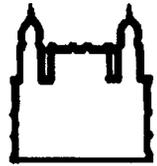




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO FISIOPATOLÓGICO COMPARATIVO DA
INFECCÃO POR *Capillaria hepatica* EM RATOS
E CAMUNDONGOS**

STELAMARES BOYDA DE ANDRADE

**Salvador - Bahia - Brasil
2003**



001703

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

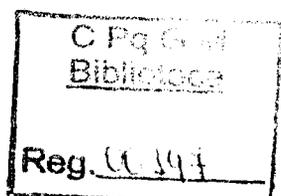
**ESTUDO FISIOPATOLÓGICO COMPARATIVO DA INFECÇÃO
POR *Capillaria hepatica* EM RATOS E CAMUNDONGOS**

STELAMARES BOYDA DE ANDRADE

Orientador: Dr. Zilton de Araújo Andrade

Dissertação apresentada para obtenção de
grau de Mestre em Patologia, área de
concentração em Patologia Experimental.

Salvador - Bahia - Brasil
2003



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM / FIOCRUZ
Salvador - Bahia.

Andrade, Stelamares Boyda de
A553e Estudo fisiopatológico comparativo da infecção por *Capillaria hepática*
em ratos e camundongos / Stelamares Boyda de Andrade. _ Salvador:
Universidade Federal da Bahia / Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz,
Fundação Oswaldo Cruz, 2003.

87 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)- Universidade
Federal da Bahia, 2003.

1. *Capillaria hepática*. 2. Fibrose. 3. Fibrose hepática. 4. Patologia. I.
Título.

CDU 616.995.132

CDU 616.995.132
FIOCRUZ

ESTUDO FISIOPATÓLOGICO COMPARATIVO DA INFECÇÃO POR CAPILLARIA
HEPATICA EM RATOS E CAMUNDONGOS

STELAMARES BOYDA DE ANDRADE

FOLHA DE APROVAÇÃO

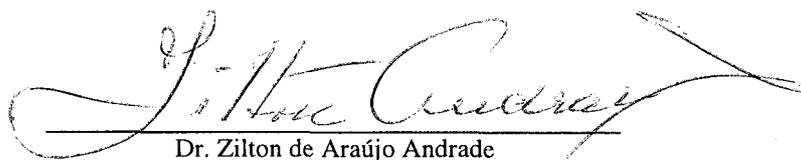
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Eduardo Luiz Trindade Moreira
Professor Adjunto
E.M.V. - UFBA



Dr. Eduardo Antônio G. Ramos
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Zilton de Araújo Andrade
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ

“Amo a música. Acredito na melhora do planeta. Confio que nem tudo está perdido. Creio na bondade do ser humano e percebo que a loucura é fundamental. Agora só me faltam carneiros e cabras pastando solenes no meu jardim – VIVER É ÓTIMO!”

(Elis Regina)

DEDICATÓRIA

Dedico esta Dissertação ao meu pai que, apesar de ter-se ausentado muito cedo, deixou-me sedimentados exemplos de amor, cidadania e princípios morais. À minha mãe pelo dedicado carinho materno e pela inabalável torcida para que tudo sempre desse certo. Aos meus irmãos Adeir, Benicio, Cleusa, Deroaldo, Edvaldo e Elza por terem sido maravilhosos guias, pelo apoio incondicional em todos os momentos difíceis e por terem me fornecido todas as ferramentas necessárias para que eu seguisse em frente. Ao meu adorável filho Rudah por ter, desde o momento inicial da sua vida, representado muito amor e força para mim, requisitos indispensáveis para que eu pudesse superar os obstáculos iminentes. Ao meu companheiro Sergio Bitencourt pela compreensão, cumplicidade, apoio e estímulo, sem os quais eu não poderia ter concluído este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por significar tudo o que há de positivo no universo e ter estado sempre presente, mantendo meu otimismo e me ajudando a escolher os melhores caminhos.

Ao Dr. Zilton de Araújo Andrade pela oportunidade de ter trabalhado em sua equipe e pelas agradáveis horas de ensinamentos, as quais foram fundamentais para nortear o meu desenvolvimento científico e meu crescimento pessoal. Agradeço-o também pela excelente orientação dedicada neste trabalho e pelos exemplos de serenidade, equilíbrio e humildade.

À Dra. Sônia Gomes Andrade por ter sido um grande exemplo de mulher e pesquisadora, pelos ensinamentos, estímulos e pelo apoio técnico-científico no fornecimento de material didático, equipamentos e substâncias durante todo este período.

Ao técnico do Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX), Sr. Antônio Carlos dos Santos, pela excelente ajuda dispensada na contenção e anestesia dos animais experimentais.

À Tecnologista Veterinária do LAPEX, Rejane Menezes, pelo imprescindível apoio dedicado nas biópsias realizadas durante todo o experimento.

À bióloga Bárbara Alves pelo indispensável auxílio no que diz respeito aos cortes realizados nos tecidos criopreservados, bem como na formatação das figuras.

À bióloga Márcia Souza pela disponibilidade em aconselhar-me nos assuntos técnico-científicos e pela ajuda em muitos procedimentos práticos.

À bióloga Ana Cristina Gonzalez pela agradável e eficiente ajuda na técnica de imunofluorescência indireta.

À bióloga Queli Lemos pelo auxílio imprescindível quando à técnica de ELISA e nos demais momentos necessários.

Às biólogas Luciana Flannery, Cláudia Borges, Sheila e todos os demais componentes da grande família LAPEX, os quais sempre estiveram dispostos a contribuir de alguma maneira – muito obrigada.

À bióloga Ísis Santos pelos conselhos e ensinamentos técnicos com relação às dosagens das imunoglobulinas, sempre dispensados de forma dedicada e cuidadosa.

Ao técnico do Laboratório de Doenças de Chagas e funcionário do biotério, Sr. Preciano Correia, pelo cauteloso manejo e preocupação com os animais experimentais.

À técnica do Laboratório de Doenças de Chagas, Sra. Dinalva de Jesus, pela boa vontade quanto ao apoio técnico na utilização de equipamentos.

Aos biólogos do Laboratório de Doenças de Chagas Juracy Barbosa, Fátima Barbosa, Rita Cunha e Ariane Pimentel pela boa vontade e disponibilidade dispensada em todos os momentos necessários.

Ao Dr. Mitermayer Galvão dos Reis pela confiança em mim depositada e pelo incentivo dedicado aos estudantes de pós-graduação do Centro de Pesquisas Gonçalo-Moniz (CPqGM).

A todos os pesquisadores e professores do CPqGM pelos ensinamentos e admirável contribuição à pesquisa nacional e internacional.

À secretária da Coordenação de Ensino, Rosália Meires da Silva, pela paciência, estímulo e apoio incontestável.

À bibliotecária Ana Maria Fiscina Sampaio pelo importante auxílio na correção das referências bibliográficas.

À D. Edite Santos pela dedicada ajuda que sempre obtive quando necessitei de xerox.

Ao funcionário Mário Cordeiro, do Setor de Comunicação Visual e Documentação Científica, pela ajuda imprescindível na etapa de finalização deste trabalho.

À minha prima, a farmacêutica bioquímica Maria da Conceição Bastos, pelo apoio técnico-científico que obtive na contagem diferencial dos leucócitos, atenção e companheirismo fundamentais na conclusão deste trabalho.

Aos professores e amigos da Escola de Medicina Veterinária da UFBA, aos quais devo parte da minha formação acadêmica, por estarem sempre disponíveis em todos os momentos necessários.

À Dra. Maria das Graças Farias Pinto, pelo exemplo e precioso estímulo para o meu ingresso num curso de pós-graduação.

Aos companheiros de trabalho, Dr. Eliel Judson Pinheiro, Dr. Heitor Dourado Portela Povoas e a Médica Veterinária Adriana de Farias Jucá, pela compreensão e estímulo no período de conclusão deste trabalho.

À Dra. Mariza Paixão, Chefe do Setor de Análises Clínicas do Laboratório Central (LACEN) pela importante contribuição ao disponibilizar os serviços do Laboratório de Hematologia e do Setor de Bioquímica.

Aos funcionários do Laboratório de Hematologia do LACEN: Haydee Nascimento, Paulo Calafange, Maria Luiza Ribeiro, Daisy Ribeiro, Humberto Eloy, Luciene Maria Souza, Marta Menezes e Sofia Ribeiro pelo apoio técnico na realização de todos os hemogramas solicitados.

Aos funcionários do Setor de Bioquímica do LACEN: Amália Chagas, Rosa Veloso, Eline Carvalho e Nevolanda dos Santos pelo apoio técnico na realização de todas as dosagens bioquímicas solicitadas.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada.

FONTES DE FINANCIAMENTO

- PAPES III – FIOCRUZ – Projeto *Capillaria hepatica*
- PRONEX – Sub-Projeto Esquistossomose.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	CAPILLARIA HEPATICA.....	16
2.2	MODELOS EXPERIMENTAIS DE FIBROSE HEPÁTICA.....	19
2.2.1	O Modelo da Capilaríase no Rato.....	20
2.2.2	O Modelo da Capilaríase no Camundongo.....	22
2.2.3	Outros Modelos Experimentais.....	23
3	OBJETIVOS	29
3.1	Geral.....	29
3.2	Específicos.....	29
4	JUSTIFICATIVA	30
5	MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	31
5.1.1	Sala de Experimentação.....	31
5.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
5.3	INÓCULO.....	33
5.3.1	Infecção.....	36
5.4	TÉCNICAS.....	36
5.4.1	Estudo Histopatológico.....	36
5.4.2	Estudo Sorológico.....	38

5.4.3	Estudo Hematológico.....	39
6	RESULTADOS.....	41
6.1	HISTOPATOLOGIA.....	41
6.1.1	Estudo Histológico.....	41
6.2	SOROLOGIA.....	56
6.2.1	Anticorpos séricos anti- <i>C. hepatica</i>	56
6.2.2	Perfil Hepático.....	56
6.3	HEMATOLOGIA.....	61
6.3.1	Hemograma Completo.....	61
7	DISCUSSÃO.....	70
8	CONCLUSÕES.....	75
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CCL ₄	Tetracloroeto de carbono
CHGM	Concentração da hemoglobina globular média
DMNA	Dimetilnitrosamina
γ-GT	Gama-glutamil transpeptidase
HGM	Hemoglobina globular média
Ig	Imunoglobulina
PBS	Phosphate Buffered Saline
TAA	Tioacetamida
VGMH	Volume globular médio das hemácias

RESUMO

ESTUDO FISIOPATOLÓGICO COMPARATIVO DA INFECÇÃO POR *Capillaria hepatica* EM RATOS E CAMUNDONGOS. **STELAMARES BOYDA DE ANDRADE.** Ratos e camundongos são hospedeiros dos mais susceptíveis ao helminto *Capillaria hepatica*. Ambos são utilizados experimentalmente para estudos de biologia, parasitologia, patogenia, imunopatologia, tratamento etc, desta helmintíase. Assim, um melhor conhecimento das semelhanças e diferenças entre estes dois hospedeiros se faz necessário. O presente estudo faz uma investigação escalonada das lesões hepáticas em ratos e camundongos infectados com *C. hepatica*, através de técnicas histológicas básicas e de imunofluorescência para a matriz extracelular, acompanhadas de testes hematológicos, bioquímicos e sorológicos. A presença de lesões focais necrótico-inflamatórias, em torno dos vermes mortos e seus ovos, acompanhada por uma difusa hepatite reacional, foi vista como alterações iniciais e semelhantes, em ratos e camundongos infectados pela *C. hepatica*. A partir daí as diferenças na patologia hepática entre os dois hospedeiros foram se acentuando. Embora a presença de vermes vivos tenha sido notada por tempo mais prolongado na infecção do camundongo, as lesões neste hospedeiro foram moduladas mais rápida e intensamente do que no rato, havendo inclusive desaparecimento quase total da fibrose, até mesmo nos focos de depósitos de ovos. Nos ratos, a modulação das lesões parasitárias focais e suas repercussões difusas são seguidas pelo aparecimento de uma fibrose septal, que conecta espaços-porta e veias centrais entre si, conduzindo ao quadro morfológico de cirrose. As modificações funcionais estudadas mostraram uma boa correlação com os dados morfológicos descritos, indicativos das principais diferenças entre os dois hospedeiros da *C. hepatica*. Os dados obtidos, além de servirem de base para estudos futuros, confirmam a ausência da fibrose septal no camundongo e demonstram que, a capacidade deste último hospedeiro em processar uma modulação mais rápida e profunda das lesões hepáticas, aparece como a explicação mais evidente para os diferentes resultados patológicos finais exibidos pela patologia hepática nos dois hospedeiros.

Palavras-chaves: *Capillaria hepatica*. Fibrose. Fibrose hepática. Patologia.

ABSTRACT

COMPARATIVE PHYSIOPATHOLOGIC STUDY ON *Capillaria hepatica* INFECTION OF RATS AND MICE. **STELAMARES BOYDA DE ANDRADE**. Rats and mice are among the most susceptible hosts for the helminth *Capillaria hepatica*. Both have experimentally been utilized for studies on the biology, parasitology, pathogenesis, immunopathology, chemotherapy and so on. Therefore, more information about the similarities and differences between these two parasite hosts seems necessary. The present comparative study concerns a sequential basic histopathological and immunofluorescence research on the hepatic lesions, combined with hematologic, biochemical and serologic data, from both mice and rats infected with *C.hepatica*. The presence of focal necro-inflammatory changes around dead parasites and their eggs, accompanied by diffuse and intense reactive hepatitis, represented an early and similar picture for both hosts. From then on, differences in hepatic pathology between these two hosts became evident. Although worms remained alive for more prolonged time in mice than in rats, hepatic changes were more rapidly and deeply modulated in the former, even leading to an almost complete disappearance of fibrosis, including that formed within the focal and densely packed deposits of eggs. As for the rats, modulation of the focal parasitic lesions were followed by the formation of septal fibrosis, a process where fine and long fibrous septa connected portal spaces and central canals in such a way as to form a final morphologic picture of cirrhosis. Functional data obtained from blood and serum presented good correlations with the morphologic findings at different phases of the evolution of infection. Present data, besides their relevance as baseline for future studies, are confirmatory of the absence of *C.hepatica*-related septal fibrosis in mice, and are demonstrative of this host ability to process a more rapid and complete modulation of the hepatic changes. Such capacity is probably at the roots of the explanation for the main differences found between *C. hepatica* liver pathology in mice and rats.

Key-words: *Capillaria hepatica*. Fibrosis. Hepatic fibrosis. Pathology.

1 INTRODUÇÃO

Capillaria hepatica é um helminto nematódeo que parasita uma grande variedade de mamíferos. O fígado é o habitat natural deste verme que, entretanto, pouco após atingir a maturidade e depositar seus ovos, vem a morrer e se desintegrar no interior do órgão. O processo seguinte se faz sob a forma de uma reação necrótico-inflamatória em torno dos vermes mortos, que tende a circunscrever a área lesada formando uma cápsula fibrosa, isolando os detritos parasitários e seus ovos. A partir daí, a evolução das lesões difere substancialmente entre ratos e camundongos. Tais diferenças envolvem aspectos fundamentais de imunopatologia parasitária e de fibrogênese hepática, entre outros, os quais merecem uma maior investigação, não só para esclarecer aspectos fisiopatológicos, como para melhor caracterizar os respectivos modelos experimentais exibidos por ratos e camundongos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CAPILLARIA HEPATICA

A *Capillaria hepatica* pertence à família *Capillaridae* (BORUCINSKA, 1997). Foi descrita pela primeira vez por BANCROFT em 1893, que a denominou *Trichocephalus hepaticus*. Em 1916, Hall a classificou como *Hepaticola hepatica*. Baylis, em 1931, incluiu-a no gênero *Capillaria*, e, finalmente foi denominada *C. hepatica*, sendo assim reconhecida até os dias atuais. O verme adulto tem simetria bilateral, corpo cilíndrico, alongado, não segmentado, revestido por cutícula e desprovido de membros articulados. Apresenta dimorfismo sexual, sendo as fêmeas maiores que os machos. Os ovos têm formato oval, casca dupla e apresentam estrias na casca externa (GALVÃO, 1981; FERREIRA, 1992; SOUZA, 1998), com espessamentos nas extremidades, parecendo-se com os ovos do tricocéfalos.

O ciclo da *C. hepatica* é abortivo, ficando ovos e vermes abrigados no parênquima hepático do hospedeiro. A **infecção verdadeira** ocorre com a ingestão de ovos embrionados, os quais eclodem ao nível do ceco liberando larvas que atravessam a mucosa intestinal e migram, através do sistema porta, para o fígado. Os vermes permanecem no fígado, onde liberam os seus ovos em torno de 30 dias após a infecção. Em seguida, os vermes se desintegram e, juntamente com os ovos liberados, provocam uma reação inflamatória crônica granulomatosa, que evolui, nos ratos, para a formação de uma fibrose disseminada, do tipo septal. Os ovos só vêm a escapar do fígado com a morte do hospedeiro, quando são liberados no meio ambiente. Então, em circunstâncias favoráveis de temperatura e umidade, podem embrionar e se tornar infectantes para algum mamífero, especialmente roedores, que, ocasionalmente, venha a ingeri-los. Assim, o ciclo prossegue continuamente (BHATTACHARYA, 1999; COCHRANE *et al.*, 1957; VARGAS CARRETO *et al.*, 1979).

CHIEFFI *et al.* (1981), num estudo feito entre 1977 e 1979, registraram a eliminação fecal de ovos do parasita, a partir de murídeos infectados, capturados na cidade de São Paulo. Embora estes autores reconheçam que seus resultados são conflitantes com os dados existentes na literatura, defendem a possibilidade desta eliminação fecal ter uma importante contribuição na transmissão do parasita. OKAEME (1985), num estudo sobre o papel de cães e gatos na transmissão de infecções parasitárias incomuns para o homem, notificou a presença de ovos de *C. hepatica* nas fezes de gatos infectados. Entretanto, o autor não comprovou a infecção verdadeira nestes animais, visto que não foram realizados os estudos histopatológicos dos fígados.

A **infecção espúria** ocorre quando o hospedeiro ingere ovos não embrionados, os quais passam incólumes através do tubo digestivo e são eliminados nas fezes (FERREIRA, 1992; GALVÃO, 1981).

A *C. hepatica* infecta várias espécies de mamíferos, domésticos ou selvagens, tais como gorilas – *Gorilla gorilla beringei* (GRACZYK *et al.*, 1999), porcos-espinhos - *Erethizon dorsatum* (HAMIR & RUPPRECHT, 2000), eqüinos (MUNROE, 1984), cães, gatos (OKAEME, 1985), e, inclusive o homem (ATTAH *et al.*, 1983; BERGER *et al.*, 1990; CHOE *et al.*, 1993; COCHRANE *et al.*, 1957; FAN *et al.*, 2000; GONZÁLEZ BARRANCO *et al.*, 1996; GOVIL & DESAI, 1996; KOHATSU *et al.*, 1995; PEREIRA & FRANÇA, 1981; PEREIRA & FRANÇA, 1983). Ovos de *C. hepatica* foram encontrados em insetos dípteros, num estudo que analisava o papel da *Musca domestica* e da *Chrysomya megacephala* como vetores mecânicos de helmintos (MONZON *et al.*, 1991). O parasita tem como hospedeiros naturais os roedores, principalmente ratos e camundongos, e, tem sido encontrado em quase todas as regiões do mundo, sob as mais diversas condições climáticas e ambientais (BHATTACHARYA, 1999; GALVÃO, 1981; NAMUE & WONGSAWAD, 1997; NASCIMENTO & SADIGURSKY, 1986). A incidência e prevalência em ratos são relativamente altas. No Brasil, foi encontrada uma prevalência de 57% entre

os *Rattus norvegicus* capturados na cidade de Salvador (GALVÃO, 1976). Em São Paulo, entre os anos de 1977 e 1979, CHIEFFI *et al.* (1981) encontraram 120 ratos (*R. norvegicus* e *R. rattus*) com capilaríase hepática. DAVOUST *et al.* (1997), encontraram um percentual de 44% de ratos infectados pela *C. hepatica*, entre 82 ratos (*R. norvegicus* e *R. rattus alexandrinus*) capturados em Marseille, França. Em Chunchon, Korea, 43 ratos (*R. norvegicus*) foram capturados e 11 mostraram-se parasitados por *C. hepatica* (SEONG *et al.*, 1995).

Quatro tipos de capilaríase humana são conhecidos: pulmonar (*C. aerophilus*), hepática (*C. hepatica*), intestinal (*C. philipensis*) e cutânea (*C. cutanae*) (VARGAS CARRETO *et al.*, 1979). BOUCHET (1997), estudou 23 exames parasitológicos de fezes humanas, em Chalain, França, tendo registrado a presença de ovos de *Capillaria sp.* em 21 deles. A infecção pela *C. hepatica* não é comum no homem, e, aproximadamente 42 casos foram descritos no mundo até 1999 (FAN *et al.*, 2000), mais frequentemente entre crianças de 1 a 5 anos de idade (BERGER *et al.*, 1990; COCHRANE *et al.*, 1957; CHOE *et al.*, 1993; FAN *et al.*, 2000; KOKAI *et al.*, 1990; SAWAMURA *et al.*, 1999; TERRIER *et al.*, 1999; VARGAS CARRETO *et al.*, 1979). Estes casos são geralmente graves e caracterizam-se pela tríade que envolve febre persistente (39 à 40° C), hepatomegalia e leucocitose com hiper-eosinofilia. Na maioria das vezes, o diagnóstico é feito no exame *post mortem*. Nos casos em que o diagnóstico é feito através da biópsia hepática, os pacientes podem responder bem ao tratamento com tiabendazol, embora na maioria das vezes esta droga não seja bem tolerada (ATTAH *et al.*, 1983; BERGER *et al.*, 1990; CHOE *et al.*, 1993; COCHRANE *et al.*, 1957; KOHATSU *et al.*, 1995; SAWAMURA *et al.*, 1999; TERRIER *et al.*, 1999). Suspeita-se que a infecção em seres humanos seja mais frequente, e, que as dificuldades existentes para revelar a presença do parasita, através de técnicas parasitológicas ou imunológicas, dificultem o diagnóstico (CHIEFFI *et al.*, 1981; GALVÃO, 1976; GALVÃO, 1981).

A infecção espúria não é incomum em humanos, sendo que 34 casos foram descritos até 1956. Entretanto é possível que o número de casos de infecção espúria seja bem maior do que aquele já relatado, pois, neste tipo de infecção, os ovos são eliminados nas fezes, e, muitas vezes podem ser confundidos com ovos de *T. trichiuris* (FAN *et al.*, 2000; GALVÃO, 1981).

Levando-se em conta o grande número de roedores existente nas grandes metrópoles brasileiras, a possibilidade de contato dos pequenos animais domésticos com os murinos e que as condições sócio-econômicas da maioria da população possibilita um contato direto e constante das pessoas, principalmente crianças, com estas espécies ou com água e alimentos contaminados, é bem provável que este parasita tenha, em patologia humana, uma importância maior do que a que lhe é atribuída.

Em contrapartida, alguns autores estudam a possibilidade deste helminto regular a abundância de camundongos domésticos (*Mus musculus domesticus*), funcionando como agente de controle biológico (BARKER *et al.*, 1991; McCALLUM & SINGLETON, 1989; McCALLUM, 1993; SINGLETON & McCALLUM, 1990; SINGLETON *et al.*, 1991; SINGLETON & CHAMBERS, 1996; SPRATT, 1990).

Estudos anátomo-patológicos da infecção experimental têm sido realizados por diversos autores, entretanto a literatura é carente de dados que caracterizem de modo amplo e efetivo a fisiopatologia da infecção, principalmente no que diz respeito à imunopatologia.

2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE FIBROSE HEPÁTICA

Fibrose é um processo patológico que ocorre como uma situação de reparo, quando a fibrogênese predomina sobre a fibrogenólise. A deposição de colágeno, particularmente dos colágenos tipos I, III, V e VII, tem consequências duradouras sobre o fígado. Nos estágios iniciais, a fibrose pode se desenvolver em torno do espaço-porta ou

da veia central, ou pode ser depositada diretamente no espaço de Disse. A ativação de células perisinusoidais indica que a fibrose hepática é um processo dinâmico que pode implicar no eixo formado entre células de Kupffer - células de Ito. A evolução da fibrose leva o fígado a ser subdividido em nódulos de regeneração de hepatócitos, os quais são envolvidos por tecido de cicatrização, terminando por apresentar um quadro de cirrose (COTRAN *et al.*, 1994; SOUZA, 1998).

