



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ**



UFBA

Curso de Pós-Graduação em Patologia

FIOCRUZ

Dissertação de Mestrado

**MODELO DA FIBROSE SEPTAL POR *Capillaria hepatica*.
UTILIZAÇÃO EM TESTES COM DROGAS
ANTIFIBROSANTES.**

MÁRCIA MARIA DE SOUZA

**Salvador - Bahia - Brasil
1998**



001727

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

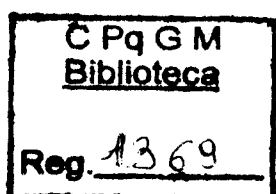
**MODELO DA FIBROSE SEPTAL POR *Capillaria hepatica*.
UTILIZAÇÃO EM TESTES COM DROGAS
ANTIFIBROSANTES.**

MÁRCIA MARIA DE SOUZA

Professor-orientador: ZILTON DE ARAÚJO ANDRADE

Dissertação apresentada para obtenção do
grau de Mestre em Patologia Experimental.

Salvador - Bahia - Brasil
1998



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

Souza, Márcia Maria de
S729m Modelo da fibrose septal hepática por *Capillaria hepatica*. Utilização em testes com drogas antifibrosantes. / Márcia Maria de Souza. -- Salvador: UFBA / CPqGM, 1998.
81 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Federal da Bahia, 1998.

1. *Capillaria hepatica*. 2. Fibrose septal hepática. 3. Drogas antifibrosantes. 4. Fibrose hepática. I. Título.

CDU 616.995.132: 615

11/10/98

11/10/98

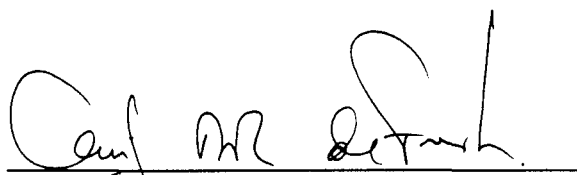
616.995.132 : 615
S729m

11/10/98

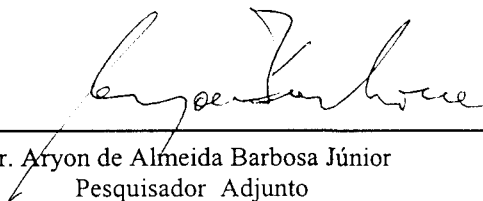
11/10/98

FOLHA DE APROVAÇÃO

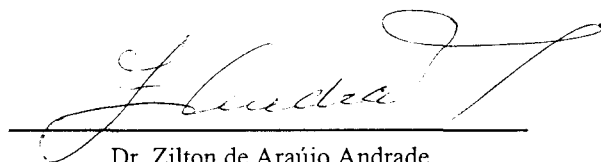
COMISSÃO EXAMINADORA



Luiz Antonio Rodrigues de Freitas
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior
Pesquisador Adjunto
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Zilton de Araújo Andrade
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ

“Ainda que a figueira não floresça, nem haja fruto nas vides; ainda que falhe o produto da oliveira, e os campos não produzam mantimento; ainda que o rebanho seja exterminado da malhada e nos currais não haja gado; todavia eu me alegrarei no Senhor, exultarei no Deus da minha salvação.

O Senhor Deus é a minha força, ele fará os meus pés como os da corça, e me fará andar sobre os meus lugares altos”.

Habacuque 3.17-19.

A meus pais, que me ensinaram a respeitar ao meu próximo e também a plantar e regar meus objetivos, com trabalho árduo e sincero, para que na estação apropriada os frutos venham a ser colhidos. À minha família pelo apoio, paciência e demonstração permanente de amor.

Agradecimentos:

Ao Dr. Zilton A. Andrade pela convivência amigável acima de tudo, pela oportunidade e honra de tê-lo como orientador, e pela confiança em mim depositada – minha profunda gratidão.

A Dra. Sonia G. Andrade pelo exemplo vivo de pesquisadora e orientadora. Meus sinceros agradecimentos pelo apoio laboratorial, confiança, disponibilidade e amizade.

Ao Dr. Moysés Sadigursky pela oportunidade a mim concedida, quando da sua gestão como diretor deste Centro de Pesquisas, em estagiar no Laboratório de Patologia Experimental; pela demonstração de amizade e disponibilidade em todos os momentos.

Ao Coordenador do Curso de pós-graduação em Patologia, Dr. Manoel Barral-Neto pelo apoio e ajuda em etapas deste trabalho.

Ao Diretor do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz Dr. Mitermayer Galvão dos Reis pelas sugestões e pelo apoio institucional.

Ao Dr. Allen Cheever pela amizade, disponibilidade e orientação na padronização da técnica de dosagem da hidroxiprolina, sem a qual parte deste trabalho não teria sido realizado, e também nos testes iniciais com o cloreto de gadolínio – minha gratidão.

Ao Dr. Christian Trepo do INSERM Unité 271, Lyon, França, pelo fornecimento do Interferon-alfa, não-específico, utilizado neste trabalho. Muito obrigada.

Ao Dr. Aryon A. Barbosa Jr. pela orientação e disponibilidade na realização da análise morfométrica, e pelas sugestões quando da análise preliminar do projeto de tese.

Ao Dr. Irismar Reis de Oliveira pela análise estatística imprescindível para a conclusão deste trabalho – obrigada.

Ao Dr. Emílio José de Castro e Silva chefe do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia pelo fornecimento de parte dos animais utilizados neste trabalho.

À Bióloga e mestranda, companheira em todos os momentos, Luciana M. da Silva, pela amizade, respeito, confiança, e por toda ajuda a mim dispensada em todas as etapas deste trabalho – obrigada.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Experimental e do Laboratório de Doença de Chagas Experimental que para mim são a minha segunda família, pela amizade, paciência, ajuda e principalmente, pelo amor fraternal cultivado durante esses anos de convivência – muitíssimo obrigada.

Às professoras do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia Ângela M.F. de L. e Souza, Rozália M.F. Campos e Nícia C. de Albuquerque pela amizade, apoio, confiança, estímulo e exemplo de dedicação – minha admiração e gratidão.

Aos professores e amigos do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Biologia- UFBA a quem devo parte da minha formação acadêmica – muito obrigada.

Ao Biólogo Juracy B. Magalhães e à Técnica de laboratório Maria de Fátima A. Magalhães pela paciência, amizade e disponibilidade em todos os momentos.

À Técnica de Laboratório Dinalva França de Jesus pela ajuda oportuna, amizade e companheirismo – minha gratidão.

À Bióloga e mestranda Elianita Suzart Lima pela amizade, paciência e disponibilidade em todos os momentos deste trabalho – obrigada por tudo.

Ao Técnico de Laboratório Antônio C. S. Santos pela convivência amigável, respeito, disponibilidade e ajuda imprescindíveis em todas as etapas deste trabalho – muito obrigada.

