A. The hepatic extracellular matrix. II. Electron immunohistochemical studies in rats with CCl₄-induced cirrhosis. **Lab Invest**, v. 53, n. 2, p. 166-86, Aug 1985.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; AMENTA, P. S. The extracellular matrix in hepatic regeneration. **FASEB J**, v. 9, n. 14, p. 1401-10, Nov 1995.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; MARTINEZ, J. The role of capillarization in hepatic failure: studies in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. **Hepatology**, v. 14, n. 5, p. 864-74, Nov 1991.

MASSARRAT, S.; FALLAHAZAD, V.; KAMALIAN, N. Clinical, biochemical and imaging-verified regression of hepatitis B-induced cirrhosis. **Liver Int**, v. 24, n. 2, p. 105-9, Apr 2004.

MATSUMOTO, T. et al. A study on the normal structure of the human liver, with special reference to its angioarchitecture. **Jikeikai Med J**, v. 26, p. 1-40, 1979.

MCCORMICK, P. A. Hepatic Cirrhosis. In: DOOLEY, J. S. et al. (Ed.). **Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System**. 12. ed. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011.

MCGUIRE, R. F. et al. Role of extracellular matrix in regulating fenestrations of sinusoidal endothelial cells isolated from normal rat liver. **Hepatology**, v. 15, n. 6, p. 989-97, Jun 1992.

MEJIAS, M. et al. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. **Hepatology**, v. 49, n. 4, p. 1245-56, Apr 2009.

MORI, T. et al. Experimental study of the reversibility of sinusoidal capillarization. **Alcohol Alcohol Suppl**, v. 29, n. 1, p. 67-74, 1994.

MOSCHCOWITZ, E. Morphology and pathogenesis of biliary cirrhosis. **AMA Arch Pathol**, v. 54, n. 3, p. 259-75, Sep 1952.

MURATA, K.; OCHIAI, Y.; AKASHIO, K. Polydispersity of acidic glycosaminoglycan components in human liver and the changes at different stages in liver cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 89, n. 6, p. 1248-57, Dec 1985.

MURETTO, P.; ANGELUCCI, E.; LUCARELLI, G. Reversibility of cirrhosis in patients cured of thalassemia by bone marrow transplantation. **Ann Intern Med**, v. 136, n. 9, p. 667-72, May 7 2002.

NETTER, F. H. **Atlas de Anatomia Humana**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

NOVO, E. et al. Overexpression of Bcl-2 by activated human hepatic stellate cells: resistance to apoptosis as a mechanism of progressive hepatic fibrogenesis in humans. **Gut**, v. 55, n. 8, p. 1174-82, Aug 2006.

ODA, M. et al. Alterations of hepatic sinusoids in liver cirrhosis: their involvement in the pathogenesis of portal hypertension. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 4 Suppl 1, p. 111-3, 1989.

ONORI, P. et al. Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl₄-treated rats. **J Hepatol**, v. 33, n. 4, p. 555-63, Oct 2000.

PARK, G. J. et al. Aspartate aminotransferase: alanine aminotransferase ratio in chronic hepatitis C infection: is it a useful predictor of cirrhosis? **J Gastroenterol Hepatol**, v. 15, n. 4, p. 386-90, Apr 2000.

PASSOS, C. C. et al. Modelos experimentais para indução de cirrose hepática em animais: revisão de literatura. **Revista Biotemas**, v. 2, n. 23, p. 183-190, Jun 2010.

PEREZ-TAMAYO, R. Cirrhosis of the liver: a reversible disease? **Pathol Annu**, v. 14 Pt 2, p. 183-213, 1979.

PEREZ TAMAYO, R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ and adequate model of human cirrhosis? **Hepatology**, v. 3, n. 1, p. 112-20, Jan-Feb 1983.

PICCHIOTTI, R. et al. Correlations between sinusoidal pressure and liver morphology in cirrhosis. **J Hepatol**, v. 20, n. 3, p. 364-9, Mar 1994.

PINZANI, M.; ROSSELLI, M.; ZUCKERMANN, M. Liver cirrhosis. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 25, n. 2, p. 281-90, Apr 2011.

PINZANI, M.; VIZZUTTI, F. Fibrosis and cirrhosis reversibility: clinical features and implications. **Clin Liver Dis**, v. 12, n. 4, p. 901-13, x, Nov 2008.

POPPER, H. Pathologic aspects of cirrhosis. A review. **Am J Pathol**, v. 87, n. 1, p. 228-64, Apr 1977.

POPPER, H.; ELIAS, H.; PETTY, D. E. Vascular pattern of the cirrhotic liver. **Am J Clin Pathol**, v. 22, n. 8, p. 717-29, Aug 1952.

POPPER, H.; UENFRIEND, S. Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations. **Am J Med**, v. 49, p. 707-21, Nov 1970.