Quanto mais recente a fibrose, mais rápido é o processo de reabsorção. Nas fibroses mais antigas a degradação é muito mais lenta. Nas fibroses recentes, o colágeno tipo III predomina sobre o tipo I, porém a velocidade de reabsorção não parece depender do tipo de colágeno predominante, e sim do aparecimento de reticulação (cross-linking) entre suas moléculas, uma transformação progressiva e que pode ser intensificada com o passar do tempo (ANDRADE, 1999).

Desde o início do século XX pesquisadores em todo o mundo tentam desenvolver um modelo experimental adequado para o estudo da fibrose hepática. Apesar das limitações inerentes aos modelos experimentais em animais, estes têm dado importantes contribuições para o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares que permeiam tal patogênese (TSUKAMOTO *et al.*, 1990). O modelo da capilaríase hepática é relativamente recente e começou a ser utilizado em ratos Wistar no ano de 1991, no Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX), no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Bahia. Atualmente, no mesmo laboratório, o modelo está sendo definido em camundongos Swiss.

2.2.1 O Modelo da Capilaríase no Rato

Os ratos são hospedeiros naturais da *C. hepatica*. A maioria dos estudos feitos nestes animais resultou de pesquisas que investigaram a importância deste helminto em saúde pública. Os resultados geralmente limitam-se aos achados histopatológicos, os quais

mostram lesões hepáticas com reações granulomatosas focais, associadas aos ovos e/ou vermes, tecido necrótico e/ou focos necróticos calcificados e uma fina cápsula fibrótica periférica, contendo de pequeno a moderado número de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos, além da fibrose perisinusoidal, a qual aparece como uma característica constante (CERUTI *et al.*, 2001; DAVOUST *et al.*, 1997).

A fibrose septal não tem sido bem reconhecida como uma manifestação da capilaríase hepática em ratos. A infecção experimental nestes animais começou a ser utilizada há aproximadamente 10 anos como modelo para o estudo deste tipo peculiar de fibrose (FERREIRA & ANDRADE, 1993). Existem vários modelos que reproduzem a fibrose septal (infecção por *Schistosoma mansoni*, intoxicação por tetracloreto de carbono (CCl₄), cirrose septal incompleta, bem como injeções repetidas com soro de porco em ratos). Todavia, 100% dos ratos infectados com ovos embrionados de *C. hepatica* desenvolvem esta forma de fibrose de maneira regular e uniforme, com percentual mínimo de óbito entre os animais. Por esta razão, a infecção por este helminto em ratos representa um excelente modelo para o estudo da fibrose hepática.

FERREIRA & ANDRADE (1993), descreveram pela primeira vez a fibrose septal na infecção por *C. hepatica* em ratos. Estes autores chamaram atenção para o seu aparecimento relativamente tardio no curso da infecção, quando as lesões parasitárias focais já mostravam sinais de involução, cerca de 30 dias após a inoculação com ovos embrionados pela via endogástrica. A fibrose, de curso inicial progressivo, acaba formando um quadro que exhibe marcada septação, tornando o fígado semelhante ao do porco. Os septos, finos e longos, conectam espaço-porta com espaço-porta e estes com veias centro-lobulares e aparecem bem evidentes em torno do 40º dia pós-infecção, quando os vermes mortos e as lesões por eles determinadas sofrem encapsulamento e progressiva reabsorção. Localizados principalmente na zona III do ácino hepático, a microscopia óptica de alta resolução revela que estes septos contêm fibras colágenas,

vasos sanguíneos e muitos tipos celulares, especialmente fibroblastos e células armazenadoras de gordura. Com a evolução, a fibrose pode reproduzir um aspecto cirrótico, embora os nódulos hepatocitários não exibam nítidos sinais regenerativos. A imunofluorescência mostra a presença predominante do colágeno tipo III nos septos e colágeno tipo I na cápsula que envolve os nódulos parasitários. Fibronectina, elastina e laminina também são encontradas nos septos fibrosos. Estes autores mostraram ainda que as lesões inflamatórias e necróticas focais evoluem com encapsulamento e resolução, muitas vezes com calcificação.

Com relação ao inóculo, sabe-se que o seu tamanho não exerce influência na intensidade da fibrose septal, porém, o maior inóculo determina um aumento de lesões parasitárias focais (OLIVEIRA & ANDRADE, 2001).

2.2.2 O Modelo da Capilaríase no Camundongo

Os camundongos, assim como os ratos, são hospedeiros naturais da *C. hepatica*. Entretanto, o modelo da capilaríase para o estudo da fibrose hepática nesta espécie animal ainda está sendo caracterizado. Do ponto de vista histopatológico, estes animais respondem de forma diferenciada à infecção, fazendo-os parecer melhor adaptados ao parasita.

A infecção experimental mostra inicialmente uma marcada hepato-esplenomegalia, com hepatite aguda, intensa, difusa e focal. A histopatologia revela presença de vermes adultos e/ou imaturos, vivos e/ou mortos em diversos graus de desintegração e muitos ovos, ambos circundados por um grande infiltrado inflamatório, onde predominam os leucócitos polimorfonucleares. Estes aparecem também em áreas nas quais o parasita está ausente, caracterizando uma hepatite reacional. Esta fase aguda mostra também deposição de material hialino, com necrose coagulativa e purulenta. Cerca de 95 a 110 dias após a infecção, fígado e baço voltam ao tamanho normal, e, as lesões apresentam-

se involuídas, moduladas, com desaparecimento da hepatite reacional difusa e persistência das transformações fibróticas granulomatosas focais em torno de ovos e vermes em desintegração, onde se observa a presença de células gigantes e calcificação das lesões. O granuloma formado em torno dos ovos do parasita apresenta componentes da resposta celular e humoral, ou seja, predomínio de macrófagos e linfócitos, seguido da infiltração de eosinófilos. Uma fibrose perisinusoidal se desenvolve em torno destas lesões, porém, a fibrose septal não é observada (GALVÃO, 1981; GOTARDO *et al.*, 2000; RAYBOURNE *et al.*, 1974; SOLOMON & SOULSBY, 1973).

Dados sobre a resposta humoral na relação hospedeiro-parasita revelam a presença de anticorpos anti - *C. hepatica* no soro de camundongos experimentalmente infectados já a partir da primeira semana de infecção, ocorrendo inicialmente um aumento de IgM, seguido por uma intensificação de IgG, observada à partir da segunda semana de infecção. (GALVÃO, 1976; NASCIMENTO & SADIGURSKY, 1986; RAYBOURNE & SOLOMON, 1975; SOLOMON *et al.*, 1974).

2.2.3 Outros Modelos Experimentais

Existem vários outros modelos experimentais que reproduzem a fibrose hepática, tais como a administração de substâncias hepatotóxicas endógenas ou exógenas, dietas inadequadas, fatores imunológicos e/ou genéticos (TSUKAMOTO *et al.*, 1990):

→ Intoxicação por CCL₄: Esta é a hepatotoxina exógena mais amplamente utilizada em animais experimentais na indução da fibrose hepática. Este modelo tem possibilitado estudos sobre a deposição da matriz extra-celular, eficácia de várias drogas antifibrogênicas, associação das células de Ito com o processo fibrótico e alterações hemodinâmicas que ocorrem no fígado fibrótico ou cirrótico. A degeneração gordurosa pode ser observada, e, após interrupção do tratamento, o quadro fibrótico é resolvido. A

administração oral desta toxina, principalmente em doses repetitivas, é inconveniente por promover alta mortalidade e indução pouco consistente de fibrose hepática. Entretanto, a associação do CCL₄ com fenobarbitais resulta, em ratos, numa fibrogênese mais consistente e acelerada, com menor mortalidade (TSUKAMOTO *et al.*, 1990). Alguns experimentos realizados com CCL₄, em ratos, possibilitaram o reconhecimento da heterogeneidade dos clones de células armazenadoras de gordura, os quais podem ser excelentes modelos para o estudo do papel destas células na formação de matriz extracelular. (GREENWEL *et al.*, 1993; NIKI *et al.*, 1996). Estudos feitos em ratos Wistar machos, serviram também para comprovar a ação anti-fibrogênica de determinadas drogas (IGARASHI *et al.*, 1986). Além disso, esta linha de pesquisa ajuda a elucidar o importante papel das células de Kupffer na patogênese da fibrose (RIVERA *et al.*, 2001; SHIVATORI *et al.*, 1986).

→ Intoxicação por dimetilnitrosamina (DMNA) e tioacetamida (TAA): Estas duas toxinas carcinogênicas são muito utilizadas na indução experimental de fibrose hepática. Pequenas e repetitivas doses destas toxinas causam tumor no fígado, porém quando administradas em doses elevadas resultam em necrose e subsequente fibrose hepática. A DMNA quando administrada pela via oral ou através de injeção intraperitoneal em ratos, causa necrose centrolobular e periportal, diferindo do CCL₄ por não causar degeneração gordurosa nos hepatócitos. A produção de colágeno ocorre desde a fase inicial, e, a grande quantidade de colágeno tipo IV indica a elevação dos níveis desta proteína na membrana basal. Os septos fibrosos que se formam conectam veias centrais com espaços-porta. A fibrose ou cirrose estabelecida permanece estável por vários meses após a interrupção do uso da droga (ALA-KOKKO *et al.*, 1987). A fibrose hepática induzida por DMNA, em ratos, serve também como modelo para estudos sobre o efeito de drogas antifibrogênicas (NAKAMUTA *et al.*, 2001). A administração repetitiva de TAA em

ratos reproduz a fibrose septal, onde os septos fibrosos conectam espaços-porta entre si e entre veias centrais. As lesões formadas persistem por aproximadamente dois meses após o término do tratamento (ZIMMERMAN *et al.*, 1987).

→ Administração de endotoxinas: A utilização de endotoxinas promove alterações não específicas no fígado de ratos, incluindo acúmulo de lipídios dentro dos hepatócitos, e, principalmente, no espaço de Disse. Uma intensa necrose e subsequente fibrose podem ser observadas. A fibrose septal é também estabelecida. Este modelo permite a observação de que a expressão de citocinas anti-inflamatórias regulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, a sua utilização é limitada em razão da elevada taxa de mortalidade (JARVELAINEN *et al.*, 1999; LEVY *et al.*, 1968).

→ Manipulação da dieta:

a) A ingestão de etanol, associada a dietas ricas em gordura e pobres em proteína, leva a um quadro de fibrose em ratos. O acúmulo intracelular de lipídios ocorre tanto em áreas portais quanto em áreas centro-lobulares. A esteatose centrolobular é atribuída à deficiência de colina e na área portal à deficiência de outros aminoácidos. Uma fibrose septal é formada, conectando veias centrais entre si e entre espaços-porta. A desvantagem deste modelo deve-se ao fato de que a resposta é muito variável entre os animais e a duração do experimento é muito prolongada, dificultando o estudo dos estágios patológicos (LIEBER & DeCARLI, 1970; TSUKAMOTO *et al.*, 1986). French e colaboradores, num trabalho realizado com ratos adultos que receberam este tipo de dieta por um período de seis meses, sugerem que a fibrose septal formada no fígado destes animais pode ser iniciada a partir da necrose centro-lobular (FRENCH *et al.*, 1988).

b) Dietas pobres em proteínas e metionina, suplementadas com 0,5% de DL-etionina são fibrogênicas para ratos jovens. Este modelo resulta em necrose, proliferação celular e

subsequente fibrose. Este é um bom modelo para o estudo da fibrose difusa que ocorre em humanos com doença alcoólica aguda. Porém, a elevada mortalidade, formação inconsistente dos septos fibrosos e produção de cirrose, o torna inadequado para experimentos de longa duração (TSUKAMOTO *et al.*, 1990).

→ Intoxicação alcoólica: A ingestão excessiva de álcool é o maior fator etiológico de fibrose e cirrose em humanos. A reprodução experimental desta patologia é difícil devido à aversão natural que os animais têm ao etanol, o que dificulta a ingestão adequada. Além disso, é muito complicado definir em qual estágio nutricional os animais encontram-se intoxicados pelo etanol. As alterações observadas incluem esteatose hepática, seguida de necrose e subsequente fibrose, podendo evoluir para um quadro cirrótico. Experimentos realizados com ratos Wistar machos indicam que dietas enriquecidas com ácidos saturados e poli-saturados são capazes de reverter as lesões hepáticas provocadas pelo etanol (NANJI *et al.*, 1996). Outros estudos mostram que a deficiência nutricional pode afetar a toxicidade do etanol e do acetaldeído (LIEBER, 1994). Num estudo onde grupos de ratos Wistar machos foram expostos durante quatro semanas ao etanol, um dos grupos recebeu um agente tóxico para as células de Kupffer (o $GdCl_3$). As alterações hepáticas foram dramaticamente reduzidas neste grupo. Este modelo pode ser utilizado para demonstrar que a inativação das células de Kupffer protege o fígado contra a fibrose (ADACHI *et al.*, 1994).

→ Administração de soros heterólogos: A indução de fibrose hepática, em ratos, através da administração de soros heterólogos tem revelado a importância de fatores imunológicos na fibrogênese hepática. Substâncias antigênicas como soro de equino ou de suíno, albumina suína, gama globulina humana e globulina sérica suína, quando administradas repetidamente geram um quadro histológico que se caracteriza por uma

resposta fibrosa na área periportal e subsequente desenvolvimento de septos fibrosos, definindo um quadro de fibrose septal. Este modelo tem sido utilizado no estudo do papel dos macrófagos, células de Ito e miofibroblastos na fibrogênese hepática (PARONETTO & POPPER, 1966; TSUKAMOTO *et al.*, 1990). Injeções intra-peritoniais repetidas com soro de porco, em ratos, indicam que a formação dos septos fibrosos provavelmente depende de um estímulo prolongado e contínuo das células de Ito. Isto revela que o eixo formado entre estas células e as células de Kupffer tem importância na patogênese da fibrose septal (ANDRADE, 1991). O envolvimento do sistema imune na formação da fibrose hepática pode ser demonstrado num estudo onde ratos Wistar, tolerizados com injeções intra-peritoniais repetidas de soro de porco, desde o primeiro dia de vida, mostraram baixos níveis de anticorpos contra o antígeno utilizado e não desenvolveram a fibrose hepática (BHUNCHET *et al.*, 1996).

→ Antígenos bacterianos: O envolvimento do sistema imune na fibrogênese hepática pode ser demonstrado quando alguns produtos da parede celular de bactérias intestinais são administrados em ratos. Este modelo permite o estudo da resposta imune mediada por células, a qual produz lesões granulomatosas periportais no fígado de ratos que possuem timo, mas não em ratos atímicos. Este modelo de fibrose hepática dependente de linfócito T é utilizado para investigação dos mecanismos celulares e moleculares que envolvem macrófagos, células T e as citocinas produzidas por estes tipos celulares (RUTENBURG *et al.*, 1987; TSUKAMOTO *et al.*, 1990).

→ Infecção por *Schistosoma mansoni*: Camundongos infectados com *S. mansoni* desenvolvem granulomas na região portal do fígado. Estes granulomas consistem numa resposta inflamatória e imunológica aos ovos do parasita. Os fibroblastos estimulados depositam colágeno na matriz extra-celular, por vezes de maneira excessiva,

determinando o aparecimento de fibrose. Porém, esta fibrose não persiste se a inflamação desaparece. Uma vez cessado o estímulo da inflamação crônica, o excesso de matriz extracelular é total ou parcialmente removido por degradação (ANDRADE, 1999). Os granulomas esquistossomóticos podem também ser observados na parede intestinal (SILVA & ANDRADE, 1995). A infecção de camundongos com *S. mansoni* permite o estudo da modulação do granuloma (SILVA, 1998), bem como testar o efeito de drogas anti-fibrogênicas, a exemplo do Interferon- γ (LORTAT-JACOB *et al.*, 1997).

A fibrose septal é uma importante alteração patológica ainda pouco entendida em sua patogenia. Ocorre, como foi descrito, como uma reação inespecífica em várias doenças crônicas do fígado e pode ser reproduzida em diversos modelos experimentais. Este tipo de fibrose caracteriza-se pela formação de longos e finos septos que conectam espaços-porta entre si e espaços-porta com veia central, localizados principalmente na zona III do ácino hepático. A hipertrofia e hiperplasia das células perisinusoidais armazenadoras de gordura, observadas após necrose do parênquima, sugerem o importante papel destas células neste tipo de fibrose. A resposta imune, juntamente com os macrófagos, tem uma significativa contribuição na patogênese da fibrose septal hepática, pois, a mesma não se desenvolve no fígado de ratos adequadamente tolerizados com soro de porco, e se desenvolve nos animais não tolerizados. Outros autores têm postulado que estímulos imunológicos estão envolvidos na patogênese da fibrose septal (ANDRADE, 1991; BHUNCHET, 1996; CRAWFORD *et al.*, 1994; FERREIRA, 1992).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar, comparativamente, a cinética da infecção por *Capillaria hepatica* em ratos e camundongos, explorando as características morfológicas e funcionais nestes dois hospedeiros, com a finalidade de:

- a) Identificar o potencial de cada um dos hospedeiros como modelo experimental para o estudo da fibrose hepática.
- b) A partir de um estudo comparativo, procurar entender o motivo das diferenças de comportamento entre o rato e o camundongo diante do agente patogênico *Capillaria hepatica*.

3.2 Específicos

Avaliar, comparativamente, a infecção pela *C. hepatica* em ratos e camundongos quanto à:

- Produção, evolução e degradação da fibrose hepática;
- Comportamento dos anticorpos séricos anti-*C. hepatica*;
- Evolução das alterações funcionais do fígado (perfil hepático);
- Perfil hematológico.

4 JUSTIFICATIVA

Há evidências indicativas de que a fibrose septal que se desenvolve nos ratos infectados pela *Capillaria hepatica* tem uma base imunológica. Os extensos dados existentes sobre o modelo da fibrose hepática produzida por injeções intraperitoneais repetidas de soro de porco em ratos, também facilitam a compreensão da patogenia das lesões hepáticas causadas pela *C. hepatica* em ratos. Todavia o modelo no camundongo tem sido pouco explorado. A tentativa de se investigar, comparativamente, estes dois hospedeiros, tão diferentes nas suas respostas fibrogênicas hepáticas, é feita na suposição de uma melhor compreensão da patologia da capilaríase. Os resultados obtidos a partir de avaliações quantitativas e qualitativas, quando comparados entre uma espécie que desenvolve este tipo peculiar de fibrose (o rato) e outra que responde com hepatite crônica granulomatosa sem desenvolvimento da fibrose septal hepática (o camundongo), podem fornecer dados importantes para o conhecimento dos fatores que determinam estes diferentes padrões de resposta. Além disso, estes resultados fornecerão subsídios para um estudo mais aprofundado na imunopatologia da infecção e podem levar à caracterização de um modelo murino de capilaríase para o estudo da fibrose hepática.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Ratos → Foi utilizado um total de 20 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, machos, com idade variando entre um a três meses, pesando em média 100 a 200 gramas, provenientes do biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)/Ba.

Camundongos → Foram utilizados 60 camundongos (*Mus musculus*), linhagem Swiss, machos, entre um a três meses de idade, com peso variando entre 10 a 15 gramas, fornecidos pelo biotério do CPqGM – FIOCRUZ/Ba.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com tampas inoxidáveis, coletivas (cinco animais por caixa), com dimensões de 49x34x16cm (para os ratos) e 30x20x13cm (para os camundongos). As gaiolas eram forradas com maravalha de Pinus, trocada de 2 a 3 vezes por semana. A alimentação foi feita com uma ração comercial peletizada e água filtrada, fornecida em bebedouros de vidro, *ad libitum*.

5.1.1 Sala de Experimentação

Durante o período experimental os animais permaneceram no biotério do CPqGM – FIOCRUZ/Ba. Foram mantidos em salas, com condições apropriadas de temperatura (22+/- 2°C), umidade relativa do ar (55 +/- 10%), iluminação (luz fluorescente com ciclos de 12 horas claro/escuro) e exaustão (contínua).

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado um estudo experimental descritivo e comparativo, com análises histológicas, sorológicas, bioquímicas e hematológicas sequenciais, de ratos e camundongos infectados com *Capillaria hepatica*.

Ratos e camundongos foram divididos randomicamente, constituindo dois Grupos Experimentais (**R** e **C**). Estes foram subdivididos em Sub-Grupos de acordo com o tempo em que foram utilizados para a obtenção de amostras de tecido hepático, soro e sangue, e de acordo com o tipo de análise (histológica, sorológica, bioquímica ou hematológica) que seriam submetidos (Diagramas 1, 2, 3 e 4). Os pontos de coleta experimental (15, 40 e 70 dias pós-infecção para os ratos, e, 30, 45 e 90 dias pós-infecção para os camundongos) foram indicados a partir de experiências prévias do Laboratório de Patologia Experimental - LAPEX, como os momentos em que as lesões exibiam modificações mais evidentes.

Grupo R – Constituído por 20 ratos, mantidos vivos até o fim do experimento.

Sub-Grupo 1R → Destes animais foram obtidos materiais (tecido hepático, sangue e soro) 15 dias pós-infecção. Era composto pelos ratos, os quais estavam sub-divididos em 5 caixas (5 animais/caixa), cada uma destinada a um determinado tipo de análise (histológica, sorológica, bioquímica ou hematológica).

Sub-Grupo 2R → Idem, 40 dias após a infecção.

Sub-Grupo 3R → Idem, 70 dias após a infecção.

Grupo C – Constituído por 60 camundongos, eutanasiados nos respectivos pontos de coleta experimental.

Sub-Grupo 1C → Destes animais foram obtidos materiais (tecido hepático, sangue e soro) 30 dias pós-infecção. Era composto por 15 camundongos, os quais estavam sub-divididos em 3 caixas (5 animais/caixa), uma das quais era destinada a análise histológica e sorológica (1ª caixa:) e as outras duas destinadas às demais análises realizadas (2ª caixa: análise bioquímica; 3ª caixa: análise hematológica).

Sub-Grupo 2C → Idem, utilizados 45 dias após a infecção.

Sub-Grupo 3C → Idem, utilizados 90 dias após a infecção.

Controles → Cada animal, no que diz respeito aos ratos, serviu como seu próprio controle para todas as análises realizadas, uma vez que o material foi colhido com os animais mantidos vivos. Todavia, como os camundongos foram eutanasiados para obtenção das amostras, 15 animais foram utilizados como controles. Estes animais foram sub-divididos em 3 caixas (5 animais/caixa), uma das quais era destinada a análise histológica e sorológica (1ª caixa:) e as outras duas destinadas às demais análises realizadas (2ª caixa: análise bioquímica; 3ª caixa: análise hematológica).

5.3 INÓCULO

Ovos de *C. hepatica* foram obtidos a partir de fígados de ratos e/ou camundongos experimentalmente infectados para a manutenção do ciclo vital do helminto no LAPEX (SANTOS *et al.*, 2001). Os animais foram eutanasiados após um período igual ou superior a 30 dias pós-inoculação. Após anestesiá-los com éter, foi feita uma incisão longitudinal mediana na parede ventral do abdome, e os fígados foram removidos. Uma quantidade variável de solução salina a 0,85% foi adicionada aos fígados, que foram triturados num liquidificador doméstico, por um período de três minutos, alternadamente em alta e baixa rotação. O homogenado foi colocado em cálices de sedimentação por um período de 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi re-suspenso na mesma solução. Este procedimento foi repetido por 3 a 4 vezes até que o sobrenadante estivesse com aparência límpida. O sedimento, contendo ovos imaturos, foi colocado em placas de Petri forradas com papel-filtro e algodão umedecido em formol a 0,5% (câmara úmida). As placas foram mantidas à temperatura ambiente ($\pm 26^{\circ}\text{C}$) durante um período de 28 a 30 dias, quando os ovos, já embrionados, foram suspensos em solução salina e acondicionados em tubos Falcon. Estes foram preservados à temperatura da geladeira ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) até o momento do uso. Para obtenção do inóculo, o material obtido foi devidamente ajustado, a partir de uma alíquota equivalente a 1000 ovos / ml.