À Técnica de Laboratório, ora aposentada, Teresa Almeida pelo carinho, exemplo de altruísmo, e orientação amigável – muito obrigada.

À Bióloga Queli L. Teixeira pela amizade e ajuda em momentos decisivos deste trabalho – obrigada.

À Bióloga Ana C. Gonzalez pela amizade e ajuda dispensada em etapas deste trabalho – obrigada.

À Bióloga e doutoranda Theolis Barbosa pela disponibilidade e ajuda na análise estatística inicial – muito obrigada.

À Bibliotecária Ana Maria Fiscina V. Sampaio pela ajuda na organização das referências bibliográficas e pela disponibilidade.

À Secretária da pós-graduação Rosália M. Silva pela amizade e apoio indispensáveis.

À Técnica de Laboratório Cristina dos Santos Vasconcelos Mota pela amizade, disponibilidade e profissionalismo na realização das técnicas histológicas empregadas neste trabalho – minha admiração e gratidão.

À Técnica de Laboratório Creuza dos Santos Vasconcelos e a bolsista Cátia Ferreira Magalhães pela realização dos cortes histológicos e colorações – obrigada.

Ao Sr. Presciano da Silva Correa e a D. Antonia Salustiana da Silva pela amizade e cuidado com os animais utilizados neste trabalho.

Ao Sr. Osvaldo Gomes, Everaldo N. dos Anjos e Luiz Augusto A. dos Santos pela disponibilidade e cuidado com os animais experimentais.

Aos professores da pós-graduação em Patologia pelas sugestões e críticas a este trabalho.

Aos colegas da pós-graduação pela amizade e companheirismo.

A Itamar Bastos Crispim e Tânia de Faria, do setor de Comunicação Visual e Documentação Científica do CPqGM, pelo apoio e disponibilidade em momentos imprescindíveis.

A Marcos Mota e Pedro Vivas do Centro de Processamento de Dados do CPqGM pela ajuda e disponibilidade em todos os momentos que foram requisitados.

Aos funcionários de todos os setores do CPqGM pela amizade, disponibilidade e ajuda a mim dispensada.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	<i>A Capillaria hepatica</i>	5
1.2	DROGAS ANTIFIBROGÊNICAS	8
1.2.1	Pentoxifilina	9
1.2.2	Interferon - A (IFN- α).....	11
1.2.3	Vitamina A.....	13
1.2.4	Cloreto de Gadolínio	15
2	OBJETIVOS.....	17
3	JUSTIFICATIVA.....	18
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1	OBTENÇÃO DO INÓCULO.....	19
4.2	PREPARO DO INÓCULO	19
4.3	ANIMAIS.....	20
4.4	INFECÇÃO.....	20
4.5	GRUPOS EXPERIMENTAIS	20
4.5.1	Grupo I - Controle Infectado.....	20
4.5.2	Grupo II - Interferon - α (500.000 U.I./dia/animal/sc.).....	21
4.5.3	Grupo III - Interferon- α (800.000 U.I./dia/animal/sc.).....	21
4.5.4	Grupo IV - Pentoxifilina - Via intraperitoneal	21
4.5.5	Grupo V - Pentoxifilina - Via intravenosa.....	22
4.5.6	Grupo VI - Cloreto de gadolínio - Tratamento preventivo.....	22
4.5.7	Grupo VII - Cloreto de gadolínio - Tratamento curativo.....	22
4.5.8	Grupo VIII - Vitamina A.....	23
4.5.9	Controles intactos tratados com Cloreto de gadolínio + tinta da China 10%	23
4.6	HEPATECTOMIA PARCIAL.....	24
4.7	SACRIFÍCIO.....	24
4.8	TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	25
4.9	TÉCNICA BIOQUÍMICA - DOSAGEM DA HIDROXIPROLINA.....	25
4.10	AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA MATRIZ CONJUNTIVA	26
4.10.1	Análise estatística.....	27
4.11	AVALIAÇÃO DO GRAU DE FIBROSE.....	27
5	RESULTADOS.....	28
5.1	ACHADOS HISTOLÓGICOS	28
5.2	AVALIAÇÃO DO GRAU DE FIBROSE.....	30
5.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CLORETO DE GADOLÍNIO SOBRE AS CÉLULAS DE KUPFFER.....	35
5.4	AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE HIDROXIPROLINA.....	35
5.5	AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO CONTEÚDO DE COLÁGENO HEPÁTICO	36
6	DISCUSSÃO.....	42
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

RESUMO

MODELO DA FIBROSE SEPTAL POR *Capillaria hepatica*. UTILIZAÇÃO EM TESTES COM DROGAS ANTIFIBROSANTES. MÁRCIA MARIA DE SOUZA. Vários modelos têm sido utilizados na tentativa de melhor se compreender a etiologia e a patogenia da fibrose hepática, bem como para se fazer ensaios com drogas anti-fibrosantes. O rato infectado pelo helminto *Capillaria hepatica* desenvolve com regularidade, e em relativamente pouco tempo, um processo de fibrose septal progressiva, que chega até à cirrose. Por estas características, este modelo foi escolhido para testes com algumas drogas anti-fibrosantes, não só para testar tais drogas, como, através do presumido modo de ação de cada uma, inquirir sobre a patogênese da fibrose septal. Os objetivos desse trabalho foram: testar o potencial antifibrosante de algumas drogas, tais como: Pentoxifilina, Cloreto de Gadolínio, Vitamina A e Interferon- α ; determinar a ação tanto preventiva, como curativa, das referidas drogas sobre a fibrose septal. Para isso, foram infectados 40 ratos Wistar com 1.500 ovos embrionados de *C. hepatica*, os quais foram subdivididos em 08 grupos experimentais, que receberam diferentes tratamentos com as drogas já mencionadas, excetuando o grupo controle, que foi tratado apenas com solução salina. Foram utilizadas técnicas histológicas, bioquímicas e morfométricas para a avaliação e mensuração da quantidade de colágeno e do grau de fibrose em amostras do tecido hepático obtidas em diferentes fases da infecção, por vezes, de um mesmo animal, através de hepatectomias parciais. As melhores respostas terapêuticas foram obtidas com Pentoxifilina, administrada por via intraperitoneal, mas não por via intravenosa, e com o Interferon- α nas doses de 500.000 e 800.000 U.I. O Cloreto de gadolínio mostrou moderada ação antifibrosante, mas apenas quando usada preventivamente. Os achados foram verificados através de análise estatística e mostraram significância com $p < 0,05$, utilizando-se o teste Student-Newman-Keuls. O modelo animal empregado revelou-se útil para os testes com drogas com potencial antifibrosante. Inferiu-se que a pentoxifilina tem uma ação provável através inibição do TNF α e comprovou-se que o Interferon tem de fato uma ação direta anti-fibrosante. Os resultados apontaram para a importância da via de administração e da dose das drogas testadas. Palavras-chave: *Capillaria hepatica*; fibrose septal hepática; drogas antifibrosantes; fibrose hepática.