POPPER, H.; ZAK, F. G. Pathologic aspects of cirrhosis. **Am J Med**, v. 24, n. 4, p. 593-619, Apr 1958.

PORTH, C. M. Disorders of Hepatobiliary and Exocrine Pancreas Function. In: PORTH, C. M. (Ed.). **Pathophysiology: Concepts of Altered Health States**. 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

POWELL, L. W.; KERR, J. F. Reversal of "cirrhosis" in idiopathic haemochromatosis following long-term intensive venesection therapy. **Australas Ann Med**, v. 19, n. 1, p. 54-7, Feb 1970.

POYNARD, T.; BEDOSSA, P.; OPOLON, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. **Lancet**, v. 349, n. 9055, p. 825-32, Mar 22 1997.

POYNARD, T. et al. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, v. 122, n. 5, p. 1303-13, May 2002.

PROCTOR, E.; CHATAMRA, K. Standardized micronodular cirrhosis in the rat. **Eur Surg Res**, v. 16, n. 3, p. 182-6, 1984.

QUINN, P. S.; HIGGINSON, J. Reversible and Irreversible Changes in Experimental Cirrhosis. **Am J Pathol**, v. 47, p. 353-69, Sep 1965.

RAPPAPORT, A. M. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 119, p. 11-27, 1954.

RAPPAPORT, A. M. et al. The scarring of the liver acini (Cirrhosis). Tridimensional and microcirculatory considerations. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, v. 402, n. 2, p. 107-37, 1983.

RECKNAGEL, R. O. et al. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. **Pharmacol Ther**, v. 43, n. 1, p. 139-54, 1989.

Report of the board for classification and nomenclature of cirrhosis of the liver. Fifth Panamerican Congress of Gastroenterology, 1956. Havana, Cuba.

ROBSON, S. C. Liver Endothelial Cells: Hemostasis, Thrombosis and Hepatic Vascular Diseases. In: DELEVE, L. D. e GARCIA-TSAO, G. (Ed.). **Vascular Liver Disease: Mechanisms and Management**. New York: Springer, 2011.

ROSA, H. et al. Controlled production of cirrhosis in the rat liver. **Arq Gastroenterol**, v. 28, n. 1, p. 39-43, Jan-Mar 1991.

ROSKAMS, T.; DESMET, V. J.; VERSLYPE, C. Development, structure and function of the liver. In: BURT, A. D.; FERRELL, L. D. e PORTMANN, B. (Ed.). **Macsween's pathology of the liver**. 5. ed. London: Churchill Livingstone/Elsevier, 2007.

RÖSSLE, R. Entzündungen der Leber. In: HENKE, F. e LUBARSCH, O. (Ed.). **Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie**. Berlin: Julius Springer, v.5, 1930.

RUBIN, E.; HUTTERER, F.; POPPER, H. Cell proliferation and fiber formation in chronic carbon tetrachloride intoxication. A morphologic and chemical study. **Am J Pathol**, v. 42, p. 715-28, Jun 1963.

RUBIN, E.; POPPER, H. The evolution of human cirrhosis deduced from observations in experimental animals. **Medicine (Baltimore)**, v. 46, n. 2, p. 163-83, Mar 1967.

SCHAFFNER, F.; POPPER, H. Capillarization of hepatic sinusoids in man. **Gastroenterology**, v. 44, p. 239-42, Mar 1963.

SCHAFFNER, F.; SIERATZKI, J. S. The early history of cirrhosis. In: BOYER, J. L. e BIANCHI, L. (Ed.). **Liver Cirrhosis**. Lancaster: MTP Press Limited, 1987.

SCHINONI, M. I.; PARANA, R. [Apoptosis and progression of hepatic fibrosis in liver diseases]. **Acta Gastroenterol Latinoam**, v. 36, n. 4, p. 211-7, Dec 2006.

SCHUETZ, E. G. et al. Regulation of gene expression in adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix. **J Cell Physiol**, v. 134, n. 3, p. 309-23, Mar 1988.

SCHULZ, R. T. **Valor preditivo de marcadores laboratoriais não invasivos para o diagnóstico de fibrose hepática na recidiva da hepatite C crônica pós-transplante de fígado.** 2010. (Dissertação). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SCHUPPAN, D.; AFDHAL, N. H. Liver cirrhosis. **Lancet**, v. 371, n. 9615, p. 838-51, Mar 8 2008.

SEMELA, D. et al. Platelet-derived growth factor signaling through ephrin-b2 regulates hepatic vascular structure and function. **Gastroenterology**, v. 135, n. 2, p. 671-9, Aug 2008.

SHERMAN, I. A.; PAPPAS, S. C.; FISHER, M. M. Hepatic microvascular changes associated with development of liver fibrosis and cirrhosis. **Am J Physiol**, v. 258, n. 2 Pt 2, p. H460-5, Feb 1990.