Diagrama 1

Diagrama 3

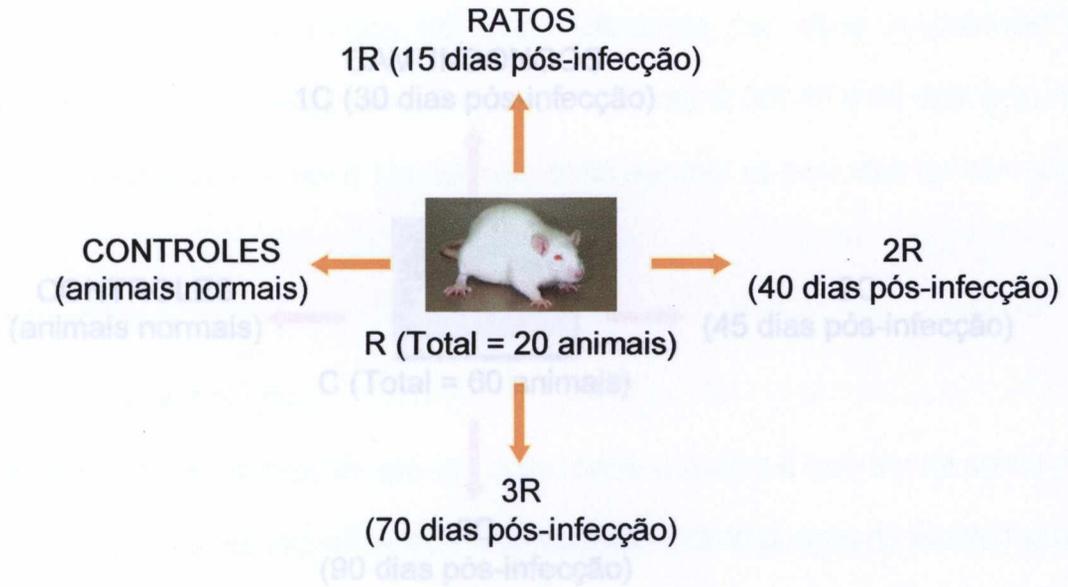
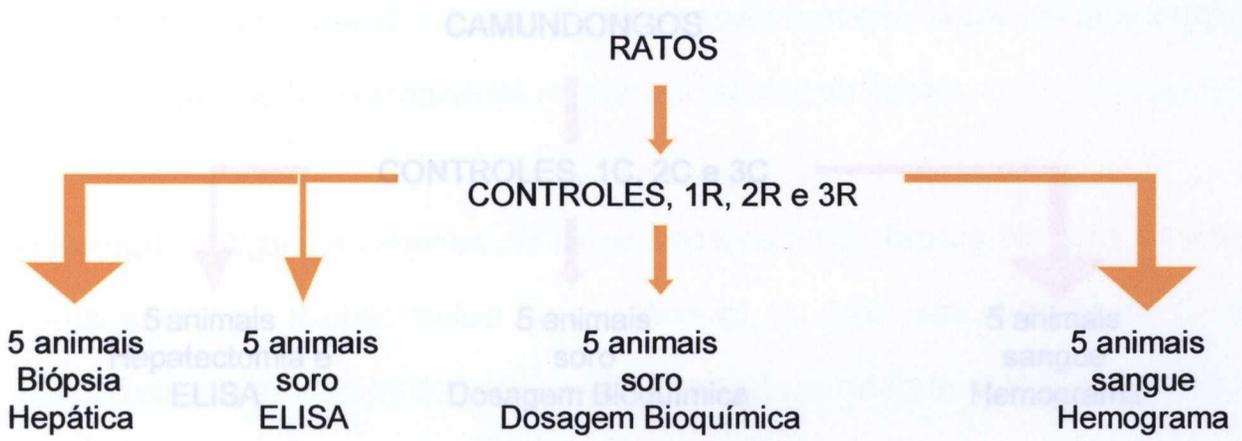


Diagrama 4

Diagrama 2

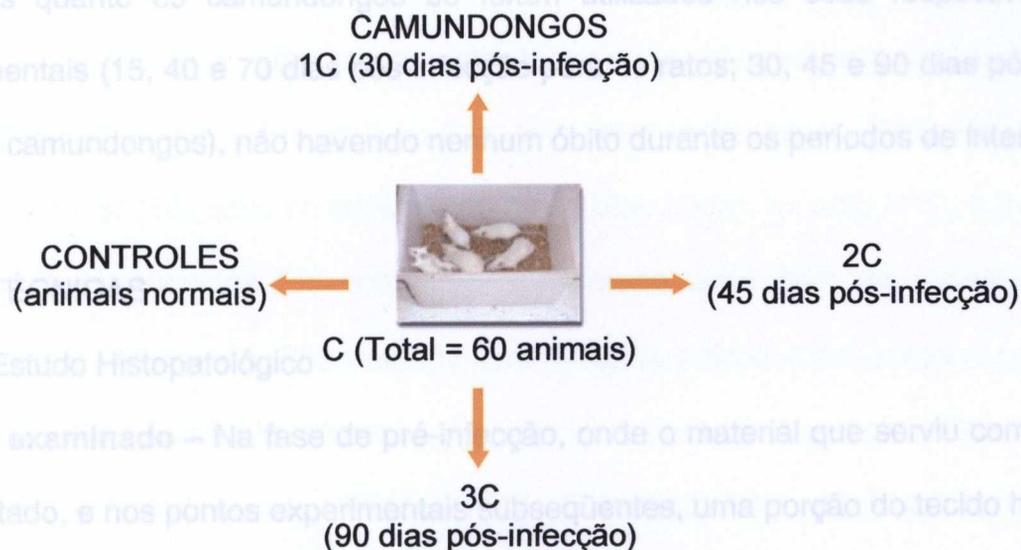


* Os animais foram eutanasiados em todos os procedimentos.
* Os animais foram mantidos vivos durante todo o experimento.

5.3.1 Infecção

Diagrama 3

Os animais foram infectados por entubação gástrica, com o auxílio de uma seringa provida de agulha de ponta romba, sendo o inóculo de aproximadamente 500 ovos embrionados de *C. hepatica* para os ratos e 100 para os camundongos. A partir daí, tanto os ratos quanto os camundongos só foram utilizados nos seus respectivos pontos experimentais (15, 40 e 70 dias pós-infecção para os ratos; 30, 45 e 90 dias pós-infecção para os camundongos), não havendo nenhum óbito durante os períodos de intervalo.



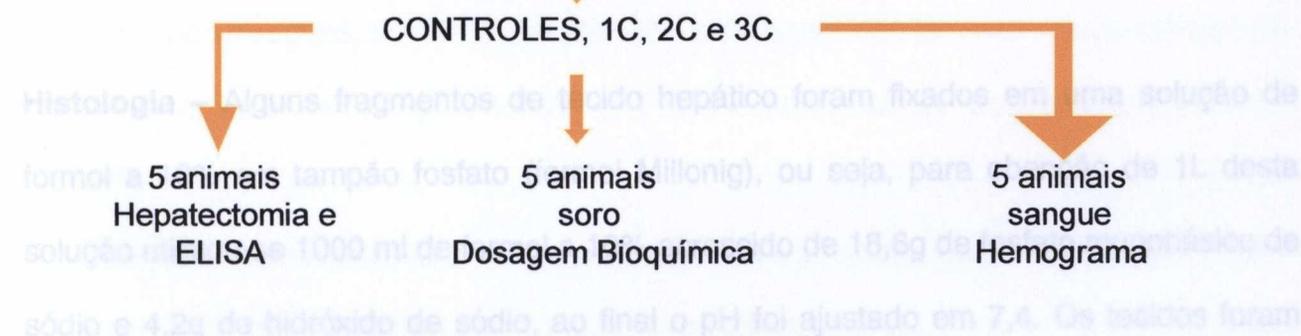
5.4 T

5.4.1 Estudo Histopatológico

Tecido examinado – Na fase de pré-infecção, onde o material que serviu como controle foi coletado, e nos pontos experimentais subsequentes, uma porção do tecido hepático foi obtida por hepatectomia parcial (biópsia cirúrgica), nos ratos. Estes animais foram anestesiados pelo éter, e, em condições de assepsia, foi feita a abertura do abdôme na linha mediana, exposto um dos lobos do fígado, o qual foi laqueado e removido. Em seguida, o ferimento foi fechado por pontos separados. Não houve mortalidade pós-operatória. Entretanto, os camundongos que forneceram tecido hepático foram os mesmos que forneceram material para análise sorológica. Estes animais foram anestesiados com o éter, em condições de assepsia, o abdôme aberto através de uma incisão na

Diagrama 4

linha mediana e foram eutanasiados mediante a retirada do fígado.



* Os animais foram eutanasiados em todos os procedimentos.

5.3.1 Infecção

Os animais foram infectados por entubação gástrica, com o auxílio de uma seringa provida de agulha de ponta romba, sendo o inóculo de aproximadamente 600 ovos embrionados de *C. hepatica* para os ratos e 100 para os camundongos. A partir daí, tanto os ratos quanto os camundongos só foram utilizados nos seus respectivos pontos experimentais (15, 40 e 70 dias pós-infecção para os ratos; 30, 45 e 90 dias pós-infecção para os camundongos), não havendo nenhum óbito durante os períodos de intervalo.

5.4 TÉCNICAS

5.4.1 Estudo Histopatológico

Tecido examinado – Na fase de pré-infecção, onde o material que serviu como controle foi coletado, e nos pontos experimentais subseqüentes, uma porção do tecido hepático foi obtida por hepatectomia parcial (biópsia cirúrgica), nos ratos. Estes animais foram anestesiados pelo éter, e, em condições de assepsia, foi feita a abertura do abdôme na linha mediana, exposto um dos lobos do fígado, o qual foi laqueado e removido. Em seguida o ferimento foi fechado por pontos separados. Não houve mortalidade pós-operatória. Entretanto, os camundongos que forneceram tecido hepático foram os mesmos que forneceram material para análise sorológica. Estes animais foram anestesiados com o éter, em seguida tiveram o abdôme aberto através de uma incisão na linha mediana e foram eutanasiados mediante a retirada do fígado.

Histologia – Alguns fragmentos de tecido hepático foram fixados em uma solução de formol a 10% em tampão fosfato (formol Millonig), ou seja, para obtenção de 1L desta solução utilizou-se 1000 ml de formol a 10% acrescido de 18,6g de fosfato monobásico de sódio e 4,2g de hidróxido de sódio, ao final o pH foi ajustado em 7,4. Os tecidos foram

incluídos rotineiramente em parafina e as secções obtidas foram coradas pela hematoxilina - eosina e pelo método do picro-sirius vermelho para colágeno.

Imuno-fluorescência indireta – Alguns fragmentos de fígado, no exato momento em que foram obtidos por biópsia, foram imediatamente colocados em um meio gelatinoso especial (Tissue-Tek) e instantaneamente congelados em nitrogênio líquido. Os blocos foram conservados tubos Falcon bem tampados, em um freezer a -70°C , até o momento em que foram seccionados no criostato de mesa Slee Mainz, modelo MTC, à temperatura de -13°C . Em seguida, os cortes de aproximadamente $6\mu\text{m}$ de espessura, foram colocados em lâminas de vidro tratadas com polilisina e fixados em acetona desidratada. As lâminas foram hidratadas, durante cinco minutos, por três vezes, em salina tamponada (Phosphate Buffered Saline - PBS) pH 7,4. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado utilizando-se leite em pó desnatado, Molico, diluído a 10% em PBS e incubando-se as lâminas por um período de 15 minutos a 37°C . Logo após, foram submetidas a um tratamento com o anticorpo primário, em diluição apropriada segundo o fabricante, colocado numa quantidade de $50\mu\text{l}$ pra cada corte. As lâminas foram mantidas numa câmara úmida e incubadas por um período de 30 minutos a 37°C . Seguiram-se lavagens com PBS. Depois, os cortes foram cobertos com o anticorpo secundário conjugado com fluoresceína, em diluição de 1:50, e diluído em Azul de Evans a 1:5, colocado numa quantidade de $50\mu\text{l}$ pra cada corte. Os cortes ficaram na estufa a 37°C durante 30 minutos. Após lavagens, com PBS, seguiu-se a montagem das lâminas colocando-se uma gota de tampão carbonato-bicarbonato (pH 8,3) e anexando-se uma lamínula de vidro sobre cada corte.

Os anticorpos primários, todos produzidos em coelhos, foram os seguintes: anti-colágeno tipo I, anti-colágeno tipo III, anti-fibronectina, anti-laminina e anti-actina. Estes anti-soros foram gentilmente cedidos pela Dra. Sylviane Guerret, do Instituto Merrioux,

Lyon, França, com exceção do anti-actina, que foi comercialmente obtido da empresa Sigma. O segundo anticorpo, anti-imunoglobulina G (anti-IgG) de coelho conjugado com fluoresceína (produzido em cabra) foi obtido da empresa Sigma.

As secções foram examinadas em um microscópio Zeiss dotado de luz ultravioleta e filtros apropriados, excitadores e barreira. A aquisição das imagens foi feita através do Programa Soft Ware Axio Vision e subseqüentemente tratada no Microsoft Photo Editor.

5.4.2 Estudo Sorológico

→ Anticorpos séricos anti-*C. hepatica*:

ELISA – Foi avaliado a Imunoglobulina (Ig) total nos soros dos animais na pré-infecção e em cada etapa na qual os animais foram utilizados ou eutanasiados. O sangue, nos ratos, foi colhido da cauda com os animais vivos, e, nos camundongos, do plexo braquial no momento da eutanásia. O material colhido foi imediatamente acondicionado em tubo Eppendorf devidamente identificado. Após a retração do coágulo, o sangue foi centrifugado (BECMAN GS – 6R Centrifuge) a 4000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado, instantaneamente congelado em nitrogênio líquido e conservado em Freezer a -70°C até o momento do uso.

A placa de ELISA foi sensibilizada com antígeno de *C. hepatica* ajustado na concentração de $10\ \mu\text{g/ml}$ e diluído em solução tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). Foi utilizada a quantidade de $50\ \mu\text{l}$ por poço e a placa permaneceu da noite para o dia à temperatura de 4°C . Após uma hora à temperatura ambiente, todos os poços foram lavados duas vezes com $150\ \mu\text{l}$ de PBS. Seguiu-se o bloqueio da placa colocando-se em cada poço $150\ \mu\text{l}$ de uma solução contendo PBS, leite em pó desnatado (Molico) a 5 % e Tween 20 a 0,3%. Após uma hora à temperatura ambiente, os poços foram lavados de 3 a 6 vezes com PBS-Tween para retirada do excesso de tampão de bloqueio. Os soros dos animais, diluídos a 1:1000 em tampão de bloqueio, foram colocados, numa

quantidade de 50µl por poço, nos poços pré-determinados. A placa permaneceu da noite para o dia à temperatura de 4° C. Depois de uma hora em temperatura ambiente, foram feitas de 6 a 8 lavagens com PBS-Tween. Em seguida, 50µl de anticorpo anti-Ig de rato e anti-Ig de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) e diluído em 1:1000 em tampão de bloqueio foram colocados numa quantidade de 50µl por poço. A placa foi incubada por 30 minutos à 37°C. Logo após, os poços foram lavados 8 vezes com PBS-Tween. O momento da leitura foi indicado quando o substrato (TMB e H₂O₂ diluído em 1:1), da KLP Laboratórios, colocado numa quantidade de 50µl por poço, reagiu evidenciando uma coloração azul. A leitura foi feita em espectrofotômetro com 450nm de comprimento de onda, através do Soft Ware SOFT Max 3.0.

→ Perfil Hepático

Dosagens bioquímicas - Foram avaliadas as funções hepáticas através da dosagem de proteínas no soro dos animais na pré-infecção e em cada ponto experimental. Os soros foram obtidos de forma semelhante àquela descrita no item anterior e imediatamente encaminhados ao Setor de Bioquímica do Laboratório Central (LACEN), onde foram processados em dois tipos de Bioanalísadores Enzimáticos automatizados (COBA MIRA Plus - Roche e Hitachi – Boehringer Mannheim). Foram realizadas as dosagens da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, proteína total e albumina.

5.4.3 Estudo Hematológico

Hemograma - Foi realizado o estudo do perfil hematológico no sangue dos animais na pré-infecção e em cada etapa na qual os animais foram utilizados ou eutanasiados. O sangue, colhido de forma semelhante àquela descrita na técnica de ELISA, foi acondicionado em tubos Eppendorfs contendo solução de heparina (35 µl para 1,0 ml de

sangue). Em seguida, o sangue foi encaminhado ao Laboratório de Hematologia do LACEN, onde foi processado em um analisador hematológico por citometria de fluxo (Coulter T – 890). Foram analisados: leucócitos, hemácias, hemoglobina, percentual de hematócrito, volume globular médio das hemácias (VGMH), hemoglobina globular média (HGM), concentração da hemoglobina globular média (CHGM), plaquetas, percentual de linfócitos e linfócitos totais.

Contagem diferencial dos leucócitos – Uma gota do sangue colhido de cada animal foi utilizada para realização de esfregaço sanguíneo em lâminas de vidro previamente desengorduradas. As lâminas foram fixadas com álcool metílico (ISOFAR) e, em seguida, coradas com Giemsa (Polysciences) a 10 %. Depois de preparadas, as lâminas foram lidas em microscopia óptica (NIKON ALPHAPHOT 2) com objetiva de 100X, em imersão. Foram contados os eosinófilos, neutrófilos (segmentados), linfócitos e monócitos.

As análises estatísticas de todos os resultados foram realizadas pelo Soft Ware Graph Pad Prism, através do teste t, por método não paramétrico.

6 RESULTADOS

6.1 HISTOPATOLOGIA

6.1.1 Estudo Histológico

Ratos – Nas fases mais iniciais da infecção, dois tipos de lesões inflamatórias dominam o quadro microscópico hepático. Uma é representada pelas lesões focais, que são vistas em torno de ovos e vermes, imaturos ou adultos, vivos ou mortos (Prancha I - A e C). A outra é representada por uma reação difusa e que se constitui em uma hepatite reacional (Prancha I - B). Um terceiro achado aparece tardiamente, em torno do 40º dia da infecção, representado pela formação de septos fibrosos finos e longos, que tendem a dissecar o parênquima hepático em várias direções, conectando espaços porta e veias centrolobulares entre si, em várias combinações (Prancha I - D). Estes três quadros serão considerados a seguir:

- 1) A reação focal é, na maioria das vezes, centrada por necrose, que pode ser hialina ou purulenta. Os vermes vivos já não são mais encontrados a partir dos 40 dias de infecção. Os vermes mortos exibem desintegração mais ou menos acentuada, com a presença de grumos basófilos difusamente distribuídos, indicativos de calcificação inicial, que se torna cada vez mais acentuada com o passar do tempo. Frequentemente forma-se um rico exsudato em torno destas estruturas, com muitos polimorfonucleares, eosinófilos e neutrófilos, bem como macrófagos e algumas células gigantes multinucleadas. Delimitando as lesões focais nota-se uma proliferação de células fusiformes (Prancha II – A e B), acompanhada de deposição de feixes colágenos, que se coram especificamente pelo picro-sírius (Prancha III - B). Aí também se faz a princípio um rico depósito de fibronectina e de colágeno de tipos I e III, o que também ocorre nos septos fibrosos (Prancha V). Este esboço de cápsula, que já é bem evidente por volta dos 15 dias da infecção,

se acentua progressivamente com o passar do tempo. No final, uma cápsula fibrosa, geralmente espessa, separa nitidamente as lesões parasitárias focais do resto do parênquima. A progressão destas lesões se faz com o desaparecimento gradual do infiltrado inflamatório e dos detritos dos vermes mortos, substituídos pelo acúmulo de material amorfo fortemente basófilo (calcificação). Além da retração cicatricial, o elemento dominante nas lesões focais passa a ser o depósito de numerosos ovos, envolvidos por um denso tecido colágeno. Pouco a pouco a malha de fibronectina vai desaparecendo e o colágeno de tipo III decresce sua concentração e aparece associado com o colágeno de tipo I (Prancha V – A e B).

- 2) O processo de hepatite reacional difusa é de intensidade moderada ou discreta. Além de um infiltrado leucocitário polimorfo, com muitos eosinófilos concentrados nos espaços porta, aparecem muitos leucócitos no interior dos sinusóides ou em focos de necrose de células isoladas no interior do parênquima, bem como mobilização de células sinusoidais. A trama reticular aparece reforçada pela formação, em maior ou menor grau, de um processo de fibrose peri-sinusoidal, o qual, no segundo ponto experimental, já está quase desaparecido. A técnica da imunofluorescência permite revelar esta modificação da matriz intraparenquimatosa, especialmente pelo comportamento das glicoproteínas associadas ao colágeno, fibronectina e laminina, e pela marcação da actina (Prancha IV). Este último miofilamento marca as paredes dos vasos e algumas células da matriz (miofibroblastos).
- 3) O processo de fibrose septal parece se iniciar um pouco tardiamente em relação às lesões parasitárias focais. Não aparece nas secções examinadas aos 15 dias da infecção, mas se apresenta bem evidente aos 40 dias. A princípio ele contém um fino infiltrado celular discreto e linear, onde podem ser identificadas células de núcleo fusiforme (fibroblastos), bem como leucócitos polimorfonucleares

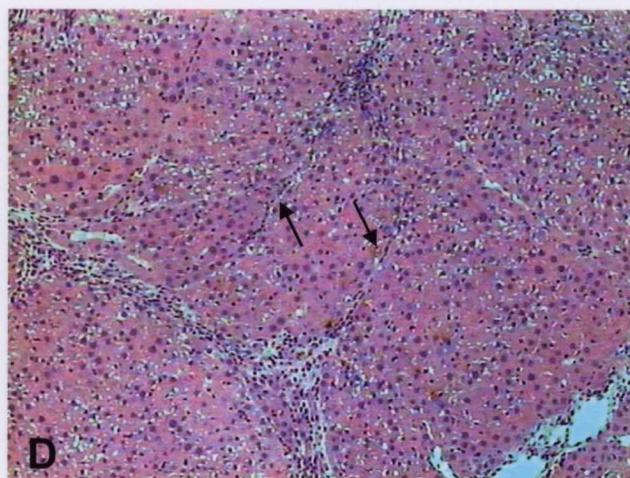
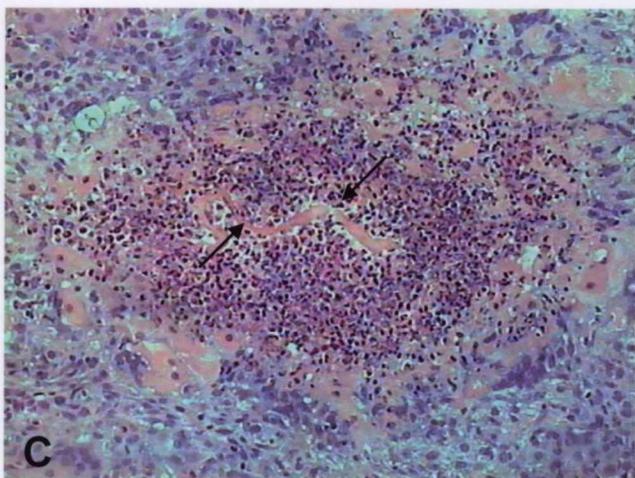
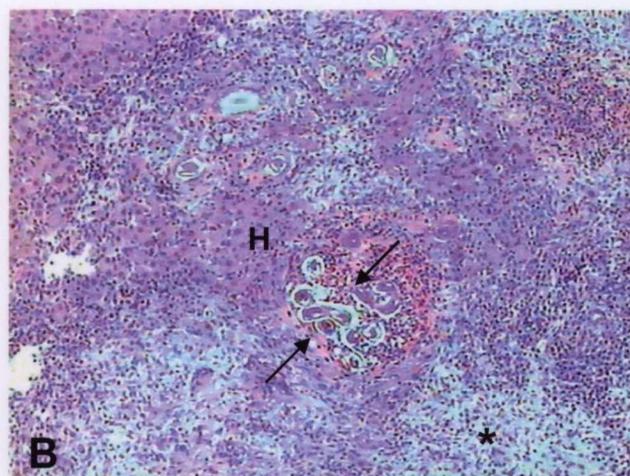
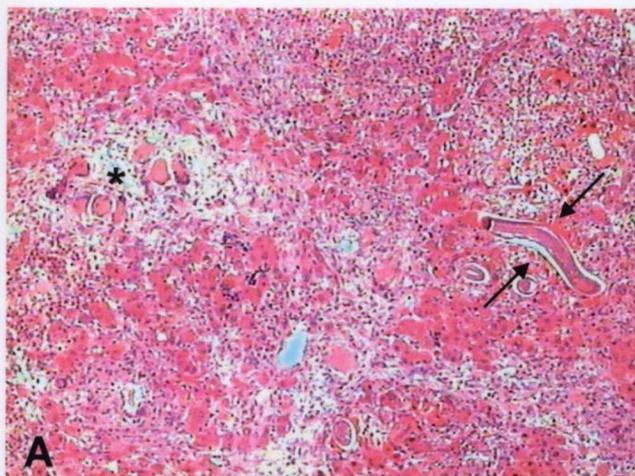
eosinófilos, macrófagos e linfócitos (Prancha II – C e D). O colágeno, a princípio escasso, aparece mais tarde bem definido, formando uma linha situada ao longo da zona acinar III e fazendo conexão entre espaços porta, entre veias centrais e entre espaços porta e veias centrais. Quando plenamente desenvolvida, esta fibrose septal delimita porções do parênquima hepático de aspecto nodular, configurando um quadro de cirrose (Prancha III). As modificações dos elementos da matriz, observadas com a técnica da imunofluorescência, são qualitativa e quantitativamente semelhantes ao que foi descrito para a matriz intraparenquimatosa.