ABSTRACT

THE *Capillaria hepatica* MODEL OF HEPATIC SEPTAL FIBROSIS: ITS UTILIZATION IN TESTS WITH ANTI-FIBROSIS DRUGS. MÁRCIA MARIA DE SOUZA. Several animal models have been utilized in attempts to understand the etiology and pathogenesis of hepatic fibrosis, and to assay anti-fibrosis drugs. Rats infected with the helminth *Capillaria hepatica* regularly develop progressive septal fibrosis of the liver, that may lead to cirrhosis, within a relatively short time. Due to such characteristics this model was considered adequate to be applied to assays with anti-fibrosis drugs, preventively as well as curatively. Also, by observing the anti-fibrosing effects of a particular drug one could speculate on the pathogenesis of septal fibrosis due to capillariasis in rats. The objectives of the present study were: to test the anti-fibrosis potential of some drugs, such as Pentoxifylline, Gadolinium Chloride, Vitamin A and Interferon- α and to evaluate the capacity of these drugs to prevent and/or to cure septal fibrosis of the liver. For this, forty adult Wistar rats were infected by gavage with 1,500 embryonated eggs of *C. hepatica*. Eight experimental groups were considered, which were submitted to different procedures with the above mentioned drugs, including a control group treated with saline only. The distribution, quality and quantity of fibrosis were evaluate by means of histologic, biochemical and morphometric techniques in liver samples taken by partial hepatectomy and by necropsy, representing different stages of the infection. Best results were obtained with Pentoxifylline, when administered intraperitoneally, but not when the intravenous route was used instead. Interferon- α also yielded good results when doses of 500,000 or 800,000 IU were used. Gadolinium Chloride had a moderate effect, but only preventively. The quantitative findings were submitted to statistical analysis through the Student-Newman-Keuls test, with the value of $p < 0.05$. The animal model of septal fibrosis appeared valuable for testing anti-fibrosis drugs. Prevention and cure of septal fibrosis could be adequately investigated with this model. Pentoxifylline, probably acting as a TNF-inhibitor, was the most effective drug. Interferon- α which may diminish fibrosis in viral hepatitis by primarily interfering with viral replication, exhibited in this study a direct anti-fibrosis action. Results also pointed to the importance of dose and route of administration for anti-fibrosis drugs. Key-words: *Capillaria hepatica*; Septal Fibrosis; Anti-Fibrosis Drugs; Hepatic Fibrosis .

1 INTRODUÇÃO

Desde o início do século, investigadores têm desenvolvido modelos na tentativa de compreender melhor a etiologia e a patogenia da fibrose hepática. Contudo, nenhum modelo animal tem conseguido reproduzir exatamente as doenças fibrosantes hepáticas, tal como aparece no homem (TSUKAMOTO et al., 1990). Um modelo ideal, a depender do tipo de fibrose, deve obedecer aos seguintes critérios (revisão IN TSUKAMOTO et al., 1990): reprodução dos achados morfológicos vistos na doença humana; gradual e discreta progressão das mudanças patológicas; alta reprodutibilidade e baixa mortalidade; reversibilidade e irreversibilidade das lesões fibróticas; desenvolvimento de seqüelas fisiopatológicas. Apesar de certas limitações inerentes ao modelo animal, modelos experimentais inovadores de fibrose hepática têm sido desenvolvidos e têm levado a importantes contribuições para a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelo acúmulo excessivo da matriz extracelular hepática. Os principais modelos são obtidos no rato através ligadura do ducto biliar, por injeções repetidas do tetracloreto de carbono, pela infecção com o *Schistosoma mansoni* no camundongo e, mais ultimamente, por injeções repetidas de soro de porco no rato. Há vários inconvenientes com estes modelos, principalmente relacionados com a imprevisibilidade e irregularidades no desenvolvimento da fibrose e a alta mortalidade que costuma ocorrer com alguns deles.

FERREIRA & ANDRADE (1993), observaram a formação de finos e longos septos fibrosos que dissecavam o parênquima hepático, criando um padrão trabeculado semelhante ao do fígado do porco em fígados de ratos infectados experimentalmente por *Capillaria hepatica*. Aparentemente, este tipo de fibrose não tem relação anatômica direta com as lesões causadas pela *C. hepatica*, pois

aparecem quando estas já estão em fase de involução e geralmente surgem em áreas bem distanciadas dos nódulos inflamatórios e encapsulados contendo os elementos parasitários. Além disso, em infecções experimentais produzidas em ratos pela *C. hepatica*, a fibrose septal hepática se desenvolve regularmente em 100% dos animais, com mínima mortalidade, 30 a 40 dias após a inoculação, tornando-se assim um excelente modelo para o estudo da patogênese da fibrose e, principalmente, para os testes com drogas anti-fibrosantes (FERREIRA & ANDRADE, 1993).

A fibrose septal, caracterizada por vários septos conectando veias centrais entre si e com espaços porta, representa um aspecto histológico comum em doenças crônicas do fígado. Em algumas delas, tais como cirrose septal incompleta (SCIOT et al., 1988), hepatite septal crônica (GERBER & VERNACE, 1974) e esquistossomose (ANDRADE, 1989), a fibrose septal pode ser um proeminente achado histológico. Na patogênese desta fibrose tem sido implicado o eixo formado por células de Kupffer/células perisinusoidais, o qual receberia estímulos principalmente através de um mecanismo de natureza imunológica (ANDRADE, 1991).

A fibrose hepática ocorre como uma consequência da acumulação de proteínas da matriz (particularmente os colágenos tipos I, III, V e VII) no fígado. Os conceitos correntes sobre a patogênese da fibrose hepática dão maior ênfase para a ativação das células perisinusoidais (ALCOLADO et al., 1997; ARTHUR, 1994) situados nos espaços de Disse (lipócitos hepáticos, células estreladas, células armazenadoras de gordura ou células de Ito) que, ativadas, assumiriam um fenótipo inicialmente de miofibroblasto, perdendo as gotículas de gordura citoplasmática, adquirindo um rico retículo endoplasmático e se engajando na síntese aumentada de

proteínas de matriz extracelular. Ao tempo que esse é um importante fator, existe forte evidência indicativa de que a fibrose hepática é um processo patológico dinâmico, em que a síntese é contrabalançada pela degradação da matriz, a qual pode também ter um papel dos mais importantes no resultado final do processo fibrosante (ARTHUR, 1994).