SHI, J. et al. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. **Am J Pathol**, v. 153, n. 2, p. 515-25, Aug 1998.

SHIRATORI, Y. et al. Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. **Ann Intern Med**, v. 132, n. 7, p. 517-24, Apr 4 2000.

STENGER, R. J. Hepatic sinusoids in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. An electron microscopic study. **Arch Pathol**, v. 81, n. 5, p. 439-47, May 1966.

SUN, A. Y. et al. Ethanol and oxidative stress. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 5 Suppl ISBRA, p. 237S-243S, May 2001.

SZTARK, F. et al. The sinusoidal barrier in alcoholic patients without liver fibrosis. A morphometric study. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, v. 409, n. 3, p. 385-93, 1986.

TSUKAMOTO, H.; MATSUOKA, M.; FRENCH, S. W. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. **Semin Liver Dis**, v. 10, n. 1, p. 56-65, Feb 1990.

TUGUES, S. et al. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. **Hepatology**, v. 46, n. 6, p. 1919-26, Dec 2007.

VARIN, F.; HUET, P. M. Hepatic microcirculation in the perfused cirrhotic rat liver. **J Clin Invest**, v. 76, n. 5, p. 1904-12, Nov 1985.

VOIETA, I. et al. Imaging techniques and histology in the evaluation of liver fibrosis in hepatosplenic schistosomiasis mansoni in Brazil: a comparative study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 414-21, Jul 2010.

VOLLMAR, B.; SIEGMUND, S.; MENGER, M. D. An intravital fluorescence microscopic study of hepatic microvascular and cellular derangements in developing cirrhosis in rats. **Hepatology**, v. 27, n. 6, p. 1544-53, Jun 1998.

WANLESS, I. R. Vascular Disease in the Pathogenesis of Cirrhosis. **Institute of Bioengineering and Nanotechnology Seminars**, Singapore, 2010. Disponível em: < <http://www.ibn.a-star.edu.sg> >. Acesso em: 10 out. 2011.

WANLESS, I. R.; NAKASHIMA, E.; SHERMAN, M. Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. **Arch Pathol Lab Med**, v. 124, n. 11, p. 1599-607, Nov 2000.

WANLESS, I. R. et al. Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension. **Hepatology**, v. 21, n. 5, p. 1238-47, May 1995.

WEILER-NORMANN, C.; HERKEL, J.; LOHSE, A. W. Mouse models of liver fibrosis. **Z Gastroenterol**, v. 45, n. 1, p. 43-50, Jan 2007.

WELLS, R. G. Hepatic Fibrosis and Cirrhosis. In: MONGA, S. P. S. (Ed.). **Molecular Pathology of Liver Diseases**. New York: Springer, 2011.

WELLS, R. G.; KRUGLOV, E.; DRANOFF, J. A. Autocrine release of TGF-beta by portal fibroblasts regulates cell growth. **FEBS Lett**, v. 559, n. 1-3, p. 107-10, Feb 13 2004.

WILLIAMS, R. et al. Venesection therapy in idiopathic haemochromatosis. An analysis of 40 treated and 18 untreated patients. **Q J Med**, v. 38, n. 149, p. 1-16, Jan 1969.

WISSE, E. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. **J Ultrastruct Res**, v. 31, n. 1, p. 125-50, Apr 1970.

_____. An ultrastructural characterization of the endothelial cell in the rat liver sinusoid under normal and various experimental conditions, as a contribution to the distinction between endothelial and Kupffer cells. **J Ultrastruct Res**, v. 38, n. 5, p. 528-62, Mar 1972.

WISSE, E. et al. The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. **Hepatology**, v. 5, n. 4, p. 683-92, Jul-Aug 1985.

WU, J.; NORTON, P. A. Animal models of liver fibrosis. **Scand J Gastroenterol**, v. 31, n. 12, p. 1137-43, Dec 1996.

XIE, G.; KANEL, G. C.; DELEVE, L. D. 1 CGMP Signaling Regulates Liver Sinusoidal Endothelial Cell (SEC) Phenotype and Accelerates Reversal of Cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 138, n. 5, p. S-773, 2010.

YEONG, M. L.; NICHOLSON, G. I.; LEE, S. P. Regression of biliary cirrhosis following choledochal cyst drainage. **Gastroenterology**, v. 82, n. 2, p. 332-5, Feb 1982.

ZEISBERG, M. et al. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. **J Biol Chem**, v. 282, n. 32, p. 23337-47, Aug 10 2007.

ZIMMERMANN, H. et al. Reversibility of secondary biliary fibrosis by biliodigestive anastomosis in the rat. **Gastroenterology**, v. 103, n. 2, p. 579-89, Aug 1992.