Camundongos – Os achados histopatológicos iniciais são dominados por uma hepatite aguda reacional intensa, com várias lesões em torno de vermes adultos e/ou imaturos, alguns íntegros e outros em desintegração. Muitos ovos também já estavam presentes nesta fase. Ocorre então um denso e difuso infiltrado inflamatório com presença de muitos neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e alguns linfócitos ao lado de áreas de necrose dos hepatócitos e de variados graus de alterações regressivas dos mesmos (Prancha VI – A, B e C). A evolução deste quadro sofre uma profunda modulação já observada aos 45 dias pós-infecção e que se acentua e se completa daí em diante. O infiltrado inflamatório, as lesões degenerativas hepatocitárias e a fina fibrose intersticial das fases iniciais são reabsorvidas com relativa rapidez. Não há formação de fibrose septal, em nítido contraste com o que acontece no rato, mas aparece uma fibrose difusa peri-sinusoidal (Prancha VI – D). As lesões nos focos parasitários ficam isoladas, encapsuladas. Estas lesões focais são comparáveis às que ocorrem no rato, mas evoluem mais rapidamente, com a degradação e reabsorção dos detritos parasitários e mesmo da fibrose (Prancha VII). Esta última, no final do período de observação, aos 90 dias pós-infecção, tende a desaparecer não só na cápsula externa, como no interior da lesão, entre as coleções de ovos. Aos 90

dias de infecção, o fígado volta a apresentar uma estrutura bem conservada, com hepatócitos de aparência normal, muito embora ainda persistam vermes vivos e ovos bem preservados nas lesões parasitárias focais (Prancha VIII).

Esta modulação das lesões parasitárias se reflete no comportamento dos elementos da matriz extracelular. A mais evidente modificação evolutiva pode ser observada nas preparações para a evidenciação de fibronectina. Esta glicoproteína estrutural aparece abundante em torno das lesões parasitárias focais, ampliando consideravelmente a zona da cápsula fibrosa, nas fases mais precoces da infecção, bem como nas áreas de fibrose intra-parenquimal. Com o passar do tempo de infecção, sua concentração nos tecidos diminui, praticamente se limitando às áreas com depósitos de ovos (Prancha X). Até mesmo a laminina, que nos tecidos normais fica praticamente limitada às membranas basais dos vasos e ductos biliares (Prancha IX – A), vem a exibir depósitos em outras localizações, durante os diversos períodos da infecção parasitária. Assim, pode aparecer um fino depósito de aparência granular, ao longo dos sinusóides hepáticos, nas fases mais iniciais da infecção, como pode ser observado aos 30 dias pós-infecção (Prancha IX – B). Mais tarde, alguns depósitos lineares de laminina são vistos em zonas de fibrose, delimitando as lesões em torno dos ovos (Prancha IX – C), Quanto a evidenciação dos dois tipos genéticos principais do colágeno, tipos I e III, eles aparecem associados nas áreas de fibrose desde os períodos mais iniciais, até o tempo final da observação experimental, não tendo sido possível, através da técnica de imunofluorescência, dizer qual o predominante nas várias fases (Prancha XI).

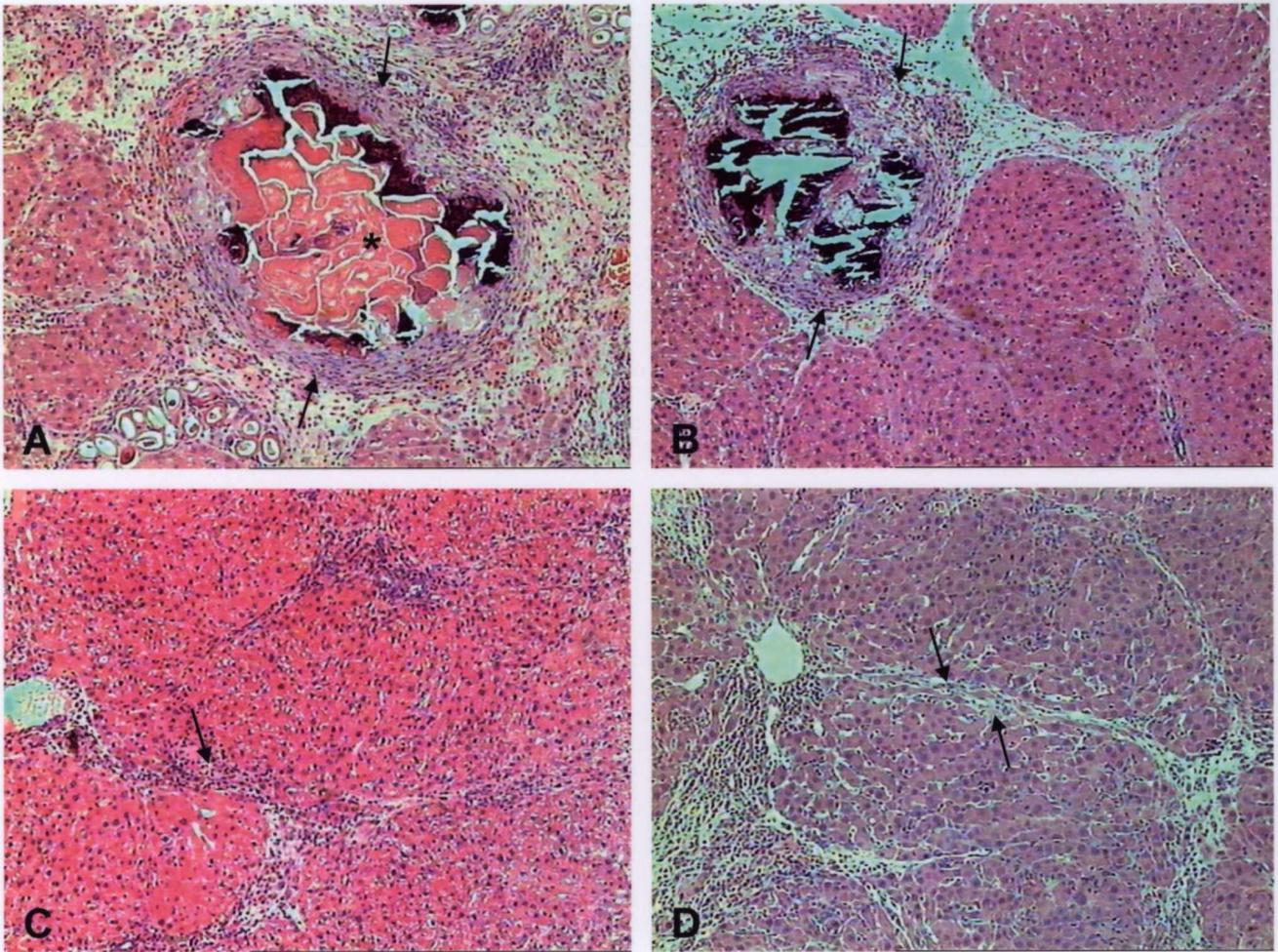
Prancha I



I – Alterações hepáticas observadas nas fases iniciais da infecção por *Capillaria hepatica* no rato. A – Presença de vermes imaturos, um deles ainda bem conservado (setas) no interior do parênquima hepático, ao lado de focos de necrose (asterisco) e de uma difusa infiltração leucocitária mononuclear (hepatite reacional); B – Aspecto semelhante, onde se notam hepatócitos bem conservados (H), áreas de necrose (asterisco), hepatite reacional, mas com a necrose em torno de vermes imaturos em desintegração já mostrando uma infiltração leucocitária, configurando o início da necrose purulenta (setas); C – Área de necrose purulenta bem evidente em torno do verme imaturo morto, que aparece sem estrutura interna e com coloração uniformemente eosinófila (setas); D – Primeiros indícios observados de desenvolvimento de fibrose septal, aqui vistos como infiltrados leucocitários lineares, como que dissecando o parênquima hepático.

Hematoxilina & Eosina. 100X, exceto C = 200X.

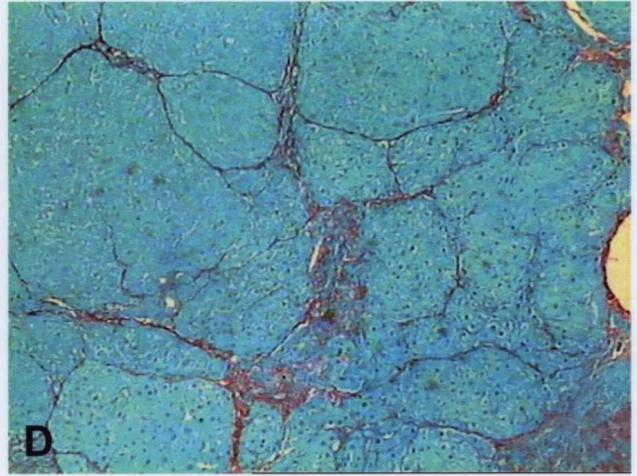
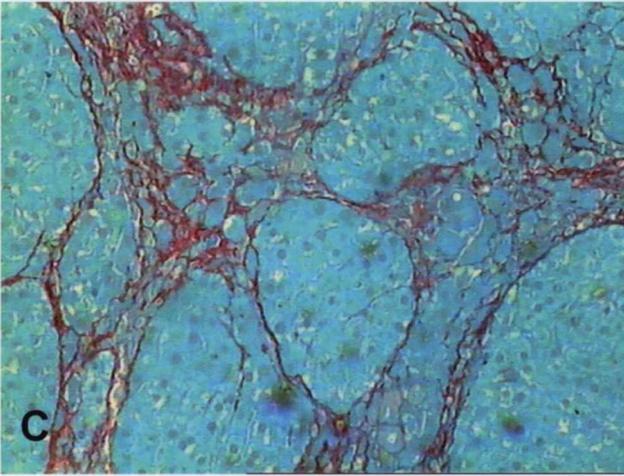
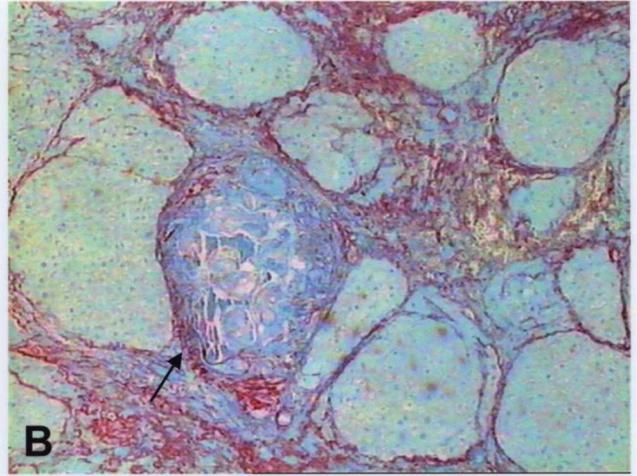
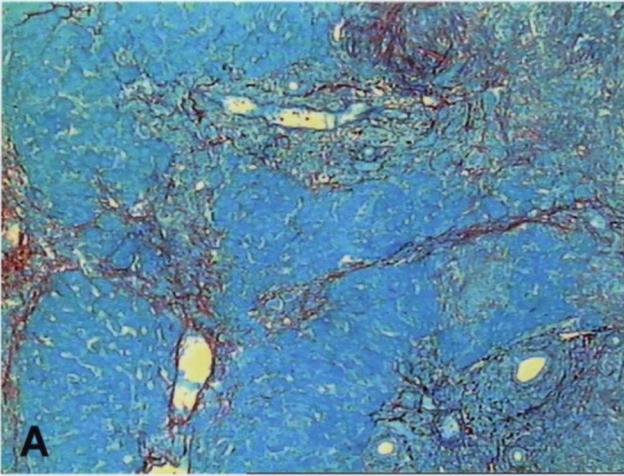
Prancha II



II – Alterações hepáticas observadas no fígado de rato em fases mais avançadas da infecção por *Capillaria hepatica*. A – Os restos dos vermes mortos aparecem como fragmentos eosinófilos, homogêneos (asterisco), exibindo zonas periféricas com depósito de material amorfo ou granular, fortemente basófilo (calcificação), dentro de uma área delimitada por uma espessa cápsula fibrosa (setas). Vêm-se ainda o parênquima hepático septado e um depósito de ovos na zona inferior direita da foto; B – Uma fase mais avançada do que a mostrada na foto anterior, quando os detritos dos vermes foram quase totalmente reabsorvidos e a calcificação aparece mais evidente, com cápsula bem definida (setas). O parênquima aparece septado e nodular; C – Os infiltrados leucocitários lineares, delimitando septos (seta), logo se tornam bem mais evidentes como ilustrado em D (setas), onde as células de núcleos fusiformes são proeminentes.

Hematoxilina & Eosina. 100X.

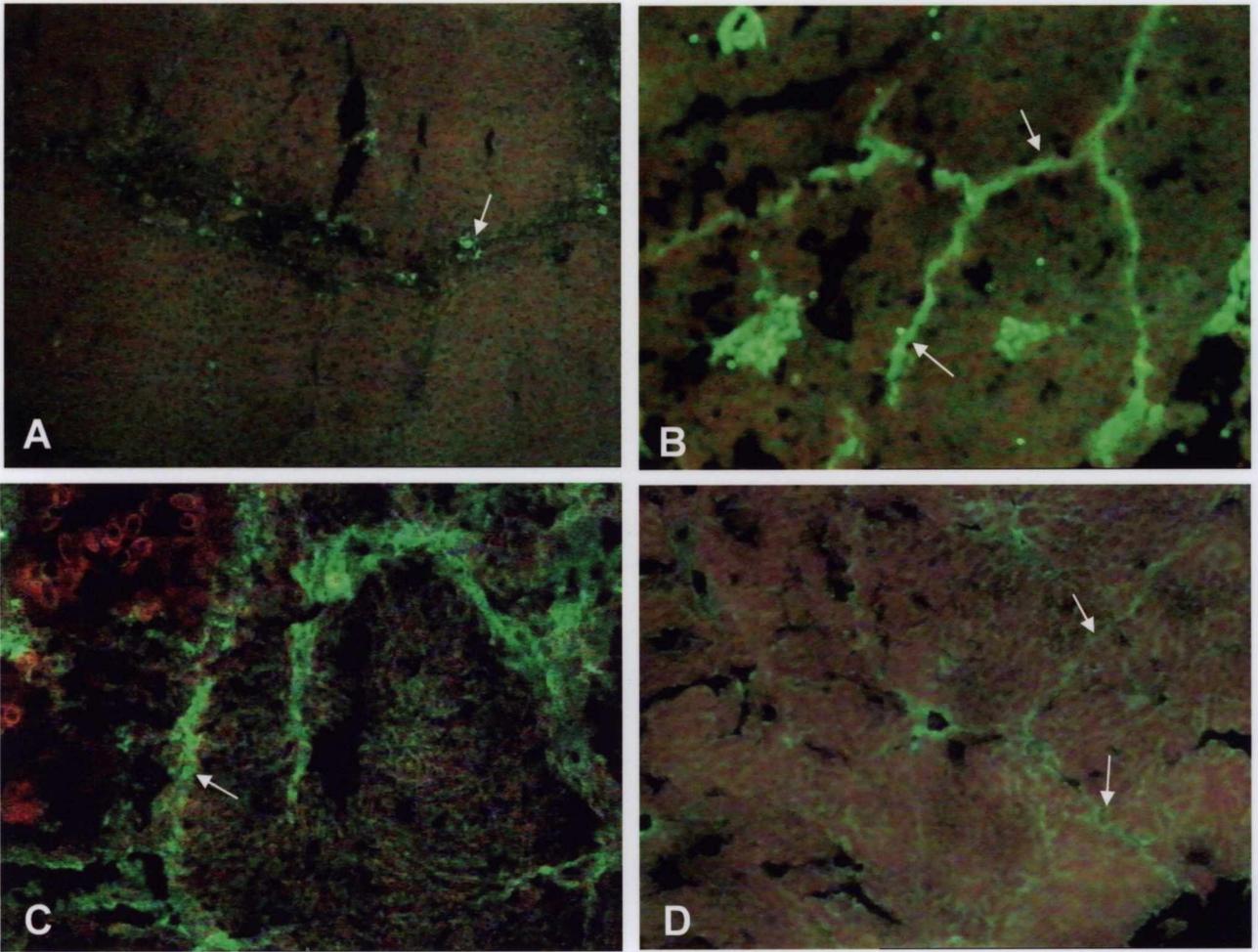
Prancha III



III – Alterações da matriz colágena do fígado de rato durante a infecção por *Capillaria hepatica*. A – Fibras colágenas aparecem nos espaços porta e em torno das lesões parasitárias focais, bem como nos longos e finos septos fibrosos; B – Vê-se um aspecto cirrótico do parênquima hepático, com nódulos hepatocitários bem delimitados, separados por tecido fibroso. Um dos nódulos (seta) representa um foco de degradação parasitária; C – O tecido fibroso separa porções de tecido hepático de tamanhos e formas variados, às vezes, isolando células individuais ou em pequenos grupos; D – Septação fibrosa fina, com áreas do parênquima hepático mostrando grande variação de tamanho.

Método do picro-sírius vermelho para colágeno. A e D = 100 X; B e C = 200 X.

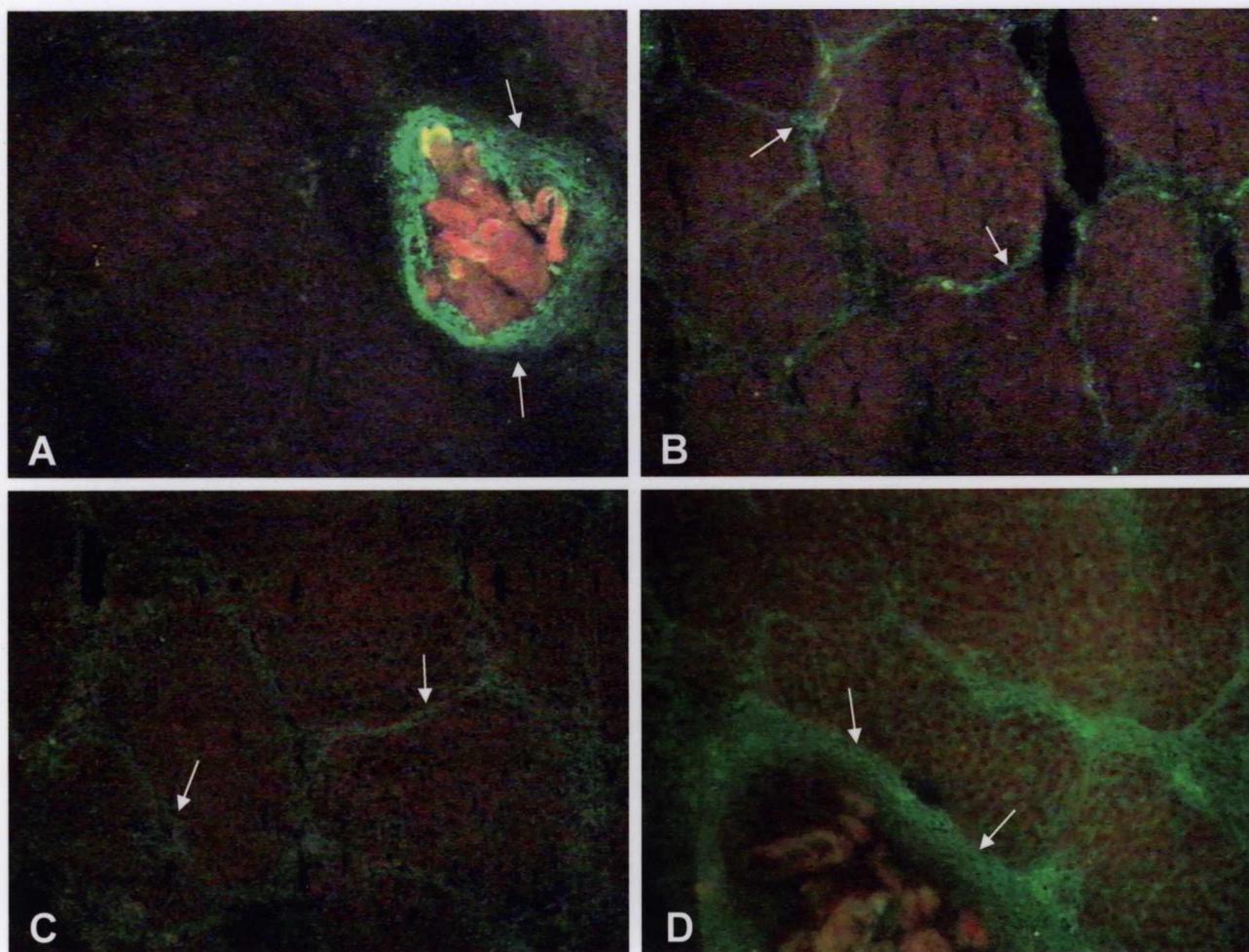
Prancha IV



IV – Comportamento de algumas glicoproteínas estruturais no fígado de rato infectado por *Capillaria hepatica*. A – Fluorescência positiva para actina, vista nas paredes de pequenos vasos sanguíneos e em algumas células isoladas, provavelmente miofibroblastos, ao longo de um septo fibroso, aos 70 dias da infecção (seta); B – A fluorescência para laminina aparece bem evidente ao longo dos septos fibrosos (setas) aos 40 dias de infecção; C – Fortes depósitos de fibronectina nos septos fibrosos (seta) que se formam aos 40 dias da infecção; D – Aos 70 dias da infecção a fluorescência específica para fibronectina aparece fracamente nos septos (setas), fazendo contraste com o observado nas fases mais precoces da infecção, como representado em C.

Método da Imunofluorescência Indireta. 100X.

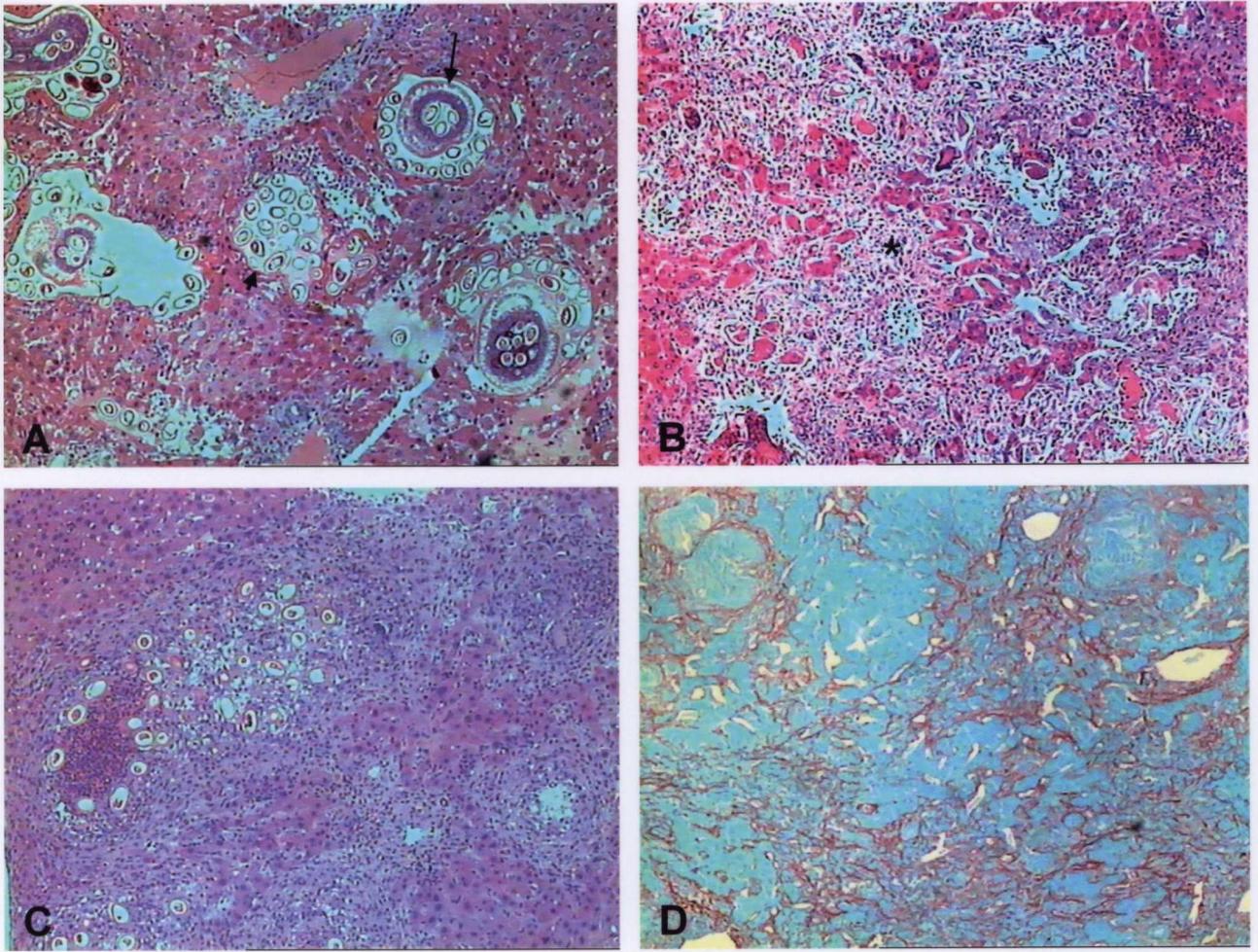
Prancha V



V – Comportamento dos principais tipos genéticos de colágeno no fígado de rato infectado por *Capillaria hepatica*. A – O colágeno tipo I aparece bem evidente na cápsula fibrosa que se forma em torno dos parasitas mortos (setas), mas é apenas esboçado nos septos fibrosos que se formam aos 40 dias da infecção; B – Colágeno de tipo I aparece evidente nos septos fibrosos aos 70 dias da infecção (setas); C – Os septos fibrosos vistos aos 40 dias da infecção já mostram fluorescência verde-maçã para o colágeno de tipo III (setas); D – Aos 70 dias esta positividade se acentua nos septos, bem como na cápsula em torno das lesões focais parasitárias (setas).