Experimentalmente, o modelo de fibrose septal do rato aparece durante injeções intraperitoneais repetidas de proteínas estranhas (LONGOCOPE, 1913; CAMPBELL, 1963; BLACKWELL, 1965). Isto tem sido considerado como uma forma de se produzir fibrose hepática por meio de fatores imunológicos (TSUKAMOTO, et al., 1990). Uma forma pura de fibrose septal, sem degeneração hépato-celular, inflamação ou regeneração, pode ser produzida em ratos por repetidas injeções intraperitoneais de soro de porco (PARONETTO & POPPER, 1966). BHUNCHET & KENJIRO (1992), após análise morfológica e imunohistoquímica de populações de células mesenquimais hepáticas, concluíram que não apenas as células estreladas perisinusoidais, mas também os fibroblastos intersticiais, incluindo aí as células de sustentação, têm papel substancial no desenvolvimento da fibrose septal hepática em ratos, induzida por soro de porco. Contudo, a reprodutibilidade deste tipo de fibrose ocorre em apenas 40 a 70% dos ratos injetados, o que aponta para a importância do fator individual e que prejudica o modelo para quando se quer, por exemplo, testar uma droga anti-fibrosante. As evidências obtidas *in vitro* sugerem que a produção da fibrose nesse modelo dependeria da ativação do eixo células de Kupffer/células perisinusoidais, que dispararia a cascata de estímulos que promoveriam a deposição de excesso de matriz nas zonas perisinusoidais. O estímulo deveria atingir as células alvo difusamente, mas a fibrose apenas persistiria na zona III do ácino por motivos ainda não muito bem conhecidos. Provavelmente a

baixa tensão de oxigênio nesta zona interferiria com o mecanismo de degradação do colágeno.

O envolvimento das células de perisinusoidais na fibrogênese hepática foi consistentemente visto nos modelos experimentais quando o estímulo fibrogênico foi de origem nutricional, hepatotóxico, ou imunológico. Os mecanismos moleculares e celulares de ativação da célula de Ito têm sido explorados em diferentes modelos. Os estudos *in vitro* têm destacado um papel saliente para a citocina TGF- β na fibrogênese hepática, mas, evidentemente, várias outras citocinas ditas fibrosantes (FSF, PDGF, TNF, etc) também participam (KOVACS, 1991).

Nos modelos da esquistossomose *in vivo*, tanto no camundongo como no rato, o TGF- β mostrou-se associado com a fibrogênese hepática (TSUKAMOTO et al., 1990).

Atualmente, uma das causas mais determinantes da fibrogênese hepática tem sido a ativação das células de Kupffer e células perisinusoidais (lipócitos), seja por metabólitos, provenientes da degradação alcoólica ou por antígenos solúveis, derivados de parasitos. A ativação das células perisinusoidais (para a forma semelhante a miofibroblasto) e fibroblastos, para um fenótipo proliferativo com produção de colágenos é desencadeada pela liberação de fatores fibrogênicos tais como fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e fator de transformação do crescimento-beta (TGF-beta) pelas células de Kupffer (SCHUPPAN, et al., 1995).

GUIDO et al., (1996), demonstraram em seu trabalho realizado com 44 pacientes com hepatite viral crônica que antes da terapia com interferon um grande número de células estreladas perisinusoidais expressavam alfa-actina de músculo liso em toda zona acinar. Após a suspensão do tratamento, houve uma significativa redução na expressão de alfa-actina de músculo liso demonstrada através de

biópsia, sugerindo um efeito específico do interferon nas células estreladas perisinusoidais.

Trabalhos realizados por MURIEL et al., (1994) e MURIEL (1996), demonstraram, respectivamente, um efeito hepatoprotetor do interferon alfa_{2b} (80.000 U.I/Kg/s.c/por 8 semanas) no modelo de intoxicação por tetracloreto de carbono, bem como redução do acúmulo do colágeno (100.000 U.I/animal) em modelo de cirrose biliar no rato. Contrariamente, FORT et al., (1996), avaliando o efeito do interferon alfa_{2c} sobre a fibrose hepática em um modelo de cirrose biliar no rato, não observaram redução da fibrose hepática, nem redução da pressão portal. Estudos clínicos apontam para uma ação antifibrosante do interferon alfa sem, contudo, uma dissociação do efeito antiviral (PILETTE et al., 1997). Em trabalho experimental, MURIEL, (1996), demonstrou após prolongada obstrução do ducto biliar no rato que os interferons possuem um efeito benéfico para o fígado e que este efeito não está relacionado às propriedades anti-virais, mas, provavelmente, está associado às suas propriedades anti-fibrosantes.

1.1 A *Capillaria hepatica*

A *Capillaria hepatica* é um tricuroídeo muito comum como parasito do rato e de outros roedores, tendo sido encontrado em numerosas espécies de mamíferos, como o esquilo, o porco-do-mato, a lebre, o cão, o gato e o macaco (MOURA, 1991).

A fêmea mede dois cm de comprimento e o macho apenas a metade. O verme adulto (*C. hepatica*) tem simetria bilateral, corpo cilíndrico, alongado, não segmentado, revestido por cutícula e desprovido de membros articulados. Possui um aparelho digestivo completo e cavidade geral sem revestimento epitelial. Apresenta também dimorfismo sexual (WRIGHT, 1961). Os ovos são muito parecidos com os

do tricocéfalos, com as mesmas cascas e rolhas polares, porém a membrana mais externa é atravessada por minúsculos canais que lhe emprestam aspecto estriado muito característico (McQUOWN, 1954). Medem 50 a 69µm de comprimento por cerca de 30µm de largura (MOURA, 1991). A infecção verdadeira ocorre com a ingestão pelo hospedeiro de ovos embrionados que eclodem no ceco, atravessam a mucosa, liberando larvas que migram pelo sistema porta para o fígado. Os vermes permanecem no fígado onde morrem pouco depois e liberam os seus ovos (FARHANG-AZAD et al., 1977). Os vermes em desintegração e os ovos liberados no parênquima hepático provocam reação inflamatória granulomatosa, proliferação de fibroblastos acompanhada de fibrose focal. A reação forma uma cápsula em torno dos ovos e dos vermes desintegrados (LUTTERMOSER, 1938). Os ovos só amadurecem fora do fígado, quando após a morte do hospedeiro e desintegração dos tecidos eles são liberados no meio ambiente. Portanto, *C. hepatica* pertence ao grupo dos parasitos transmitidos a partir do solo: geo-helmintos (MOURA, 1991).

A taxa de infecção dos ratos (*Rattus norvegicus*) é da ordem de 40 a 90%, em certas áreas (MOURA, 1991). CHIEFFI et al., (1981), necropsiaram 205 (191 *Rattus norvegicus* e 14 *Rattus rattus*) murídeos capturados vivos no município de São Paulo e verificaram que destes, 120 (59%) estavam parasitados por *Capillaria hepatica*.

A *C. hepatica* é um helminto de elevada prevalência em roedores domésticos e, excepcionalmente, afeta também o homem.

Segundo GALVÃO (1976), muitos casos não fatais passam despercebidos, uma vez que os ovos dos parasitos não aparecem nas fezes nos casos de infecção verdadeira sendo a única possibilidade de diagnóstico os testes imunológicos. Todavia, não existem dados adequados sobre a imunologia dessa parasitose. Na

tentativa de investigar a presença de anticorpos contra *C. hepatica* no soro de 500 crianças em Salvador, Bahia, GALVÃO (1979) sugeriu, em seu trabalho, que a *C. hepatica* pode se relacionar com o homem em nosso meio, uma vez que, das 500 crianças que tiveram seus soros testados através de reações de imunofluorescência, 9 tiveram um padrão peculiar e intenso, mesmo após elevada diluição do soro, contra estruturas de vermes adultos e seus ovos, representando provavelmente casos subclínicos da infecção verdadeira pela *C. hepatica*. Os demais casos, apresentaram padrões de fluorescência os mais variados, refletindo possivelmente infecções espúrias por *C. hepatica* ou reações cruzadas com antígenos os mais variados. Contudo, devido às baixas condições de higiene e moradia entre a população de baixa renda, existe a possibilidade de que a capilaríase hepática tenha um papel na patologia humana maior do que é comumente admitido (GALVÃO, 1981). O papel da *C. hepatica* segundo GALVÃO (1981), na nossa patologia regional, é inteiramente desconhecido, contudo parece ser de alguma importância.

Na Europa foram descritos pelo menos 11 casos de infecção hepática, assim como outra dúzia em diferentes países do mundo, inclusive um no Brasil e outro no México. Eram todos casos gravíssimos e quase todos terminaram com o falecimento do paciente (MOURA, 1991).

O quadro anatomopatológico produzido é o de uma hepatite parasitária, com formação de granulomas ao redor dos acúmulos ovulares. Não há descrição clara de fibrose septal nestes casos. No centro da lesão há, por vezes, focos de necrose. O fígado aumenta de tamanho, chegando a hepatomegalias volumosas, e fica doloroso (MOURA, 1991). KOHATSU et al., 1995, relataram um caso de lesão causada por infecção com *C. hepatica* revelada através de ultrasonografia, no segmento 6 do fígado, em uma mulher de 32 anos de idade em Okinawa, Japão. O exame de

laboratório mostrou leucocitose ($10.400/\text{mm}^3$) com 22% de eosinófilos e leve alteração dos testes de exploração da função hepática. O tumor foi removido cirurgicamente e se revelou como um “granuloma necrótico”, com infiltração eosinofílica ao redor do nematódeo em desintegração.

Clinicamente, nas infecções graves, há febre alta, anorexia, vômitos, extrema fraqueza e anemia, há leucocitose e eosinofilia intensas, podendo os eosinófilos chegar a 80% das células do sangue. Também se constata hipergamaglobulinemia (MOURA, 1991).

Os ovos do parasito não aparecem nas fezes dos pacientes. Nos casos acima referidos, o diagnóstico foi estabelecido por biópsia hepática ou necrópsia.

Entretanto, os ovos de *C. hepatica* têm sido encontrados nas fezes de pessoas sadias (no Panamá), indicando provavelmente a ingestão de fígado de animais parasitados (caça) e trânsito dos ovos imaturos do helminto pelo intestino, sem eclosão, devido à sua imaturidade quando nos tecidos dos roedores (MOURA, 1991).

É possível que a infecção com pequeno número de vermes transcorra com pouca sintomatologia e sem diagnóstico, até a cura espontânea (MOURA, 1991).

Supõe-se que os disseminadores de ovos do parasito, no ambiente humano, sejam os cães e gatos que caçam ratos infectados.

1.2 DROGAS ANTIFIBROGÊNICAS

A fibrose hepática é um processo multicelular complexo iniciado pela agressão celular, gerando distúrbios nos componentes da matriz extracelular. Um excessivo acúmulo de todos os constituintes da matriz extracelular, um aumento desproporcional nas várias moléculas colagênicas e não colagênicas da matriz, e a

preponderante deposição de elementos recém sintetizados da matriz no espaço de Disse (fibrose perisinusoidal) são marcas da fibrose hepática experimental e humana levando subseqüentemente à perda da estrutura anatômica do tecido (WINDMEIER & GRESSNER, 1996). No tecido cronicamente lesado e inflamado, as células perisinusoidais são “ativadas” para proliferar e se transdiferenciam fenotipicamente em miofibroblastos. A transdiferenciação (também chamada “transformação”) é atestada por mudanças morfológicas, como por exemplo: perda de gotículas de gordura contendo vitamina A, hipertrofia do retículo endoplasmático rugoso, expressão de alfa actina de músculo liso, e expressão de receptores de superfície para várias citocinas e fatores de crescimento (WINDMEIER & GRESSNER, 1996).

Estratégias terapêuticas para fibrose hepática tem a célula perisinusoidal como o tipo celular alvo. As drogas que exercem um efeito antiproliferativo ou que reduzem a transdiferenciação das células perisinusoidais a miofibroblastos e /ou inibem a síntese de componentes da matriz extracelular são de particular interesse terapêutico (WINDMEIER & GRESSNER, 1996).

1.2.1 Pentoxifilina

A pentoxifilina (Trental-laboratório Hoechst) também conhecida como oxipentifilina é um derivado da metilxantina, com potentes propriedades hemorreológicas. Estudos em indivíduos humanos e em animais têm mostrado que a terapia com pentoxifilina resulta em uma variedade de mudanças fisiológicas em nível celular, que podem ser importantes no tratamento de um grupo diverso de alterações orgânicas humanas. A cicatrização e os distúrbios do tecido conjuntivo podem responder a um aumento das colagenases e diminuição do colágeno, fibronectina, e à produção de glicosaminoglicanos, além da sensibilidade do

fibroblasto ao fator de necrose tumoral (TNF) que também fica diminuída (SAMLASKA & WINFIELD, 1994).

A pentoxifilina apresenta efeitos antiproliferativos e antifibrogênicos em fibroblastos dérmicos humanos. Em cultura de células semelhantes a miofibroblastos hepáticos humanos, o efeito da pentoxifilina foi testado na proliferação e síntese de colágeno e gelatinase A. Foi demonstrada uma marcada redução na proliferação celular, comprovada através de experimentos com autoradiografia nuclear e de crescimento celular. A pentoxifilina também afetou a síntese de colágeno, como medida por incorporação de hidroxiprolina tritiada (^3H) às proteínas da matriz. Esta redução se deveu a uma diminuição na produção de mRNA para pró-colágeno tipo I e tipo III, indicando um efeito pré-traducional. Contudo, não foi demonstrado o mesmo efeito sobre a atividade da gelatinase A liberada no meio de cultura. Esses achados apontam para uma possível aplicação terapêutica da pentoxifilina nas doenças hepáticas crônicas (PRÉAUX et al., 1997).