Método da Imunofluorescência Indireta. 200X.

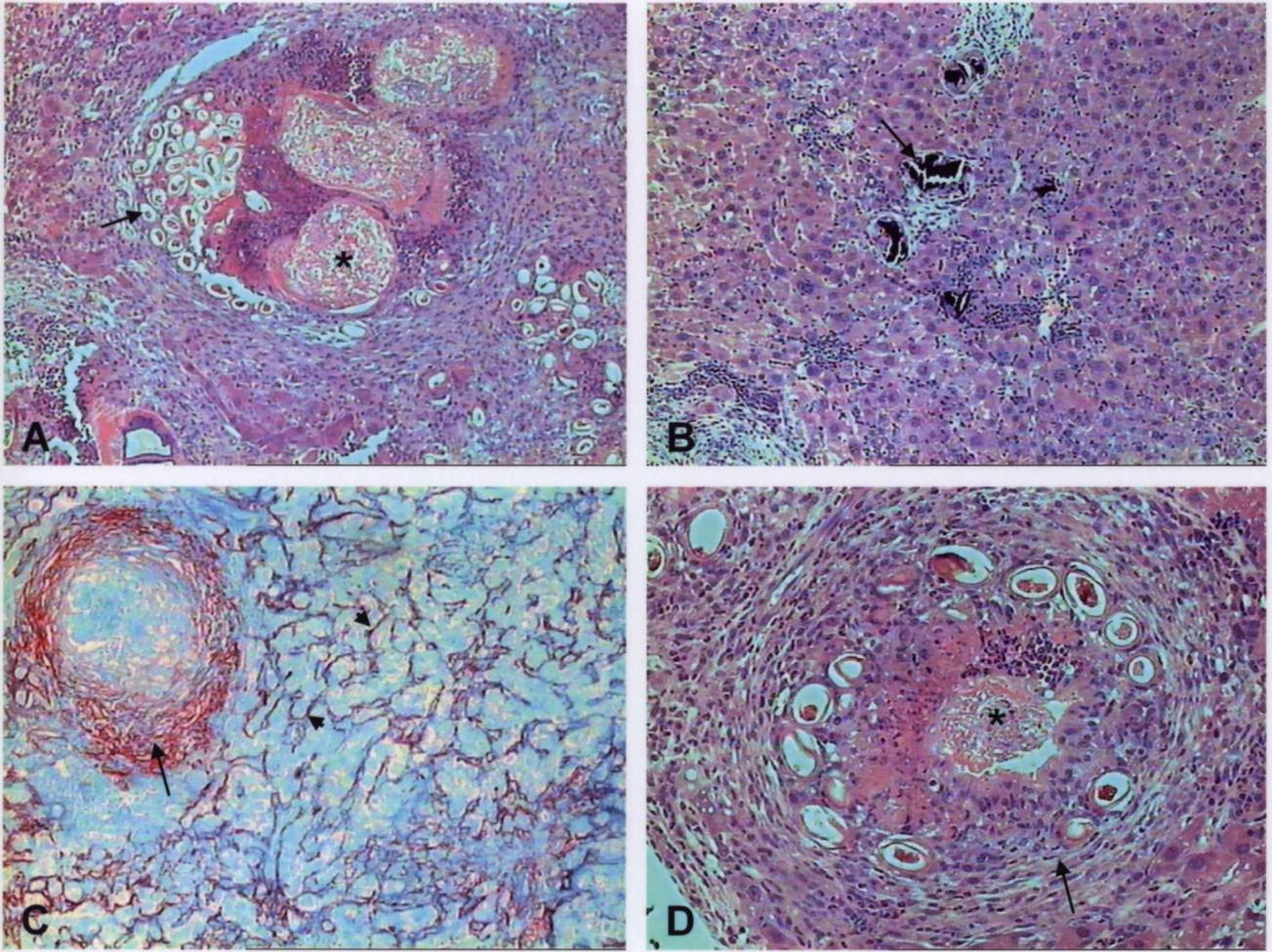
Prancha VI



VI - Alterações hepáticas observadas nas fases iniciais da infecção por *Capillaria hepatica* no camundongo. A – Presença de muitos exemplares adultos da *Capillaria hepatica* (seta) e seus ovos (cabeça de seta) no interior do fígado, com reação ainda muito inicial; B – A situação vista em A é logo seguida por uma forte reação necrótico-inflamatória (asterisco), coincidente com a destruição dos vermes, como aqui ilustrado; C – Foco de necrose circundado por um depósito de ovos e com a presença de hepatite reacional difusa; D – O depósito de colágeno se faz em torno dos focos parasitários, mas é bem mais proeminente em zonas peri-sinusoidais, formando uma rede de malhas irregulares.

Hemastoxilina & Eosina, exceto para D = método do pícro-sírius para colágeno. 100 X.

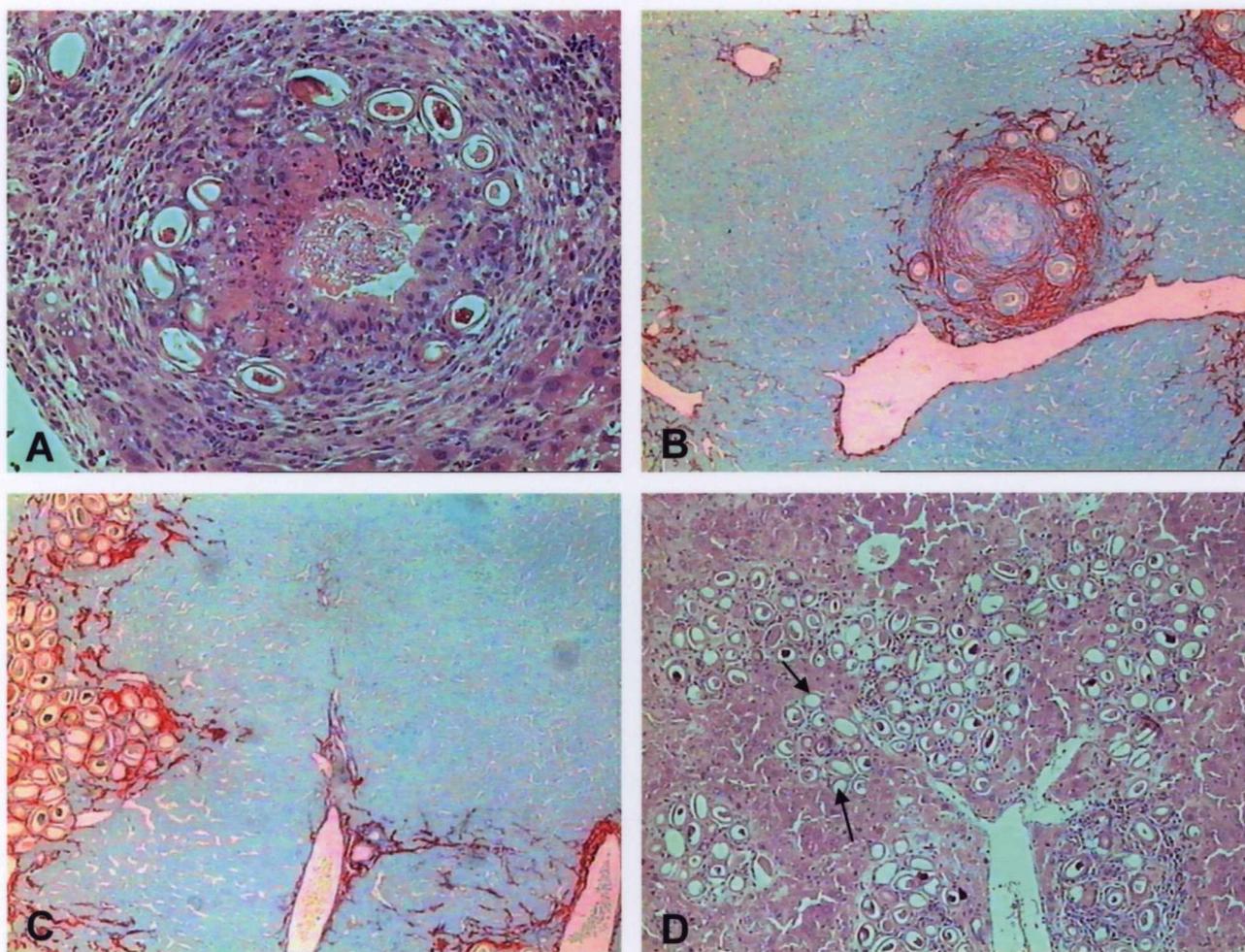
Prancha VII



VII - Alterações hepáticas observadas no fígado de camundongo em fase intermediária da infecção por *Capillaria hepatica*. A – Lesão encapsulada, com três focos nodulares delimitando detritos parasitários (asterisco), circundados por área de necrose e depósitos de ovos (seta); B – O parênquima hepático se apresenta bem conservado, apenas com pequenos acúmulos focais esparsos de leucócitos e alguns focos de calcificação (seta), um quadro consistente com uma profunda modulação das lesões necrótico-inflamatórias iniciais; C – Fibrose de tipo peri-sinusoidal, formando uma rede no parênquima (cabeças de seta). Em destaque (seta) uma lesão parasitária delimitada por espessa cápsula fibrosa e cujo conteúdo já se encontra em fase avançada de reabsorção; D – Aspecto bem representativo da lesão parasitária focal: área central com restos de vermes (asterisco), zona de necrose hialina e purulenta nas proximidades de infiltração macrofágica, depósito de ovos e cápsula fibrosa, celulosa e espessa (seta).

Hematoxilina & Eosina. 100 X, exceto D = 200 X. C = Pícro-sírius para colágeno. 100 X.

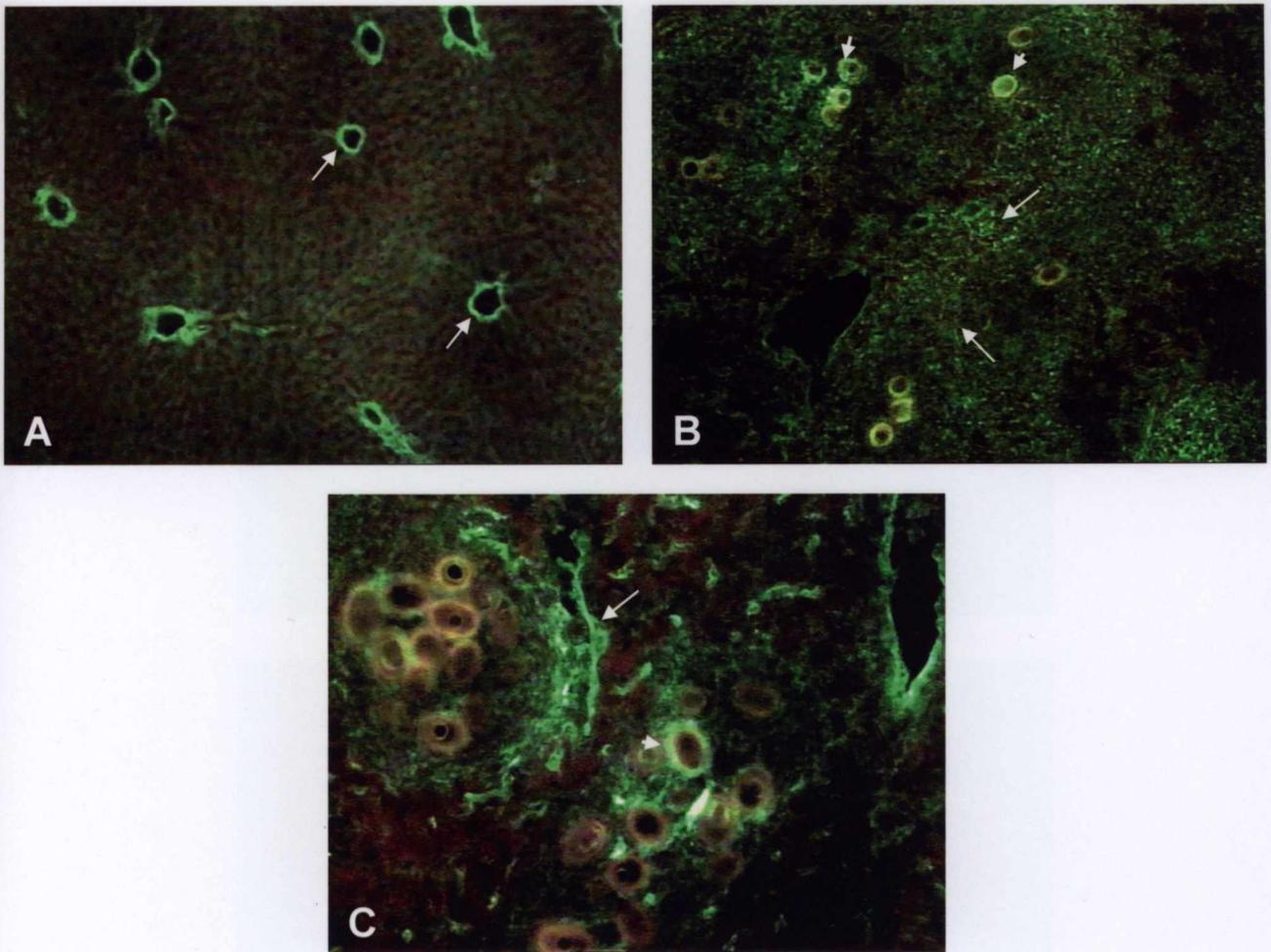
Prancha VIII



VIII – Fases tardias das alterações hepáticas no camundongo infectado por *Capillaria hepatica*. A – Lesões cicatriciais em torno dos restos de vermes e de ovos; B e C – Colágeno aparece apenas em torno das lesões parasitárias focais, mostrando o parênquima hepático “limpo”, com estrutura trabecular bem conservada; D – Grande depósito de ovos da *C. hepatica*, com escassa fibrose em torno, alguns ovos mostrando-se em contato direto com os hepatócitos (setas).

A e D – Hematoxilina & Eosina; B e C = Picro-sírius para colágeno. 100 X.

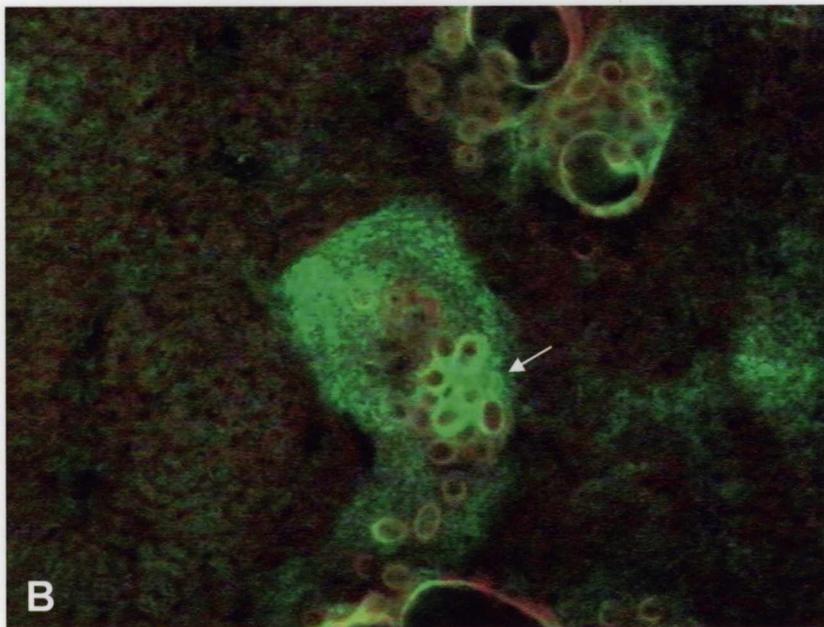
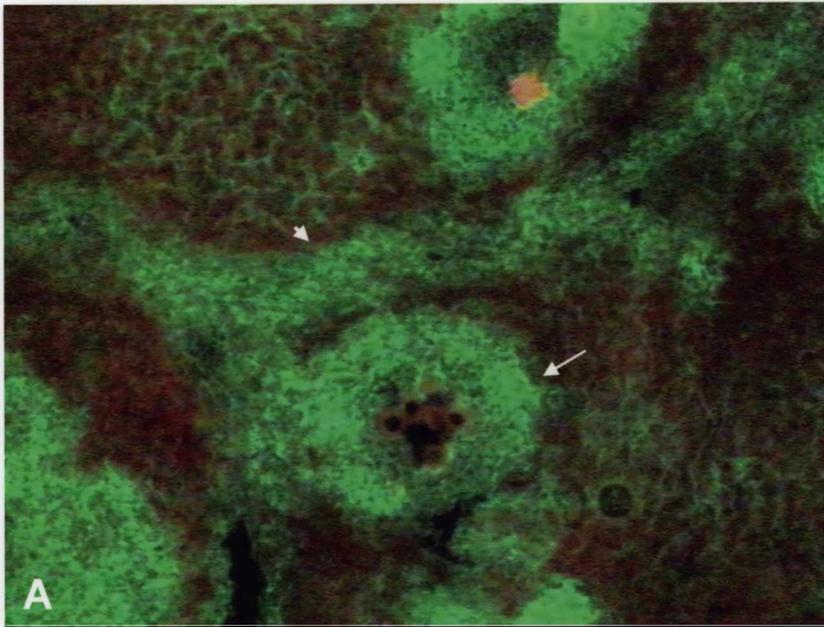
Prancha IX



IX - Comportamento da laminina no fígado de camundongo infectado por *Capillaria hepatica*. A – Fígado normal do camundongo mostrando a fluorescência para laminina limitada às membranas basais dos vasos sanguíneos e ductos biliares (setas); B – Nas lesões vistas aos 30 dias da infecção os depósitos de laminina associados ao colágeno são escassos (setas). Os ovos do parasita mostram auto-fluorescência da casca (cabeças de seta); C – Aos 45 dias da infecção há nítidos depósitos de laminina em torno das lesões parasitárias (seta) e em alguns focos no parênquima. A auto-fluorescência da casca do ovo é evidente (cabeça de seta).

Método da Imunofluorescência Indireta. 100 X.

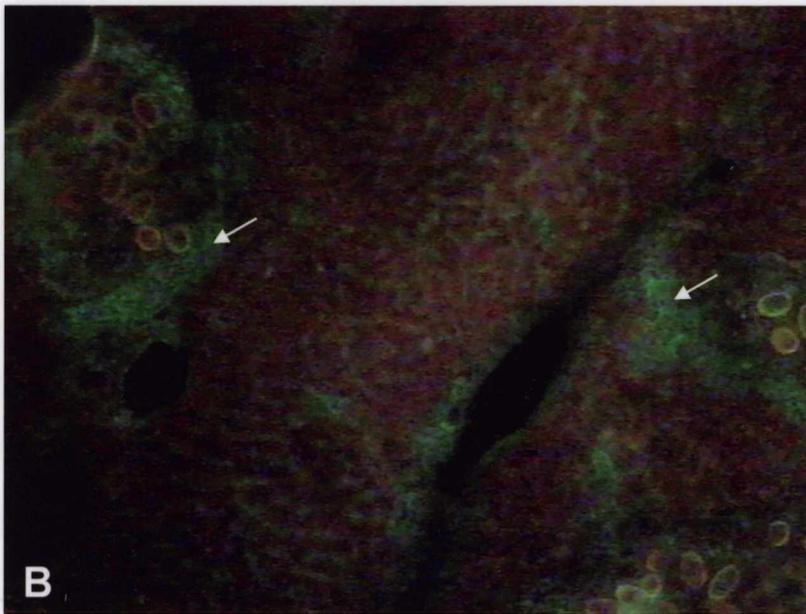
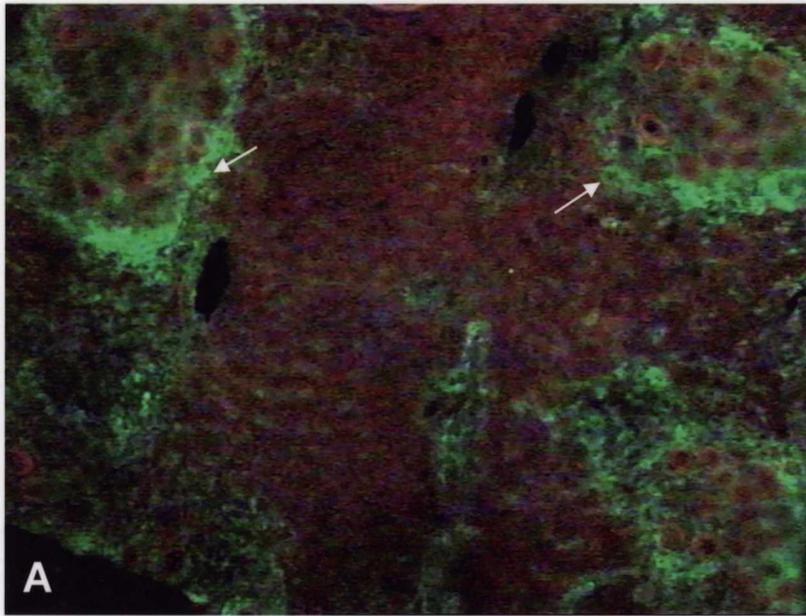
Prancha X



X - Comportamento da fibronectina no fígado de camundongo infectado por *Capillaria hepatica*. A – Aos 30 dias da infecção a fluorescência específica para fibronectina aparece bem evidente em áreas do parênquima (cabeça de seta) e na cápsula que se forma em torno das lesões parasitárias (seta); B – Os depósitos aos 45 dias da infecção se limitam às lesões parasitárias. Os ovos exibem auto-fluorescência amarelada (seta).

Método da Imunofluorescência Indireta. 100X.

Prancha XI



XI - Comportamento dos principais tipos genéticos de colágeno no fígado de camundongo infectado por *Capillaria hepatica*. A – Presença de colágeno tipo I aos 45 dias da infecção: em torno das lesões parasitárias e no interior do parênquima (setas), provavelmente em localização peri-sinusoidal. B – Idem, para o colágeno de tipo III (setas), também aos 45 dias da infecção.

Método da Imunofluorescência indireta. 100 X.

6.2 SOROLOGIA

6.2.1 Anticorpos séricos anti-*C. hepatica*

A cinética dos anticorpos séricos anti-*C. hepatica* é avaliada e analisada durante a evolução da infecção, a partir da titulação da Ig total em cada ponto experimental pré-estabelecido. Nos ratos, a concentração destes anticorpos aumenta bastante com a evolução do quadro patológico, alcançando seu maior pico na fase crônica, aos 70 dias pós-infecção (Figura 1). Já nos camundongos, a cinética destas imunoglobulinas mostra-se contrária, apresentando seu maior nível na fase aguda, aos 30 dias, e diminuindo gradativamente, até que, aos 90 dias pós-infecção, os níveis estão próximos da normalidade (Figura 2).

6.2.2 Perfil Hepático

A evolução da infecção está associada ao perfil hepático dos animais a partir da análise das dosagens bioquímicas das seguintes proteínas: Aspartato amino-transferase (AST), Alanina amino-transferase (ALT), Fosfatase Alcalina, Proteína Total e Albumina.

A AST, nos ratos, apresenta concentração máxima no início da infecção e vai se normalizando gradativamente até o último ponto experimental de observação, entretanto o valor de P demonstra que a diferença é estatisticamente significativa em todos os pontos experimentais (Figura 3). Já nos camundongos, esta enzima mostra seus mais elevados níveis de concentração aos 45 dias pós-infecção, único ponto em que a diferença, em relação aos animais normais, é estatisticamente significativa (Figura 4). Nos ratos, a ALT comporta-se de forma parecida a AST (Figura 5). Todavia, nos camundongos o seu aumento é significativo do meio ao fim do período experimental, como pode ser demonstrado aos 45 e 90 dias pós-infecção (Figura 6).