WINDMEIER & GRESSNER (1996), ao estudarem o efeito da pentoxifilina sobre as funções fibrogênicas das células perisinusoidais do rato e dos miofibroblastos, demonstraram que a ação inibitória da pentoxifilina é mais dose dependente para os miofibroblastos do que para as células perisinusoidais não ativadas. A pentoxifilina também retardou a transdiferenciação das células perisinusoidais para miofibroblasto alfa-actina positivo. Entretanto, a síntese de componentes da matriz extracelular como glicosaminoglicanos e fibronectina não foram afetados. Esses resultados demonstraram as propriedades antifibrogênicas desta droga na fibrogênese hepática experimental.

BERMAN & DUNCAN (1989) demonstraram que os fibroblastos cultivados na presença de pentoxifilina produziam duas vezes mais colagenase e diminuía a

quantidade de colágeno, glicosaminoglicanos, e fibronectina. Eles também demonstraram que a proliferação de fibroblastos induzida por IL-1 foi inibida pela adição de pentoxifilina.

PETERSON (1993), estudando o papel da pentoxifilina no tratamento da fibrose promovida por administração de baixas doses de fósforo amarelo em suínos, e que se estabelece após 10 a 12 semanas de tratamento, conseguiu demonstrar que esta droga é capaz de promover redução significativa nas concentrações de colágeno, além de prevenir alterações bioquímicas e histológicas associadas ao modelo.

PETERSON & NEUMEISTER (1996) demonstraram no modelo da fibrose hepática induzida pelo soro de porco, bem como através de ingestão de fósforo amarelo e na ligadura do ducto biliar, que o tratamento com pentoxifilina é capaz de promover redução no conteúdo de colágeno nas secções hepáticas e de reduzir a fibroproliferação no modelo com o soro de porco. Em contraste, no modelo de cirrose do rato induzida através de ligadura do ducto biliar, a pentoxifilina não é capaz de alterar a atividade fibroproliferativa e conseqüentemente não previne a fibrose hepática.

Experimentos envolvendo transplantes têm demonstrado a ação da pentoxifilina sobre as células de Kupffer através da diminuição da liberação de O_2^- e TNF minimizando desta forma, a lesão no processo de reperfusão (KOZAKI et al., 1995). DOHERTY et al., (1991), também demonstraram em seus experimentos a inibição na produção de TNF por pentoxifilina, a qual parece agir inibindo a produção de mRNA durante a síntese do colágeno (transcrição).

Esses estudos apontam para uma possibilidade de atuação da pentoxifilina como uma potente droga antifibrogênica em modelos experimentais.

1.2.2 Interferon - A (IFN- α)

Os interferons são citocinas pleiotrópicas que exibem múltiplos efeitos biológicos em células e tecidos, incluindo atividades antiproliferativas, antivirais e imunomodulatórias (PLATANIAS, 1995; LAUTA, 1995). Estas citocinas (interferons) representam a mais rápida defesa do organismo contra as infecções virais. A resposta natural às infecções virais está relacionada com a produção do interferon; a inibição aumenta a gravidade da infecção e o interferon tem demonstrado proteger animais de várias infecções virais. O interferon alfa pode ser produzido por células diversas, infectadas ou por vírus, e é continuamente liberado dentro da corrente sanguínea durante a infecção, diminuindo a sua produção com o tempo. A ação antiviral do interferon é induzida por interação com receptores específicos na superfície das células levando a tradução de proteínas anti-virais. Os interferons podem também aumentar a resposta imune por uma aumentada expressão de antígenos na superfície de linfócitos e por aumentar a atividade citotóxica das células “natural killer” (DIANZANI et al.,1990). O INF- α constitui atualmente o tratamento de referência das hepatites crônicas virais B e C, em razão de suas propriedades antivirais e imunomodulatórias. Alguns estudos sugerem a existência de um efeito antifibrosante do IFN- α , e estudos *in vitro* estão sendo realizados secundariamente afim de precisarem esta propriedade. Desta forma, MALLAT et al., (1995), demonstraram em culturas de miofibroblastos hepáticos humanos, que o interferon-gama e o alfa_{2c} , em menor grau, são capazes de inibir a proliferação das células e de reduzir a síntese de colágeno e de mRNA para os pró-colágenos de tipos I e III.

Experimentos realizados por MURIEL et al., (1994, 1996), em ratos,

demonstraram que o interferon alfa_{2b} administrado após indução de hepatopatia, promoveu um efeito hepatoprotetor no modelo de intoxicação por tetracloreto de carbono, e reduziu o acúmulo de colágeno em um modelo de cirrose biliar.

Evidências experimentais têm demonstrado que os interferons possuem ação antifibrogênica principalmente através de inibição da produção de colágeno (GOLDRING et al., 1986; CZAJA et al., 1989).

MORENO & MURIEL (1995), utilizando o modelo de ligadura do ducto biliar para indução de fibrose em ratos, verificaram o aumento seis vezes maior do conteúdo de colágeno, quando comparado com o fígado normal. Todavia, após administração de IFN- α (100.000 U.I./animal/dia; s.c.) esses valores foram revertidos a valores normais, assim como os marcadores bioquímicos avaliados, e também a arquitetura normal do fígado.

1.2.3 Vitamina A

A vitamina A é um composto ativo que pode ser introduzido na dieta dos animais para auxiliar no crescimento. Ela é especificamente necessária para a visão, reprodução, e à manutenção do epitélio diferenciado (BLANER, 1994). Contudo, este composto orgânico não pode ser sintetizado endogenamente pelo Home, sendo assim um nutriente essencial (BLOMHOFF et al., 1990). Esta vitamina, solúvel em gordura, regula a diferenciação e o crescimento de muitos tipos de células durante o desenvolvimento embrionário, assim como no tecido adulto (BLOMHOFF & WAKE, 1991).

O maior órgão do corpo responsável pelo estoque e metabolismo dos retinóides é o fígado. O termo retinóide, é um termo genérico para uma família de compostos químicos que abriga: os compostos que ocorrem naturalmente com

vitamina A ativa, e análogos de retinol sintéticos, com ou sem atividade biológica. Os retinóides são estocados como ésteres de retinil nas células estreladas perisinusoidais hepáticas ou células de Ito (BLOMHOFF et al., 1985(a); BLOMHOFF et al., 1985(b)), embora outros tecidos incluindo o tecido adiposo, pulmão e rim contenham significantes estoques de retinóides (BLANER, 1994).

Estudos morfológicos têm enfatizado que a lesão fibrótica do fígado envolve um acúmulo de matriz colagênica extracelular, transformação das células estreladas para um estado ativado (semelhante a miofibroblasto), e redução das gotículas de gordura e estoque do retinol hepático. *In vitro*, a transformação de células estreladas quiescentes para o estado ativado pode ser revertida pela adição de retinol ao meio de cultura. Este processo ocorre, pela inibição da proliferação e da produção de colágeno; e pelo aumento das gotículas de gordura e indução de longos processos celulares (DAVIS & VUCIC, 1989).

Experimentos realizados por SENOO & KENJIRO (1985), utilizando dois modelos para indução de fibrose hepática (CCl₄ e injeção de soro de porco) permitiram concluir, após tratamento dos animais com palmitato de retinil (vitamina A), que este composto é capaz de suprimir a fibrose hepática induzida tanto por tetracloreto de carbono, quanto por soro de porco, o que contradiz alguns trabalhos que creditam à vitamina A em excesso, a capacidade de produzir fibrose hepática. Para SENOO & KENJIRO (1985), a atividade secretora e formadora de colágeno pode ter sido suprimida porque muitas gotículas de gordura ocuparam o espaço do citoplasma, restringindo o desenvolvimento de outras organelas. Segundo DAVIS et al., (1987), o excesso de vitamina A na célula perisinusoidal pode representar um fator controlador em termos da maquinaria sintética para colágenos.

Experimentos realizados por SEIFERT et al., (1989), demonstraram que a

vitamina A aumentou a hepatotoxicidade do CCl_4 quando administrada antes ou durante o tratamento do CCl_4 , porém não foi hepatotóxica quando administrada após o tratamento do CCl_4 .

Outros estudos demonstram que altas doses de vitamina A estimulam a função da célula de Kupffer *in vivo*. As células de Kupffer, quando ativadas, produzem mediadores que induzem danos celulares (HENDRIKS et al., 1987). Dessa forma, o mecanismo, tanto de aumento da toxicidade quanto de diminuição da fibrose hepática, pode estar relacionado à ativação da célula de Kupffer. Isto pode explicar a toxicidade provocada pela vitamina A durante tratamento com CCl_4 , uma vez que as células de Kupffer podem ser ativadas, resultando numa aumentada produção de mediadores, levando a um aumento no dano celular. Como resultado, pode haver uma produção de mediadores de fase aguda, pelas células de Kupffer, em consequência tanto da ativação pela vitamina A quanto pela liberação de material necrótico no fígado lesado, aumentando os danos do parênquima. Entretanto, na ausência do CCl_4 , a ativação da célula de Kupffer por excesso de vitamina A pode ter um efeito benéfico por estimular a degradação do colágeno no septo fibroso (SEIFERT et al., 1989).

1.2.4 Cloreto de Gadolínio

O cloreto de gadolínio (GdCl_3), um metal raro tóxico para células de Kupffer, tem sido utilizado em diversos experimentos na tentativa de compreender o papel dessas células em diversas alterações do tecido hepático.

A administração intravenosa de cloreto de gadolínio, elimina as células de Kupffer grandes, com subsequente repovoamento (HARDONK & DIJKHUIS, 1993). LAZAR (1973) demonstrou que a injeção intravenosa de cloreto de gadolínio

bloqueia a fagocitose pelas células de Kupffer, sem efeito sobre as células endoteliais. KOUDSTAAL et al. (1991), mostrou que o bloqueio é promovido pela destruição das células de Kupffer grandes, sem efeito sobre os hepatócitos, células endoteliais e células perisinusoidais. Isto pode ser demonstrado, através do uso de marcadores de membrana como ED1(marcador lisossomal/endossomal) e ED2, e receptor galactosil ligado aos sítios (marcadores de membrana) e perda da atividade da peroxidase no retículo endoplasmático. As células expressando ED1, ED2 e receptor galactosil, parecem ser eliminadas dos sinusóides hepáticos dentro de 6 horas após a administração intravenosa de $GdCl_3$ (KOUDSTAAL et al.,1991).

Outro papel atribuído ao cloreto de gadolínio é o da inibição da endocitose mediada por receptor (pinocitose) da lactato desidrogenase, que é realizada pelas células de Kupffer e que pode ser um conveniente instrumento para se estudar as conseqüências da inibição seletiva da endocitose por células de Kupffer (BOUMA & SMIT, 1989).

MARTIN (1993) sugere que o $GdCl_3$ não elimina todas as células de Kupffer do fígado, mas, provavelmente, a maioria das células ED2+ e estimula o recrutamento de células extrahepáticas com características de monócitos.

Assim sendo, a fibrose septal do rato infectado por *C. hepatica*, pela sua regularidade, baixa mortalidade e pelo tempo relativamente curto de aparecimento, apareceu como um bom modelo para se testar algumas drogas tidas como anti-fibrogênicas, tanto preventiva, como curativamente.

2 OBJETIVOS

1- Testar com o modelo da fibrose septal associada à infecção pela *C. hepatica* no rato, o potencial antifibrosante das drogas: Pentoxifilina, Cloreto de Gadolínio, Vitamina A e Interferon- α , através de análise histológica, bioquímica e morfométrica;

2- Determinar, a partir das análises supra-citadas, a ação, tanto preventiva, como curativa, das referidas drogas sobre a fibrose septal.

3 JUSTIFICATIVA

Este trabalho procura utilizar um modelo original e especial de fibrose hepática induzido pela *C. hepatica* em ratos, para testar algumas drogas consideradas como tendo potencial anti-fibrogênico. Sendo o modelo muito facilmente reprodutível, com produção de fibrose septal hepática regular, uniforme e constante a partir de tempo relativamente curto (40 dias de infecção), com mínima mortalidade, considerou-se que o novo modelo poderá ter mais vantagens para os testes com drogas anti-fibrosantes, maiores que outros até aqui utilizados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO INÓCULO

Os ovos de *C. hepatica* foram obtidos de fígados de ratos de esgotos (*Rattus norvegicus*) capturados em diversos pontos da cidade do Salvador, BA e também de ratos da linhagem Wistar experimentalmente infectados. Os *R. norvegicus* forneceram o primeiro inóculo, o qual foi repassado em ratos Wistar, para se conseguir número suficiente de ovos para infecção de todos os animais do presente estudo. Os animais previamente infectados foram sacrificados pela inalação de éter etílico. Os fígados foram colocados em um liquidificador doméstico contendo 200ml de solução salina 0,85%, triturados e homogeneizados durante um minuto em baixa rotação. O homogeneizado foi colocado em cálice de sedimentação e foram feitas lavagens sucessivas de uma em uma hora com solução salina 0,85%, desprezando-se o sobrenadante após cada lavagem, até ficar completamente claro.