Figura 1: Cinética da Imunoglobulina Total anti-*C. hepatica* nos ratos. Os níveis de anticorpos séricos anti-*C.hepatica* aumentam significativamente com a evolução do quadro patológico. $P < 0.05$.

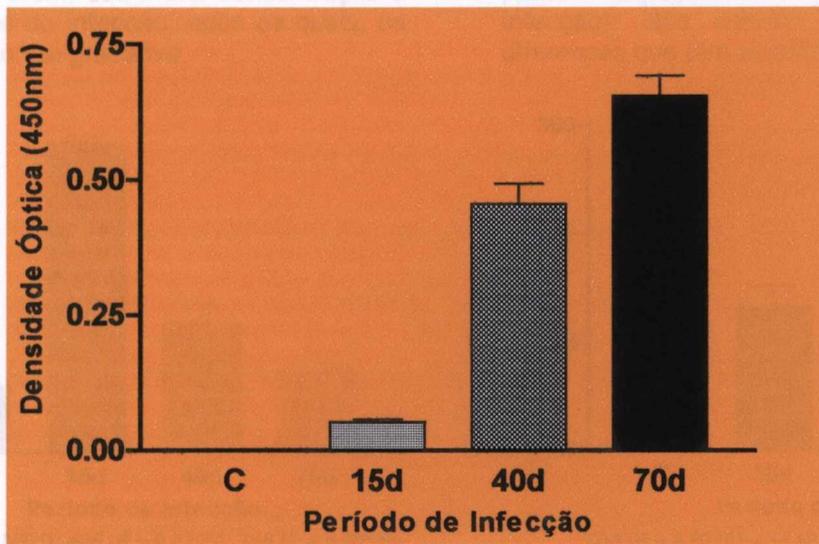


Figura 2: Cinética da Imunoglobulina Total anti-*C. hepatica* nos camundongos. A concentração de anticorpos séricos anti-*C.hepatica* é mais intensa no início da infecção (30 dias), depois, vai diminuindo de forma gradual, até que, aos 90 dias, apesar de apresentar uma diferença significativa estatisticamente, já encontra-se próximo à normalidade. $P < 0.05$.

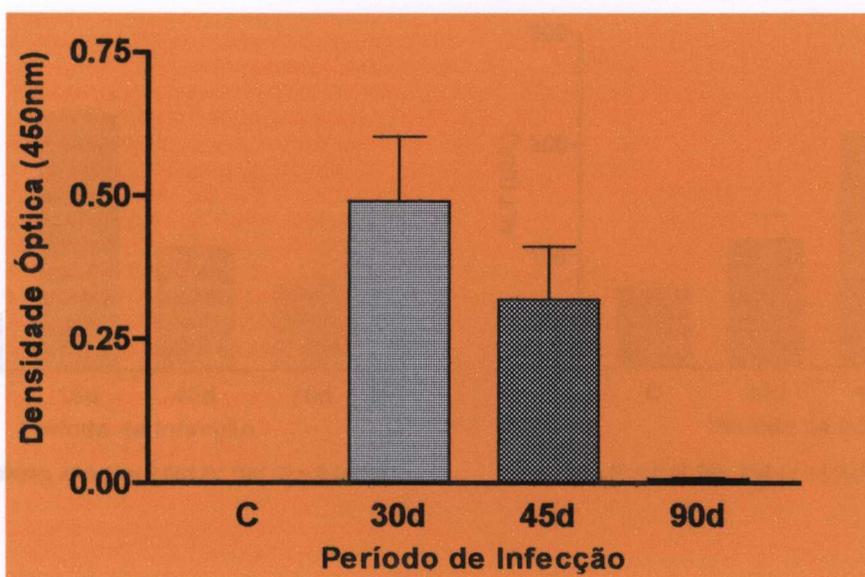


Figura 3: Dosagem da AST nos ratos. Os níveis da AST mostram-se elevados de forma estatisticamente significativa nos três pontos experimentais. Porém, sua maior concentração é vista aos 15 dias de infecção, após os quais, os níveis caem de forma gradativa.

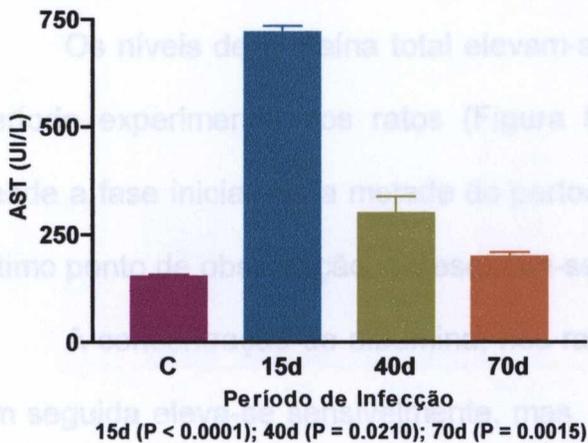


Figura 4: Dosagem da AST nos camundongos. Os níveis da AST mostram-se elevados de forma estatisticamente significativa apenas no segundo ponto experimental (aos 45 dias de infecção). Nos demais momentos observa-se diferenças que têm significado estatístico.

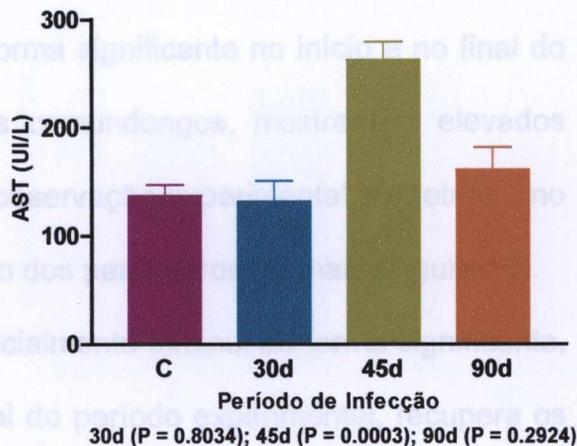


Figura 5: Dosagem da ALT nos ratos. Os níveis da ALT mostram-se significativamente elevados nos três pontos experimentais (15, 40 e 70 dias). Porém, sua maior concentração é observada aos 15 dias de infecção.

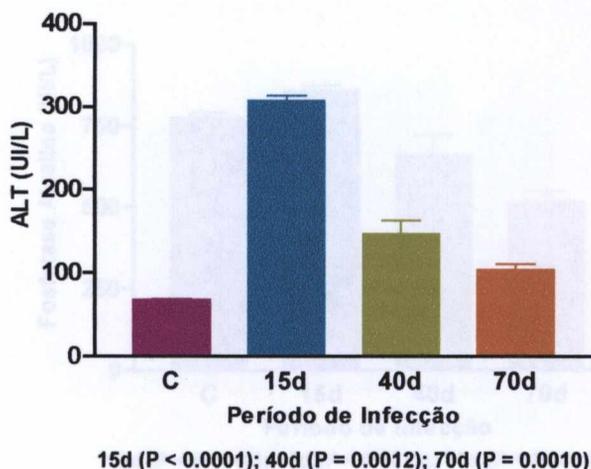
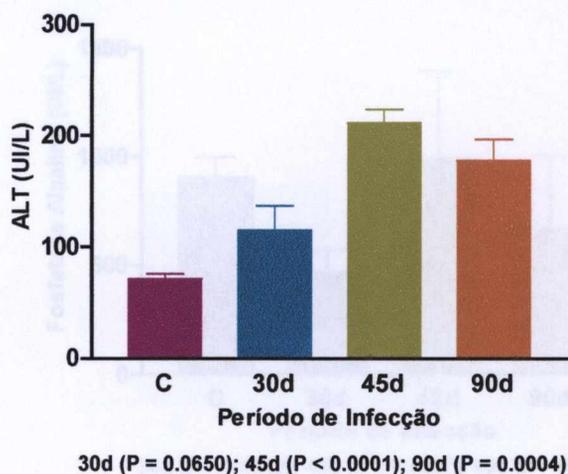


Figura 6: Dosagem da ALT nos camundongos. Os níveis da ALT tornam-se elevados com a evolução da infecção, mostrando-se significativamente elevados aos 45 e 90 dias pós-infecção.



A fosfatase alcalina, nos ratos, apresenta níveis elevados no início da infecção. Porém, na fase crônica diminui de forma significativa (Figura 7). Nos camundongos, a concentração desta enzima cai significativamente na fase inicial, mas, aos 45 dias pós-infecção, já se apresenta dentro dos parâmetros da normalidade (Figura 8).

Os níveis de proteína total elevam-se de forma significante no início e no final do período experimental dos ratos (Figura 9). Nos camundongos, mostram-se elevados desde a fase inicial até a metade do período de observação experimental, entretanto, no último ponto de observação, apresentam-se dentro dos parâmetros normais (Figura 10).

A concentração de albumina, nos ratos, inicialmente diminui de forma significante, em seguida eleva-se sensivelmente, mas, ao final do período experimental, recupera os valores normais (Figura 11). Nos camundongos, esta proteína mostra níveis aumentados aos 45 dias pós-infecção e normais nos demais períodos de experimentação (Figura 12).

Figura 7: Dosagem da fosfatase alcalina nos ratos. Os níveis da fosfatase alcalina elevam-se significativamente aos 15 dias pós-infecção. Após este período, os níveis caem gradualmente, até que, aos 70 dias pós-infecção, esta redução apresenta significado estatístico.

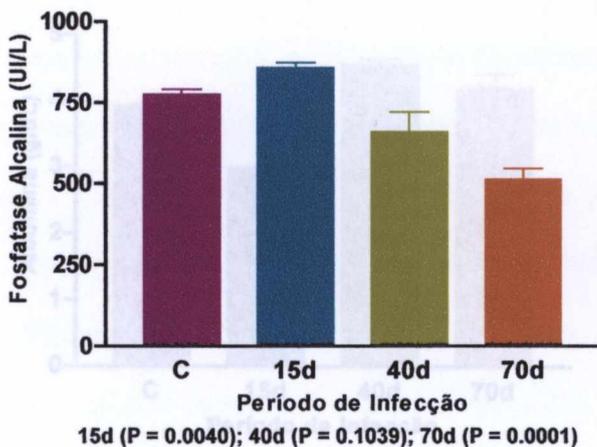


Figura 8: Dosagem da fosfatase alcalina nos camundongos. A concentração da fosfatase alcalina diminui significativamente aos 30 dias pós-infecção. Nos demais pontos experimentais, os níveis apresentam diferenças não significantes estatisticamente.

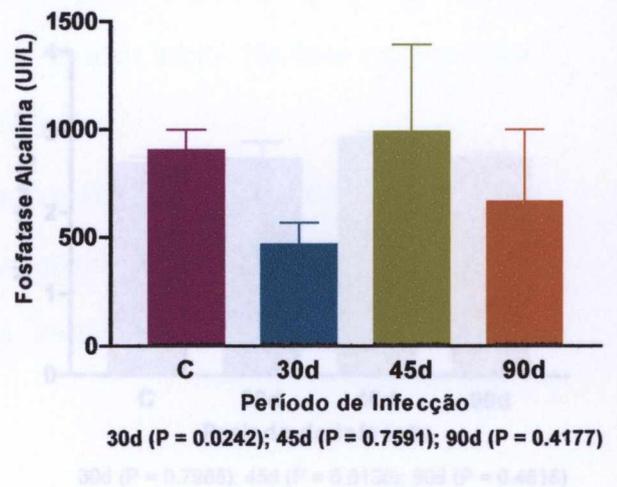


Figura 9: Dosagem da proteína total nos ratos. A concentração da proteína total é significativamente elevada aos 15 e aos 70 dias pós-infecção, entretanto, aos 40 dias mostra-se dentro dos parâmetros normais.

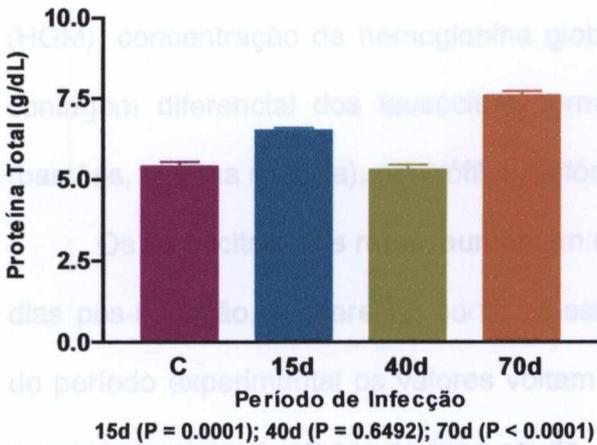


Figura 10: Dosagem da proteína total nos camundongos. Aos 30 e 45 dias pós-infecção a proteína total apresenta-se elevada de forma estatisticamente significativa. Na fase crônica da infecção (90 dias), os níveis são considerados compatíveis com os valores normais.

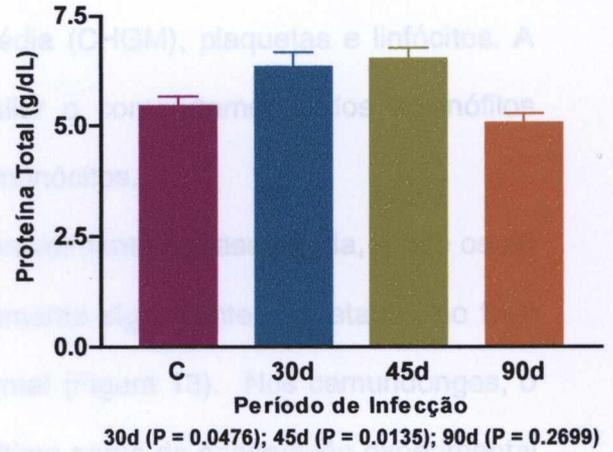


Figura 11: Dosagem da albumina nos ratos. A albumina está sensivelmente diminuída aos 15 dias pós-infecção e significativamente elevada aos 40 dias. Aos 70 dias, apresenta níveis compatíveis com os valores normais.

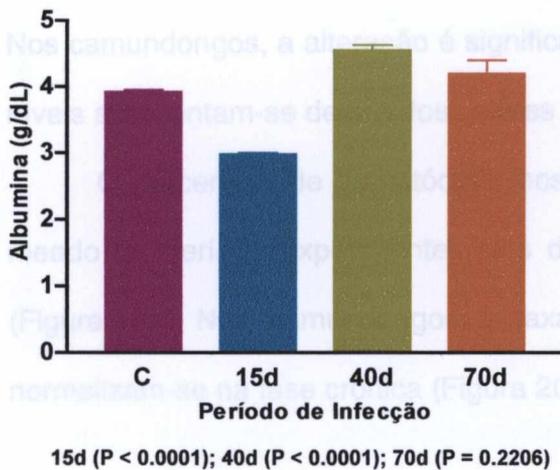
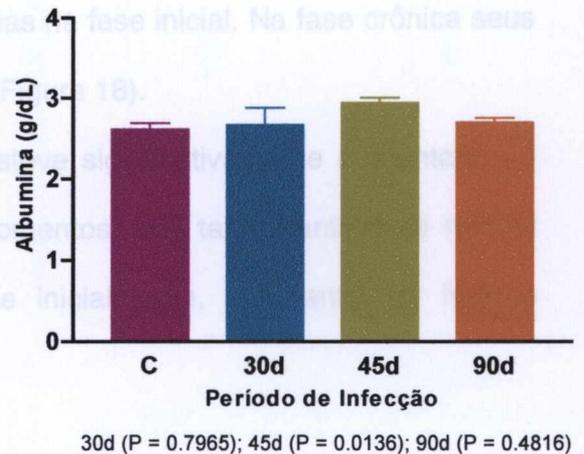


Figura 12: Dosagem da albumina nos camundongos. A albumina mostra níveis significativamente elevados apenas aos 45 dias pós-infecção. Os demais pontos experimentais apresentam níveis comparáveis aos valores normais.



6.3 HEMATOLOGIA

6.3.1 Hemograma Completo

O perfil hematológico dos animais é avaliado, na fase de pré-infecção e nos pontos de observação experimental, a partir da análise dos leucócitos, hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume globular médio das hemácias (VGMH), hemoglobina globular média (HGM), concentração da hemoglobina globular média (CHGM), plaquetas e linfócitos. A contagem diferencial dos leucócitos permite avaliar o comportamento dos eosinófilos (bastões, em sua maioria), neutrófilos, linfócitos e monócitos.

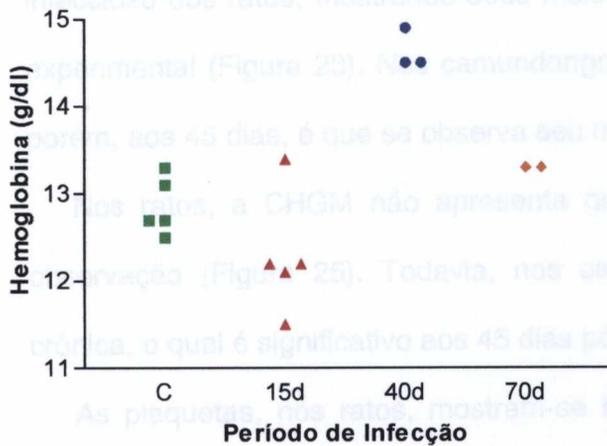
Os leucócitos, nos ratos, aumentam consideravelmente na fase aguda, e, até os 40 dias pós-infecção, a diferença continua estatisticamente significativa. Entretanto, no final do período experimental os valores voltam ao normal (Figura 13). Nos camundongos, o aumento também é intenso na fase aguda, e, no último ponto de observação experimental a diferença continua sendo estatisticamente relevante (Figura 14).

O número de hemácias se eleva gradativamente com a evolução da infecção, tendo significado estatístico aos 40 dias pós-infecção (Figura 15). Já os camundongos mostram uma queda inicial significativa. Entretanto, aos 90 dias pós-infecção, ocorre uma elevação estatisticamente significativa (Figura 16).

A concentração da hemoglobina, nos ratos, se altera de forma significativa no meado do período experimental, fase em que seus níveis estão aumentados (Figura 17). Nos camundongos, a alteração é significativa apenas na fase inicial. Na fase crônica seus níveis apresentam-se dentro dos valores normais (Figura 18).

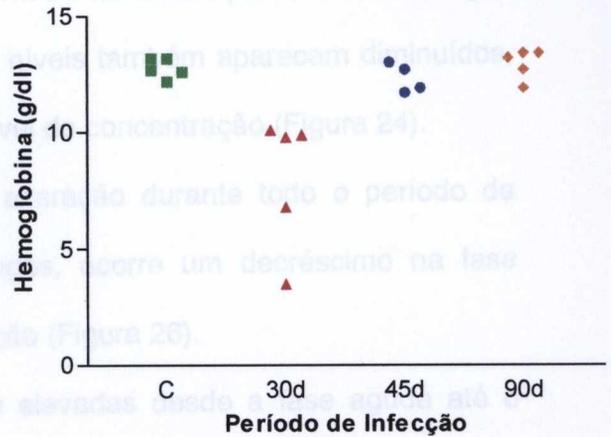
O percentual de hematócrito, nos ratos, esteve significativamente aumentado no meado do período experimental. Nos demais momentos, sua taxa manteve-se normal (Figura 19). Nos camundongos a taxa eleva-se inicialmente, entretanto, os índices normalizam-se na fase crônica (Figura 20).

Figura 17: Concentração da hemoglobina nos ratos. Ocorre um decréscimo aos 15 dias pós-infecção e um aumento significativo aos 40 dias. Aos 70 dias o nível de hemoglobina apresenta-se normal.



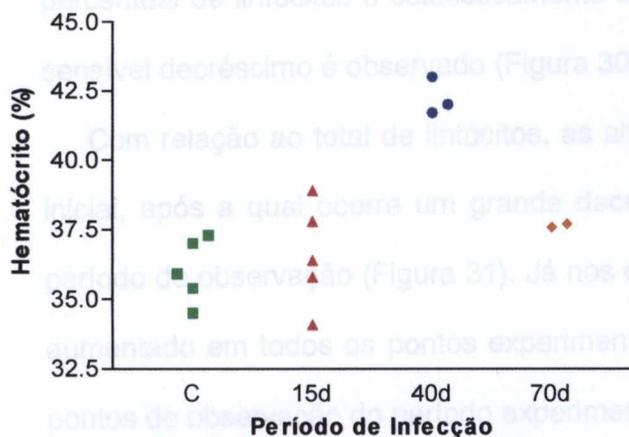
15d (P = 0.1284); 40d (P = 0.0002); 70d (P > 0.0005)

Figura 18: Concentração da hemoglobina nos camundongos. A concentração da hemoglobina inicialmente cai de forma significativa, como é demonstrado aos 30 dias. Em seguida, seus níveis voltam ao normal.



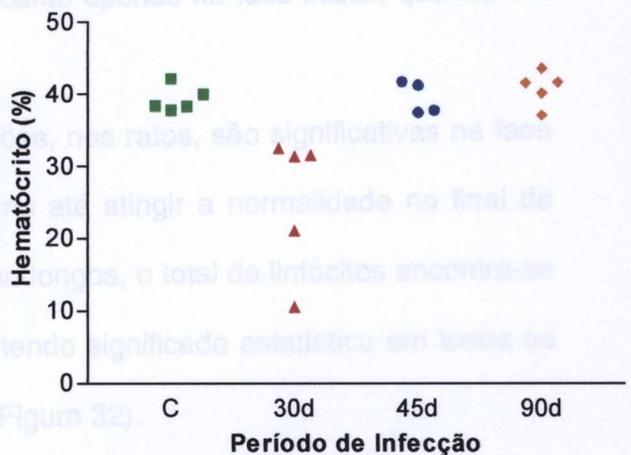
30d (P = 0.0063); 45d (P = 0.2337); 90d (P = 0.6940)

Figura 19: Percentual de hematócrito nos ratos. Apenas no meado do período experimental, o percentual de hematócrito eleva-se de forma significativa, como pode ser demonstrado aos 40 dias pós-infecção.



15d (P = 0.5679); 40d (P = 0.0002); 70d (P = 0.1174)

Figura 20: Percentual de hematócrito nos camundongos. A taxa de hematócrito diminui significativamente no início do período observado (30 dias). Na fase crônica, os índices apresentam-se normalizados (45 e 90 dias).



30d (P = 0.0124); 45d (P = 0.9090); 90d (P = 0.3290)

Nos ratos, o VGMH decresce de forma gradativa conforme avança o período experimental, mostrando diferenças significantes na fase crônica (Figura 21). Os camundongos apresentam um decréscimo na fase crônica (Figura 22).

A HGM mostra-se significativamente diminuída durante todo o período pós-infeccioso dos ratos, mostrando seus mais baixos níveis no último ponto de observação experimental (Figura 23). Nos camundongos, seus níveis também aparecem diminuídos, porém, aos 45 dias, é que se observa seu menor nível de concentração (Figura 24).

Nos ratos, a CHGM não apresenta qualquer alteração durante todo o período de observação (Figura 25). Todavia, nos camundongos, ocorre um decréscimo na fase crônica, o qual é significativo aos 45 dias pós-infecção (Figura 26).

As plaquetas, nos ratos, mostram-se bastante elevadas desde a fase aguda até o meado do período experimental. Porém, no último ponto de observação seus valores estão normais (Figura 27). Nos camundongos, seu número eleva-se durante todo o período de infecção, tendo significado estatístico aos 45 dias pós-infecção (Figura 28).

O percentual de linfócitos mostra-se significativamente reduzido na fase inicial da infecção nos ratos, permanecendo assim até a metade do período de observação. Entretanto, na fase crônica este percentual aumenta e mostra-se dentro dos índices normais aos 70 dias após a infecção (Figura 29). Nos camundongos, a alteração no percentual de linfócitos é estatisticamente significante apenas na fase inicial, quando um sensível decréscimo é observado (Figura 30).

Com relação ao total de linfócitos, as alterações, nos ratos, são significativas na fase inicial, após a qual ocorre um grande decréscimo até atingir a normalidade no final do período de observação (Figura 31). Já nos camundongos, o total de linfócitos encontra-se aumentado em todos os pontos experimentais, tendo significado estatístico em todos os pontos de observação do período experimental (Figura 32).

Figura 21: Volume globular médio das hemáceas nos ratos. O VGMH diminui gradativamente enquanto avança o quadro patológico, mostrando diferenças significantes na fase crônica (aos 40 e 70 dias pós-infecção).

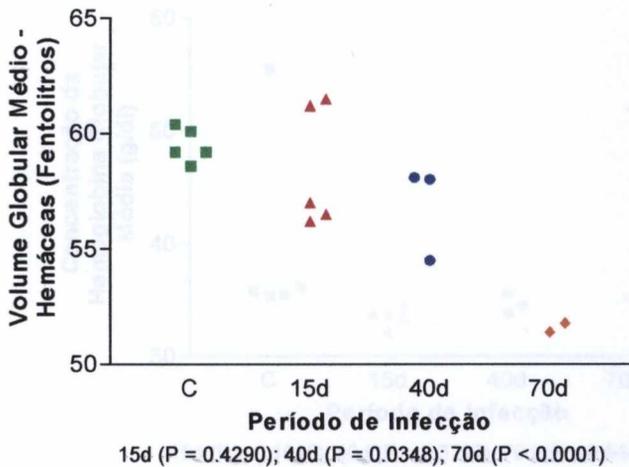


Figura 22: Volume globular médio das hemáceas nos camundongos. O VGMH apresenta-se diminuído na fase crônica (aos 45 e 90 dias pós-infecção). Porém, estes dados não têm significância estatística (P > 0.05).

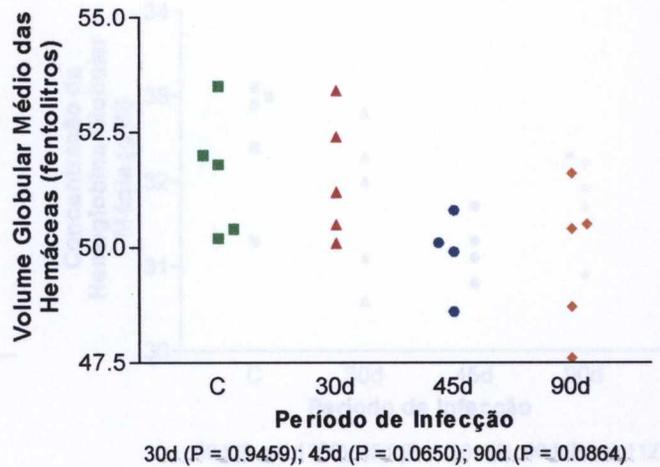


Figura 23: Dosagem da hemoglobina globular média nos ratos. Os níveis de HGM caem de forma estatisticamente significativa na evolução do quadro patológico, o que pode ser demonstrado, principalmente, aos 70 dias pós-infecção.

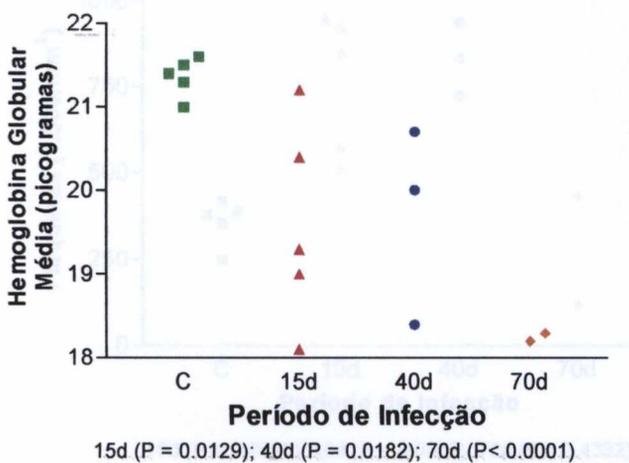


Figura 24: Dosagem da HGM nos camundongos. Os níveis da HGM apresentam-se diminuídos durante o período pós-infecçioso, mas, seu menor nível é visto no meado do período experimental, aos 45 dias.

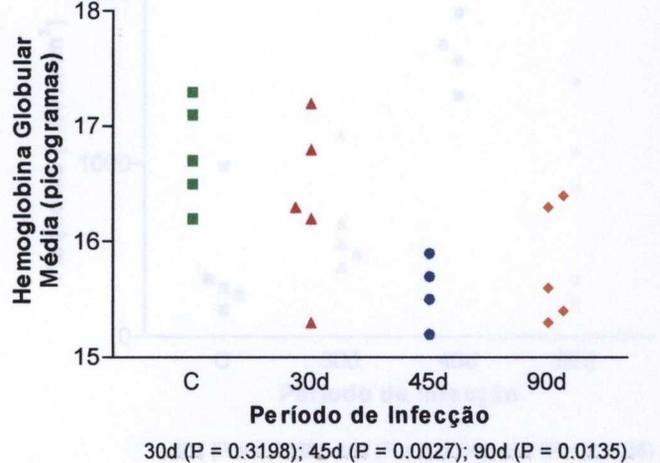


Figura 25: Concentração da hemoglobina globular média nos ratos. Durante todo o período experimental a CHGM mostrou-se dentro dos parâmetros normais.

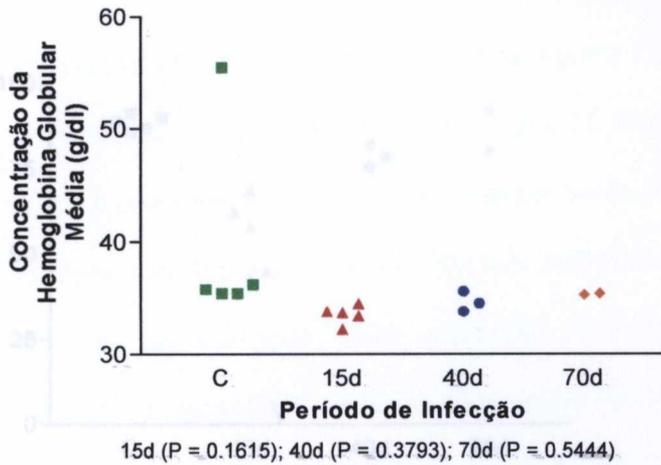


Figura 26: Concentração da hemoglobina globular média nos camundongos. A CHGM esteve diminuída na fase crônica da infecção. Esta alteração teve significância estatística demonstrada aos 45 dias pós-infecção.

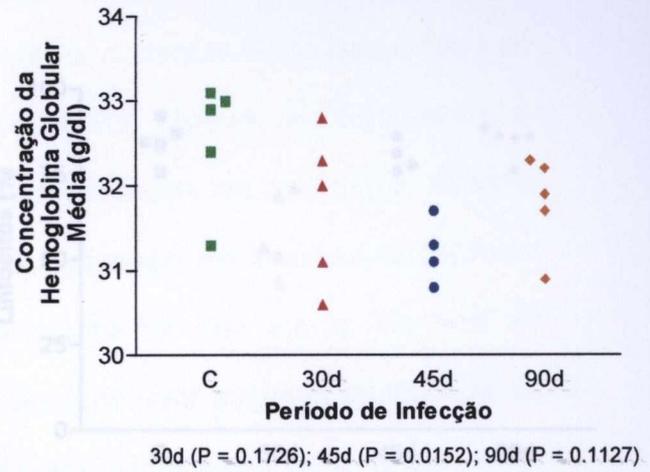


Figura 27: Contagem das plaquetas nos ratos. Ocorre um aumento no número de plaquetas desde a fase aguda (15 dias) até a metade do período experimental (40 dias). Na fase crônica (70 dias) os valores estão normais.

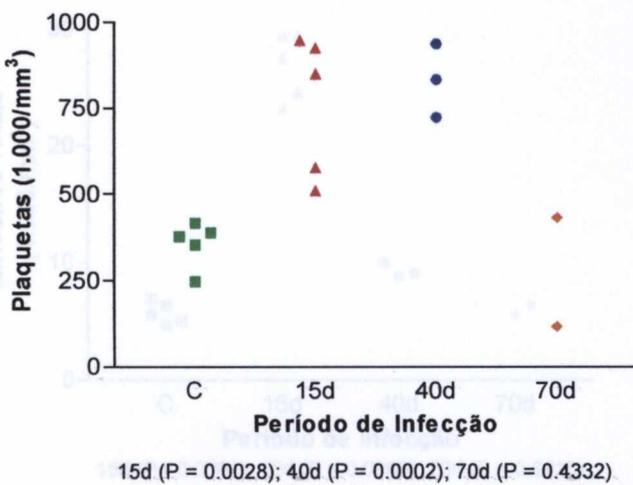


Figura 28: Contagem das plaquetas nos camundongos. O número de plaquetas encontra-se elevado durante todo o período experimental, apresentando seu valor máximo na metade do período (representado aos 45 dias pós-infecção).

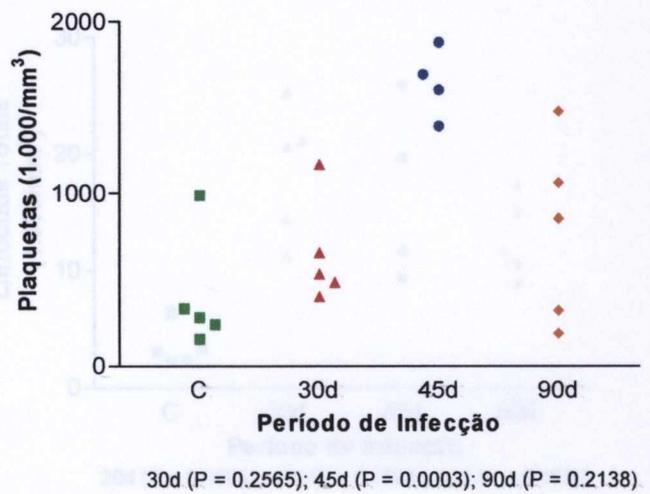
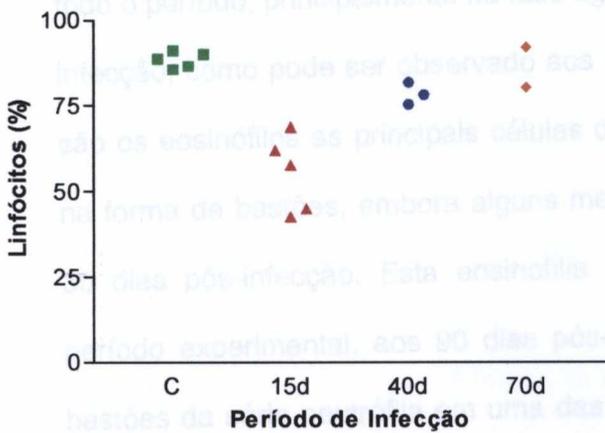


Figura 29: Percentual de linfócitos nos ratos.

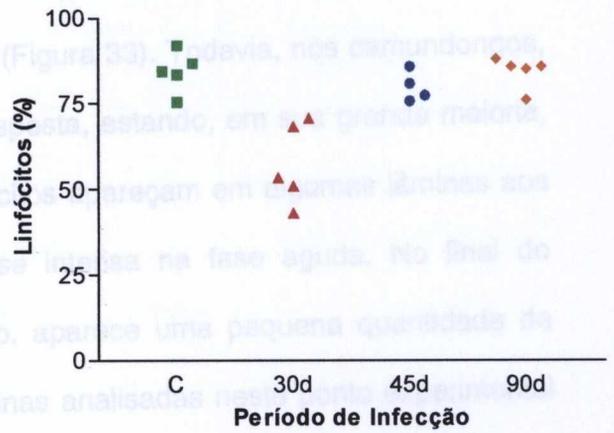
A taxa de linfócitos diminui no período inicial da infecção, como pode ser observada aos 15 dias. Em seguida, vai aumentando, até que, no último ponto experimental apresenta valores normais.



15d (P = 0.0002); 40d (P = 0.0020); 70d (P = 0.5584)

Figura 30: Percentual de linfócitos nos camundongos.

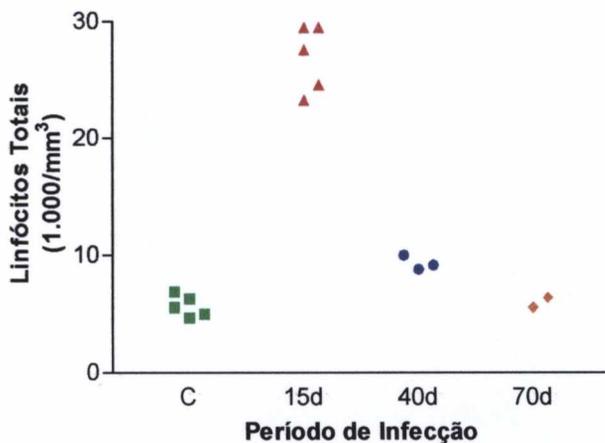
Apenas no primeiro ponto de observação experimental detecta-se uma alteração no percentual de linfócitos, representada por um decréscimo significativo aos 30 dias.



30d (P = 0.0018); 45d (P = 0.2441); 90d (P = 0.9137)

Figura 31: Total de linfócitos nos ratos.

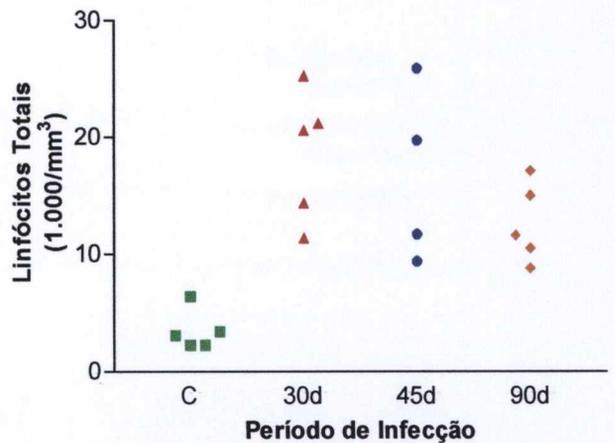
O número de linfócitos aumenta intensamente na fase aguda (15 dias pós-infecção). Em seguida, ocorre um decréscimo até que, na fase crônica, aos 70 dias, seus valores mostram-se normais.



15d (P < 0.0001); 40d (P = 0.0009); 70d (P = 0.6910)

Figura 32: Total de linfócitos nos camundongos.

Os linfócitos estão significativamente elevados durante todo o período de observação experimental.



30d (P = 0.0004); 45d (P = 0.0064); 90d (P = 0.0007)

→ Contagem diferencial dos leucócitos

A contagem diferencial de leucócitos mostra que, nos ratos, os neutrófilos são as principais células da resposta inflamatória, apresentando níveis elevados durante quase todo o período, principalmente na fase aguda (15 dias), e, normaliza-se na fase crônica da infecção, como pode ser observado aos 70 dias (Figura 33). Todavia, nos camundongos, são os eosinófilos as principais células desta resposta, estando, em sua grande maioria, na forma de bastões, embora alguns metamielócitos apareçam em algumas lâminas aos 30 dias pós-infecção. Esta eosinofilia mostra-se intensa na fase aguda. No final do período experimental, aos 90 dias pós-infecção, aparece uma pequena quantidade de bastões da série neutrófila em uma das 05 lâminas analisadas neste ponto experimental (Figura 34).

Figura 33: Leucograma dos ratos. A contagem diferencial de leucócitos mostra que os neutrófilos são as principais células da resposta inflamatória dos ratos, apresentando níveis significativamente elevados durante quase todo o período.

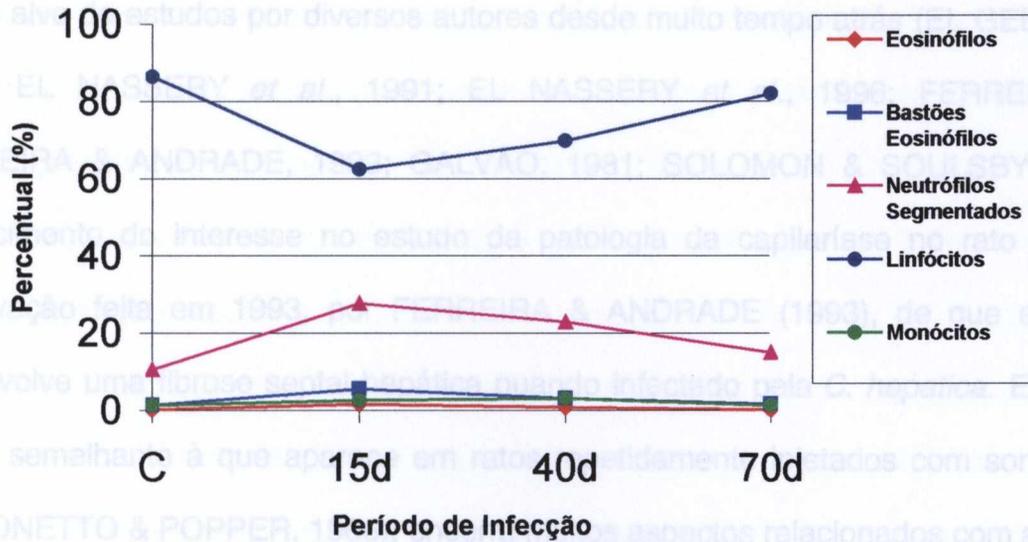
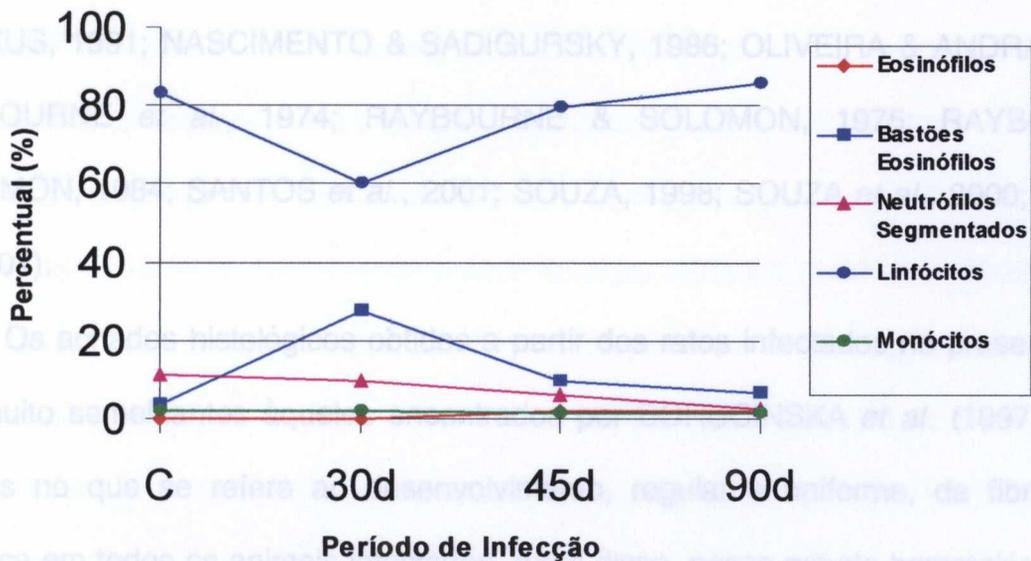


Figura 34: Leucograma dos camundongos. Nos camundongos, os eosinófilos apresentam-se como as principais células da resposta inflamatória, estando, em sua maioria, na forma de bastões, com níveis elevados principalmente na fase aguda.



7 DISCUSSÃO

A patologia hepática em ratos e camundongos infectados pela *C. hepatica* vem sendo alvo de estudos por diversos autores desde muito tempo atrás (EL GEBALY et al., 1996; EL NASSERY et al., 1991; EL NASSERY et al., 1996; FERREIRA, 1992; FERREIRA & ANDRADE, 1993; GALVÃO, 1981; SOLOMON & SOULSBY, 1973). O renascimento do interesse no estudo da patologia da capilaríase no rato se deve à observação feita em 1993, por FERREIRA & ANDRADE (1993), de que este animal desenvolve uma fibrose septal hepática quando infectado pela *C. hepatica*. Esta fibrose, que é semelhante à que aparece em ratos repetidamente injetados com soro de porco (PARONETTO & POPPER, 1966), encerra muitos aspectos relacionados com a patogenia da fibrose, com a participação de fatores imunológicos na fibrose hepática, com testes terapêuticos com drogas anti-fibrosantes, com o papel que a fibrose desempenha na patologia hepática etc. Vários destes aspectos foram explorados com o modelo do soro de porco e outros estão agora sendo estudados com o modelo da *C hepatica*, tal o potencial que encerra no tema fibrose hepática, associado ao fato de ser um bom modelo experimental para estudar a fibrose em seus múltiplos aspectos (CHEETHAM & MARKUS, 1991; NASCIMENTO & SADIGURSKY, 1986; OLIVEIRA & ANDRADE, 2001; RAYBOURNE et al., 1974; RAYBOURNE & SOLOMON, 1975; RAYBOURNE & SOLOMON, 1984; SANTOS et al., 2001; SOUZA, 1998; SOUZA et al., 2000; SOUZA et al., 2001).

Os achados histológicos obtidos a partir dos ratos infectados no presente estudo, são muito semelhantes àqueles encontrados por BORUCINSKA et al. (1997), diferindo apenas no que se refere ao desenvolvimento, regular e uniforme, da fibrose septal hepática em todos os animais infectados. Além disso, nosso estudo hematológico mostra que as células responsáveis pela leucocitose ocorrida nestes animais foram,

predominantemente, os neutrófilos, e não os eosinófilos, registrados por esses autores. As nossas dosagens bioquímicas, assim como aquelas obtidas por BORUCINSKA e seus colaboradores mostraram que os níveis de AST e ALT estavam elevados nos animais infectados. Estes autores promoveram a infecção por *C. hepatica* em “muskrats” (*Ondatra zibethicus*), a qual evidenciou características histológicas semelhantes àquelas descritas em *Rattus* spp., sem, entretanto, desenvolver a fibrose septal. Os autores detectaram anorexia associada às lesões hepáticas, a qual era mais grave em animais com até 28 dias de infecção, assim como, perda de peso, graus variáveis de leucocitose com eosinofilia e elevação dos níveis de AST e ALT. Não foram registradas alterações significativas nos demais valores sanguíneos, nem em outros parâmetros de função hepática. A mortalidade atingiu cerca de 60%, freqüentemente em animais com 39 dias de infecção. Estes pesquisadores mostraram também que não há diferenças significantes nos parâmetros clínicos entre animais com longo período de infecção (até 184 dias) e animais normais.

MEAGHER (1998), num estudo que relacionava o tamanho do inóculo com a resposta fisiológica em camundongos infectados pela *C. hepatica*, fez uma análise dos níveis de fosfatase alcalina, proteína total, albumina e percentual de hematócrito. Este autor verificou que, quatro semanas após a infecção, os níveis de fosfatase alcalina e proteína total elevaram-se em animais infectados com um maior número de ovos, porém detectou uma queda nos níveis de albumina, e, com relação à taxa de hematócrito, foi verificado um aumento diretamente proporcional ao tamanho do inóculo. Neste estudo, o autor ainda pôde constatar que as fêmeas respondiam de maneira mais sensível à infecção que os machos. Os dados obtidos neste trabalho conflitam com o presente estudo apenas no que se refere aos níveis de fosfatase alcalina e albumina, pois os resultados aqui revelados indicam um decréscimo da primeira e nenhuma alteração

significante da segunda neste mesmo período, esta última proteína elevou-se apenas aos 45 dias após a infecção nos camundongos.

Não se conhecia bem o padrão de resposta do camundongo no que concerne ao tipo de fibrose hepática em relação à infecção com *C. hepatica*. Esta dúvida foi especificamente desfeita pela investigação de GOTARDO *et al.* (2000), a qual revelou que a fibrose septal não se forma em camundongos infectados por *C. hepatica*, num nítido contraste com o que acontece com o rato. Todavia, na infecção do camundongo, a fibrose hepática também se forma. Esta é de um outro tipo, mas que também interessa à patologia humana. É uma fibrose perisinusoidal, formando o clássico aspecto em cercado de galinheiro (“chicken-wire”) visto na patologia humana. Este tipo de fibrose intersticial, como tem sido demonstrado, é facilmente reabsorvível na esquistossomose experimental do camundongo recentemente tratado (LORTAT-JACOB *et al.*, 1997). Na capilaríase do camundongo esta fibrose também desaparece rápida e espontaneamente. Este aspecto é citado para indicar que a deficiência do camundongo no desenvolvimento de uma fibrose septal comparável à do rato, não significa que o modelo seja destituído de interesse para o estudo da patogenia e significado da fibrose hepática. A maneira como a fibrose intraparenquimal sofre remodelação no curso da capilaríase do camundongo merece ser melhor investigada. O fato do aparecimento da fibrose vir precedido de um rico depósito de fibronectina não constitui exceção com o comum dos casos. A presença dos colágenos de tipos I e III e a sua evolução sequencial também não têm significado especial em fibrogênese ou em fibrólise, como já demonstrado na esquistossomose do camundongo (ANDRADE & GRIMAUD, 1986; ANDRADE & GRIMAUD, 1988). Mas, a seqüência de formação das pontes moleculares de lisina (“cross-linkings”), fator de fundamental importância na reversibilidade da fibrose (RICARD-BLUM *et al.*, 1992), mereceria ser investigado num modelo onde a fibrose peri-sinusoidal se forma e é reabsorvida em seqüência, espontaneamente.

O nosso estudo comparativo, quanto à pesquisa de Ig total, mostra que, os camundongos apresentam maior concentração de anticorpos específicos na fase aguda, o contrário do que ocorre com o rato, onde os maiores níveis se concentram na fase crônica. Alguns estudos feitos em camundongos também revelam níveis elevados de anticorpos séricos anti-*C. hepatica* no início da infecção (GALVÃO, 1976; NASCIMENTO & SADIGURSKY, 1986; RAYBOURNE *et al.*, 1974) e níveis menores nas fases mais tardias (SADIGURSKY, 1986; RAYBOURNE *et al.*, 1974). No modelo do rato, os estudos imunopatológicos encontram uma relativa limitação decorrente da dificuldade para a obtenção de insumos (kits) para a exploração dos aspectos imunológicos mais recentes. Em contraste, o camundongo tem servido de padrão para tais estudos. Seu sistema imunológico é hoje bem conhecido nos seus mínimos detalhes. Daí se dizer que, se a fibrose septal induzida pela *C. hepatica* ocorresse também no camundongo, seria muito mais viável a exploração desses aspectos.

Nas lesões parasitárias focais, a degradação dos parasitos mortos e a subsequente calcificação ocorrem em ambos os hospedeiros. No rato, tudo indica que o material seqüestrado no interior das lesões parasitárias focais seja o agente que, provavelmente liberado lenta e continuamente, estimule a formação da fibrose septal (FERREIRA & ANDRADE, 1993). SOLOMON & GRIGONIS (1976) realizaram um estudo relacionando a estrutura e composição do antígeno da casca do ovo da *C. hepatica* com a inflamação granulomatosa que ocorre no fígado dos camundongos. Entretanto estes autores não conseguiram elucidar, de forma específica, esta questão. Sabe-se que estes animais apresentam alguns indícios de que a reabsorção dos detritos parasitários se faz de maneira mais rápida e completa. Embora o presente estudo não tenha sido realizado especificamente para investigar este aspecto, lesões focais, relativamente recentes, foram observadas, as quais aparecem apenas com depósitos de cálcio no seio de um espaço vazio no fígado dos camundongos (Prancha VII - B). Nos ratos, a presença de vermes

mumificados ou sob a forma de detritos (“grumos protéicos”) foi uma regra, mesmo nos últimos períodos experimentais, achados estes sugestivos de uma reabsorção mais lenta e incompleta dos detritos parasitários.

A explicação do diferente comportamento das lesões hepáticas da capilaríase nestas duas espécies animais envolve aspectos dos mais complexos. Estes incluiriam desde considerações de caráter evolutivo, que poderiam ter levado os camundongos a uma adaptação mais inicial e satisfatória nas suas relações hospedeiro-parasita, até fatores mais recentemente adquiridos, ligados ao sistema imunológico, tecido conjuntivo, tipo de resposta inflamatória etc. O estudo agora feito, mostrando as principais características evolutivas das lesões hepáticas no camundongo, suas repercussões funcionais, bem como o comportamento da matriz extra-celular, fornece dados básicos para uma exploração futura do modelo, já que há um interesse crescente na patologia experimental da infecção por *C. hepatica*. No nosso Laboratório estão em curso estudos sobre a infecção por este helminto em camundongos isogênicos de diferentes linhagens, tais como BalbC, C3H, DBA, CBA, AJ e C57 (ALVES, B. Dados não publicados). Os nossos resultados comprovam que os camundongos parecem estar mais adaptados à infecção pela *C. hepatica*, uma vez que não desenvolvem a fibrose septal hepática, e sim uma fibrose perisinusoidal difusa, que é rapidamente reabsorvida com a evolução do quadro patológico.

8 CONCLUSÕES

- I. Ratos e camundongos produzem diferentes tipos de fibrose quando infectados pela *C. hepática*: os primeiros, desenvolvem caracteristicamente uma fibrose do tipo septal, e, os últimos, uma fibrose do tipo peri-sinusoidal, inicialmente difusa.
- II. A evolução da fibrose hepática nos ratos com capilaríase é progressiva e lenta, enquanto nos camundongos é intensa e curta, tendendo à resolução do quadro patológico.
- III. A cinética da resposta imune humoral difere em ratos e camundongos infectados pelo helminto *C. hepatica*.
- IV. As alterações mais evidentes do perfil hepático ocorrem na fase aguda da infecção.
- V. Na fase aguda da capilaríase, os ratos mostram uma leucocitose com neutrofilia, enquanto os camundongos respondem com uma eosinofilia.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADACHI, Y.; BRADFORD, B.U.; GAO, W.; BOJES, H.K.; THURMAN, R.G. Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. **Hepatology**, **20**:453-460, 1994.
2. ALA-KOKKO, L.; PIHLAJANIEMI, T.; MYERS, J.C. Gene expression of type I, III and IV collagens in hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine in the rat. **Biochem. J.**, **244**:75-79, 1987.
3. ANDRADE, Z.A.; GRIMAUD J.A. Evolution of the schistosomal hepatic lesions in mice after curative chemotherapy. **Am. J. Parasitol.**, **124**:59-65, 1986.
4. ANDRADE, Z.A.; GRIMAUD J.A. Morphology of chronic collagen resorption. A study of the late stages of schistosomal granuloma involution. **Am. J. Parasitol.**, **132**:389-399, 1988.
5. ANDRADE, Z.A. Contribution to the study of septal fibrosis of the liver. **Int. J. Exp. Pathol.**, **72**:553-562, 1991.
6. ANDRADE, Z.A. Tecido Conjuntivo, Reparo, Regeneração e Cicatrização. In: MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia: processos gerais**. 4.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1999. Cap. 8, p.135-152.
7. ATTAH, E.B.; NAGARAJAN, S.; OBINECHE, E.N.; GERA, S.C. Hepatic capillaritis. **Am. J. Clin. Pathol.**, **79**:127-130, 1983.

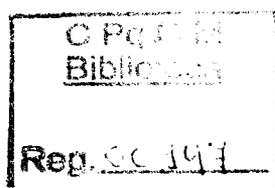
8. BARKER, S.C.; SINGLETON, G.R.; SPRATT, D.M. Can the nematode *Capillaria hepatica* regulate abundance in wild house mice? Results of enclosure experiments in southeastern Australia. **Parasitology**, **103**:439–449, 1991.
9. BERGER, T.; DEGRÉMONT, A.; GEBBERS, J.O.; TONZ, O. Hepatic capillariasis in a 1-year-old child. **Eur. J. Pediatr.**, **149**:333–336, 1990.
10. BHATTACHARYA, D. *Capillaria hepatica*, a parasite of zoonotic importance – a brief overview. **J. Commun Dis.**, **31**:267-269, 1999.
11. BHUNCHET, E.; EISHI, Y.; WAKE, K. Contribution of Immune Response to the Hepatic Fibrosis Induced by Porcine Serum. **Hepatology**, **23**:811-817, 1996.
12. BORUCINSKA, J.D.; VAN KRUININGEN, H.J.; CAIRA, J.N.; GARMENDIA, A.E. Clinicopathological features and histopathology of experimental hepatic capillariasis in muskrats (*Ondatra zibethicus*). **J. Wildl. Dis.**, **33**:122-30, 1997.
13. BOUCHET, F. Intestinal capillariasis in neolithic inhabitants of Chalain (Jura, France). **Lancet**, **349**:256, 1997.
14. CERUTI, R.; SONZOGNI, O.; ORIGGI, F.; CAMMARATA, S.; GIUSTI, A.M.; SCANZIANI, E. *Capillaria hepatica* infection in wild brown rats (*Rattus norvegicus*) from the urban area of Milan, Italy. **J. Vet. Med. B. Infect Dis. Vet. Public Health**, **48**:235-240, 2001.

15. CHEETHAM, R.F.; MARKUS, M.B. Drug treatment of experimental *Capillaria hepatica* infection in mice. **Parasitol. Res.**, **77**:517-20, 1991.
16. CHIEFFI, P.P.; DIAS, R.M.S.; MANGINI, A.C.S.; GRISPINO, D.M.A.; PACHECO, M.A.D. *Capillaria hepatica* (BANCROFT, 1893) em murúdeos capturados no município de São Paulo, SP, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, **23**:143-146, 1981.
17. CHOE, G.; LEE, H.S.; SEO, J.K.; CHAI, J.Y.; LEE, S.H.; EOM, K.S.; CHI, J.G. Hepatic capillariasis: first case report in the Republic of Korea. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **48**:610-625, 1993.
18. COCHRANE, J.C.; SAGORINI, L.; WILCOCKS, M.G. *Capillaria hepatica* infection in man. **S. African Med. J.**, **31**:751-755, 1957.
19. COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; HOBBS, S.L. Cellular growth and differentiation: normal regulation and adaptations. In:_____. **Pathologic basis of disease**. 5.ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994. Cap.2, p.35-50.
20. COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; HOBBS, S.L. Inflammation and repair. In:_____. **Pathologic basis of disease**. 5.ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994. Cap.3, p.51-92.
21. CRAWFORD, J.M. The liver and the biliary tract. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V. HOBBS, S.L. **Pathologic basis of disease**. 5.ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994. Cap.18, p.831-896.

22. DAVOUST, B.; BONI, M.; BRANQUET, D.; DUCOS de LAHITTE, J.; MARTET, G. Research on three parasitic infections within a population of rats trapped in Marseille: evaluation of the zoonotic risk. **Bull. Acad. Natl. Med.**, **181**:887-897, 1997.
23. EL GEBALY, M.W.; EL NASSERY, S.F.; EL AZZOUNI, M.Z.; HAMMOUDA, N.A. ALLAM, S.R. Effect of mebendazole and ivermectin in experimental hepatic capillarlasia: parasitological, scanning electron microscopy and immunopatological studies. **Egypt Soc. Parasitol.**, **26**:261-272, 1996.
24. EL NASSERY, S.F.; EL GEBALY, M.W.; OWEISS, N.Y. *Capillaria hepatica*: an experimental study of infection in white mice. **Egypt Soc. Parasitol.**, **21**:467-478, 1991.
25. EL NASSERY, S.F.; EL GEBALY, M.W.; EL AZZOUNI, M.Z.; HAMMOUDA, N.A.; EL SHENAWIE, S.; ALLAM, S.R. Effect of mebendazole and ivermectin in experimental hepatic capillariasis. B: histopatological and ultrastructural studies. **Egypt Soc. Parasitol.**, **26**:315-326, 1996.
26. FAN, P.C.; CHUNG, W.C.; CHEN, E.R. *Capillaria hepatica*: a spurious case with a brief review. **Kaohsiung J. Med. Sci.** **16**:360-367, 2000.
27. FERREIRA, L.A. ***Capilaria hepatica*: uma causa de fibrose septal hepática no rato**. 1992. 74fls. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia.

28. FERREIRA, L.A.; ANDRADE, Z.A. *Capillaria hepatica*: a cause of septal fibrosis of the liver. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro**, **88**:441-447, 1993.
29. FRENCH, S.W.; MIYAMOTO, K.; WONG, K. Role of the Ito cell in liver parenchymal fibrosis in rats fed alcohol and a high fat low protein diet. **Am. J. Pathol.**, **1323**:73-85, 1988.
30. GALVÃO, V.A. *Capillaria hepatica*, estudo da incidência em ratos de Salvador, Bahia, e dados imunopatológicos preliminares. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **X**:333-337, 1976.
31. GALVÃO, V.A. Estudos sobre *Capillaria hepatica*: uma avaliação do seu papel patogênico para o homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, **76**:415-433, 1981.
32. GONZÁLEZ BARRANCO, D.; PELÁEZ, D.; RODRÍGUEZ, Y.J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.A. Third case of hepatic capillariasis in Mexico. **Rev. Invest. Clin.**, **48**:301-305, 1996.
33. GOTARDO, B.M.; ANDRADE, R.G.; ANDRADE, Z.A. Hepatic pathology in *Capillaria hepatica* infected mice. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **33**:341-346, 2000.
34. GOVIL, H.; DESAI, M. *Capillaria hepatica* parasitism. **Indian J. Pediatr.**, **63**(5):698-700, 1996.

35. GRACZYK, T.K.; LOWENSTINE, L.J.; CRANFIELD, M.R. *Capillaria hepatica* (Nematoda) Infections in Human-Habituated Mountain Gorillas (*Gorilla gorilla beringei*) of the Parc National de Volcans, Rwanda. **J. Parasitol.**, **85**:1168-1170, 1999.
36. GREENWEL, P.; RUBIN, J.; SCHWARTZ, M.; HERTZBERG, E.L.; ROJKIND, M. Liver Fat-Storing Cell Clones Obtained from a CCL₄-Cirrhotic Rat are Heterogeneous with Regard to Proliferation, Expression of Extracellular Matrix Components, Interleukin-6 and Connexin 43. **Lab. Invest.**, **69**:210-216, 1993.
37. HAMIR, A.N.; RUPPRECHT, C.E. Hepatic capillariasis (*Capillaria hepatica*) in porcupines (*Erethizon dorsatum*) in Pennsylvania. **J. Vet. Diagn. Invest.**, **12**:463-465, 2000.
38. IGARASHI, S.; HATAHARA, T.; NAGAI, Y. Anti-fibrotic effects of Malotilate on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. **Jpn. J. Exp. Med.**, **56**:235-245, 1986.
39. JARVELAINEN, H.A.; FANG, C.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; LINDROS, K.O. Effect of chronic coadministration of endotoxin and ethanol on rat liver pathology and proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. **Hepatology**, **29**:1503-1510, 1999.
40. KOHATSU, H.; ZAHA, O.; SHIMADA, K.; CHIBANA, T.; YARA, I.; SHIMADA, A.; HASEGAWA, K.; SATO, Y. A space-occupying lesion in the liver due to *Capillaria* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **52**:414-418, 1995.



41. KOKAI, G.K.; MISIC, S.; PERISIC, V.N.; GRUJOVSKA, S. *Capillaria hepatica* infestation in a 2-year-old girl. **Histopatology**, **17**:275-277, 1990.
42. LEVY, E.; SLUSSER, R.J.; REUBNER, B.H. Hepatic changes produced by a single dose of endotoxin in the mouse by electron microscopy. **Am. J. Pathol.**, **52**:477-502, 1968.
43. LIEBER, C.S.; DeCARLI, L.M. Quantitative relationship between amount of dietary fat and severity of alcoholic fatty liver. **Am. J. Clin. Nutr.**, **23**: 474-478, 1970.
44. LIEBER, C.S. Alcohol and the liver. **Gastroenterology**, **106**:1085-1105, 1994.
45. LORTAT-JACOB, H.; BALTZER, F.; DESMOULIERE, A.; PEYROL, S.; GRIMAUD, J.A. Lobular – but not perlovular – inhibition of collagen deposition in the liver of *S. mansoni* infected mice using interferon- γ . **J. Hepatol.**, **26**:894–903, 1997.
46. McCALLUM, H.I.; SINGLETON, G.R. Models to assess the potential of *Capillaria hepatica* to control population outbreaks of house mice. **Parasitology**, **98**:425–37, 1989.
47. McCALLUM, H.I. Evaluation of a nematode (*Capillaria hepatica* Bancroft, 1893) as a control agent for populations of house mice (*Mus musculus domesticus* Schwartz and Schwartz, 1943). **Rev. Sci. Tech.**, **12**:83-93, 1993.

48. MEAGHER, S. Physiological responses of deer mice (*Peromyscus maniculatus*) to infection with *Capillaria hepatica* (Nematoda). **J. Parasitol.**, **84**:1112-1118, 1998.
49. MONZON, R.B.; SANCHEZ, A.R.; TADIAMAN, B.M.; NAJOS, O.A.; VALENCIA, E.G.; DE RUEDA, E.R.; VENTURA, J.V. A comparison of the role of *Musca domestica* (Linnaeus) and *Chrysomya megacephala* (Fabricius) as mechanical vectors of helminthic parasites in a typical slum area of Metropolitan Manila. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, **22**:222-8, 1991.
50. MUNROE, G.A. Pyloric stenosis in a yearling with an incidental finding of *Capillaria hepatica* in the liver. **Equine Vet. J.**, **16**:221-222, 1984.
51. NAKAMUTA, M.; OHTA, S.; TADA, S.; TSURUTA, S.; SUGIMOTO, R.; KOTOH, K.; KATO, M.; NAKASHIMA, Y.; ENJOJI, M.; NAWATA, H. Dimethyl sulfoxide inhibits dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. **Int. J. Mol. Med.**, **8**:553-560, 2001.
52. NAMUE, C.; WONGSAWAD, C. A survey of helminth infection in rats (*Rattus spp*) from Chiang Mai Moat. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, **28**:179-183, 1997.
53. NANJI, A.A.; YANG, E.K.; FOGT, F.; SADRZADECH, S.M.H.; DANNENBERG, A.J.; Médium chain triglycerides and vitamin E reduce the severity of established experimental alcoholic liver disease. **J. Pharmacol. Exp.**, **277**:694-700, 1996.

54. NASCIMENTO, I.; SADIGURSKY, M. *Capilaria hepatica*: alguns aspectos imunopatológicos da infecção espúria e da Infecção verdadeira. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **19**:21-25, 1986.
55. NIKI, T.; BLESER, P.J.; XU, G.; DEN BERG, K.V.; WISSE, E.; GEERTS, A. Comparison of Glial Fibrillary Acidic Protein and DesmIn Staining in Normal and CCL₄-Induced Fibrotic Rat Livers. **Hepatology**, **23**:1538-1546, 1996.
56. OKAEME, A.N. Zoonotic helminths of dogs and cats at New Bussa, Kainji Lake area, Nigeria. **Int. J. Zoon.**, **12**:238-240, 1985.
57. OLIVEIRA, R.F.; ANDRADE, Z.A. Worm Load and Septal Fibrosis of the Liver in *Capilaria hepatica*-infected Rats. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **96**:1001-1003, 2001.
58. PARONETTO, F.; POPPER, H. Chronic liver Injury Induced by immunologic reactions. **J. Pathol.**, **49**:1087–1101, 1966.
59. PEREIRA, V.G.; FRANÇA, L.C.M. Infecção humana por “*Capilaria hepatica*” – Relato de um caso tratado com êxito. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, **36**:31-34, 1981.
60. PEREIRA, V.G.; FRANÇA, L.C.M. Successful treatment of *Capilaria hepatica* infection in an acutely ill adult. **Am. J. Trop. Hyg.**, **32**:1272-1274, 1983.

61. RAYBOURNE, R.B.; SOLOMON, G.B.; SOULSBY, E.J.L. *Capillaria hepatica*: Granuloma Formation to Eggs. II. Peripheral Immunological Responses. **Exp. Parasitol.**, **36**:244-245, 1974.
62. RAYBOURNE, R.; SOLOMON, G.B. *Capillaria hepatica*: Granuloma Formation to Eggs. III. Anti-Immunoglobulin Augmentation and Reagin Activity in Mice. **Exp. Parasitol.**, **38**:87-95, 1975.
63. RAYBOURNE, R.; SOLOMON, G.B. Granulomatous hypersensitivity and antibody production in response to antigens of *Capillaria hepatica* eggs. **Int. J. Parasitol.**, **14**:371-375, 1984.
64. RICARD-BLUM, S.; VILLE, G.; GRIMAUD, J.A. Pyridinoline, a mature collagen cross-link, in fibrotic livers from *Schistosoma mansoni*-infected mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **47**:816-820, 1992.
65. RIVERA, C.A.; BRADFORD, B.U.; HUNT, K.J.; ADACHI, Y.; SCHRUM, L.W.; KOOP, D.R.; BURCHARDT, E.R.; RIPPE, R.A.; THURMAN, R.G. Attenuation of CCL₄-induced hepatic fibrosis by GdCl₃ treatment or dietary glycine. **Am. J. Gastrointest Liver Physiol.**, **281**:G200-G207, 2001.
66. RUTENBURG, A.M.; SONNENBLICK, E.; KOVEN, I. The role of intestinal bacteria in the development of dietary cirrhosis in rats. **J. Exp. Med.**, **106**:1-13, 1987.

67. SANTOS, A.B.; TOLENTINO Jr., M.; ANDRADE, Z.A. Pathogenesis of hepatic fibrosis associated with *Capillaria hepatica* infection of rats. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **34**:503-506, 2001.
68. SAWAMURA, R.; FERNANDES, M.I.M.; PERES, L.C.; GALVÃO, L.C.; GOLDANI, H.A.S.; JORGE, S.M.; ROCHA, G.M.; SOUZA, N.M. Hepatic capillariasis in children: report of 3 cases in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **61**:642-647, 1999.
69. SEONG, J.K.; HUH, S.; LEE, J.S.; OH, Y.S. Helminths in *Rattus norvegicus* captured in Chunchon, Korea. **Korean J. Parasitol.**, **33**:235-237, 1995.
70. SHIVATORI, Y.; GEERTS, A.; ICHIDA, A. Kupffer cells from CCL₄-induced fibrotic livers stimulate proliferation of fat-storing cells. **J. Hepatol.**, **3**: 294-303, 1986.
71. SILVA, L.; ANDRADE, Z.A. Repair of Schistosomal Intestinal Vascular Lesions after Curative Treatment. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **90**:401–405, 1995.
72. SILVA, L. M. **Modulação do granuloma perlovular esquistossomótico: morfometria e comportamento da matriz extra-celular.** 1998. 87fls. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental). Universidade Federal da Bahia.
73. SINGLETON, G.R.; McCALLUM, H.I. The Potential of *Capillaria hepatica* to Control Mouse Plagues. **Parasitology**, **6**:190-193, 1990.

74. SINGLETON, G.R.; SPRATT, D.M.; BARKER, S.C.; HODGSON, P.F. The geographic distribution and host range of *Capillaria hepatica* (BANCROFT) (Nematoda) in Australia. **Int. J. Parasitol.**, **21**:945–957, 1991.
75. SINGLETON, G.R.; CHAMBERS, L.K. A Manipulative Field Experiment to Examine the Effect of *Capillaria hepatica* (Nematoda) on Wild Mouse Populations in Southern Australia. **Int. J. Parasitol.**, **26**:383–398, 1996.
76. SOLOMON, G.B.; SOULSBY, E.J.L. Granuloma Formation to *Capillaria hepatica* Eggs. I. Descriptive Definition. **Exp. Parasitol.**, **33**:458-467, 1973.
77. SOLOMON, G.B.; RAYBOURNE, R.B.; SOULSBY, E.J.L. Serological Studies on Rodents Infected with *Capillaria hepatica*. **J. Parasitol.**, **60**:732-734, 1974.
78. SOLOMON, G.B.; GRIGONIS, G.J. *Capillaria hepatica*: Relation of Structure and Composition of Egg Shell to Antigen Release. **Exp. Parasitol.**, **40**:298-307, 1976.
79. SOUZA, M.M. **Modelo da fibrose septal por *Capillaria hepatica*. Utilização em testes com drogas antifibrosantes.** 1998. 70fls. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Federal da Bahia.
80. SOUZA, M.M.; SILVA, L.M.; BARBOSA Jr., A.A.; OLIVEIRA, I.R.; PARANÁ, R.; ANDRADE, Z.A. Hepatic capiliariasis in rats: a new model for testing antifibrotic drugs. **Braz. J. of Med. Biol. Res.**, **33**:1329-1334, 2000.

81. SOUZA, M.M.; PARANÁ, R.; TREPO, C.; BARBOSA Jr., A.A.; OLIVEIRA, I.; ANDRADE, Z.A. Effect of Interferon- α on Experimental Septal Fibrosis of the Liver – Study with a New Model. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 96:343-348, 2001.
82. SPRATT, D.M. The Role of Helminths in the Biological Control of Mammals. **Int. J. Parasitol.**, 20:543-550, 1990.
83. TERRIER, P.; HACK, I.; HATZ, C.; THEINTZ, G.; ROULET, M. Hepatic Capillariasis in a 2-Year-Old Boy. **J. Pediatr. Gastroent. Nutr.**, 28:338-340, 1999.
84. TSUKAMOTO, H.; TOWNER, S.J.; CIOFALO, L.M.; FRENCH, S.W. Ethanol-induced liver fibrosis in rats fed high fat diets. **Hepatology**, 6:814-822, 1986.
85. TSUKAMOTO, H.; MATSUOKA, M.; FRENCH, S.W. Experimental Models of Hepatic Fibrosis: A Review. **Semin. Liver Dis.**, 10:56-65, 1990.
86. VARGAS CARRETO, G.; MARTINEZ, H.L.; VICTORIA, R.V.; MUNOZ, G.H. [*Capillaria hepatica*. Report of the 2nd case found in the Mexican Republic]. **Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.**, 36:909-917, 1979.
87. ZIMMERMAN, T.; MULLER, A.; MACKNIK, G. Biochemical and morphological studies on production and regression of experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in Uje: WIST rats. **Z. Versuchstie**, 30:165-180, 1987.