O sedimento contendo ovos não embrionados foi transferido para papel de filtro, colocado numa placa de Petri sobre gaze umedecida com formol a 0,5% e deixado em câmara úmida para incubação durante 30 dias à temperatura do laboratório (25-28⁰ C).

4.2 PREPARO DO INÓCULO

Após 30 dias de incubação, o sedimento foi raspado e examinado ao microscópio para comprovar se os ovos de *C. hepatica* estavam realmente embrionados. Após o exame, o papel de filtro contendo os ovos foi então colocado num liquidificador doméstico com 100ml de solução salina a 0,85% e submetido a trituração em baixa rotação, sendo homogeneizado por um minuto. Os ovos foram

então lavados sucessivamente em salina gelada, e uma alíquota equivalente a 1000µl foi retirada para contagem e ajuste do inóculo.

4.3 ANIMAIS

Foram utilizados 50 ratos da linhagem Wistar de ambos os sexos pesando entre (170-300g), procedentes do Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-FIOCRUZ e do Biotério Setorial do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde- UFBA, mantidos com dieta comercial padronizada (Nutival, Curitiba, PR) e água *ad libitum*.

4.4 INFECÇÃO

Os ratos foram infectados administrando-se por entubação 1000 ovos embrionados de *C. hepatica* a cada animal.

4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Estabeleceram-se oito grupos, compostos por cinco animais cada, todos infectados. Um deles não recebeu tratamento algum, exceto injeções de solução salina 0,85% (controles). Os demais foram submetidos a tratamento com diferentes drogas antifibrosantes.

4.5.1 Grupo I - Controle Infectado

Cinco ratos da linhagem Wistar, pesando entre 200-240g receberam duas injeções semanais de 1ml de solução salina a 0,85% por via subcutânea a partir do 25^o dia de infecção (o tratamento se estendeu até às vésperas do sacrifício). No 47^o dia de infecção, os animais foram submetidos a uma hepatectomia parcial e, dois meses após, foram sacrificados.

4.5.2 Grupo II - Interferon - α (500.000 U.I./dia/animal/sc.)

Cinco ratos pesando entre 170-250g receberam doses diárias a partir do 25^o dia de infecção, equivalentes a 500.000 U.I de Interferon- α preparadas a partir de uma solução estoque contendo 3000.000 U.I. de IFN- α não espécie-específico, que é um interferon recombinante híbrido, formado por um segmento N-terminal composto por aminoácidos de 1-60 do HuIFN- α B e por aminoácidos de 61-166 do HuIFN- α D (MEISTER, et al., 1986; HORISBERGER & DE STARITZKY, 1987) fornecida pela Unité 271 do INSERM, Lyon, França. Aos quarenta e cinco dias de infecção, os animais foram submetidos à primeira hepatectomia parcial, voltando a ser tratados 24h após a cirurgia. O tratamento se estendeu por mais quinze dias, sendo interrompido, para que os animais se submetessem à segunda hepatectomia parcial. O tratamento foi interrompido após a 2^a. intervenção cirúrgica e o sacrifício se deu um mês após a suspensão do mesmo.

4.5.3 Grupo III - Interferon- α (800.000 U.I./dia/animal/sc.)

Cinco ratos pesando entre 200-300g receberam doses diárias de 800.000 U.I. de IFN- α subcutaneamente, a partir do 25^o de infecção. O tratamento foi realizado seguindo a mesma metodologia descrita para o Grupo II, bem como os períodos para as hepatectomias e o sacrifício.

4.5.4 Grupo IV - Pentoxifilina - Via intraperitoneal

Cinco ratos pesando entre 230-260g receberam doses de 6mg diárias de Pentoxifilina (Trental, solução injetável da Hoechst) por via intraperitoneal a partir do 25^o dia de infecção. No 45^o dia, realizou-se a hepatectomia parcial e o tratamento

foi reiniciado apenas nos animais de n^{os} 2, 4 e 5. Os de n^{os} 1 e 3 foram acompanhados até o sacrifício. Os animais que continuaram a receber o tratamento, o foram, até o 96^o dia de infecção, sendo sacrificados uma semana após a suspensão do tratamento. Já os animais 1 e 3 que não continuaram a ser tratados após a hepatectomia parcial foram sacrificados dois meses após a suspensão do tratamento.

4.5.5 Grupo V - Pentoxifilina - Via intravenosa

Cinco ratos pesando entre 200-280g receberam doses de 6mg diárias de Pentoxifilina (Trental) por via intravenosa do 25^o ao 41^o dia de infecção. No 45^o dia, os animais foram submetidos a uma hepatectomia parcial. Após a mesma, o tratamento foi suspenso. O sacrifício ocorreu dois meses após a suspensão do tratamento.

4.5.6 Grupo VI - Cloreto de gadolínio - Tratamento preventivo.

Cinco ratos pesando entre 240-300g foram tratadas com Cloreto de gadolínio (Gadolinium (III) chloride-GdCl₃.6H₂O, FW 371.7, hexahydrate 99%, SIGMA-LOT 66H3405) de 3 em 3 dias na dose de 4mM por via intravenosa do 26^o ao 45^o dia de infecção. No 47^o dia, os animais foram submetidos a uma hepatectomia parcial e o tratamento foi suspenso. Dois meses após esta intervenção, os animais foram sacrificados.

4.5.7 Grupo VII - Cloreto de gadolínio - Tratamento curativo.

Cinco ratos pesando entre 190-340g foram biopsiados (hepatectomia

parcial) no 47^o dia de infecção. Ao 51^o dia, iniciou-se o tratamento com cloreto de gadolínio utilizando a mesma metodologia citada para o grupo anterior. O tratamento se estendeu até o 96^o dia da infecção, sendo então suspenso. Uma semana após a suspensão do tratamento, os animais foram sacrificados.

4.5.8 Grupo VIII - Vitamina A

Cinco ratos pesando entre 200-300g receberam por via subcutânea duas doses semanais de 50.000 U.I. de Vitamina A (AROVIT-Palmitato de retinol, solução oleosa injetável, 300.000 U.I., ROCHE) por duas semanas, perfazendo um total de 200.000 U.I. . Após este período, o tratamento foi suspenso. Após sete dias, foi realizada a hepatectomia parcial. Onze dias após a intervenção cirúrgica, reiniciou-se o tratamento administrando-se o dobro da dose inicial (100.000 U.I.) duas vezes por semana, por quatro semanas (um mês), sendo então suspenso o tratamento. Após vinte e três dias, os animais foram sacrificados.

4.5.9 Controles intactos tratados com Cloreto de gadolínio + tinta da China 10%

Para testar a eficácia do cloreto de gadolínio como droga eliminadora de células de Kupffer, cinco ratos normais, pesando entre 280-390g, foram injetados intravenosamente (injeção na veia da cauda) com Cloreto de gadolínio (4mM/animal). Dois ratos receberam uma única dose e 24h após receberam pela mesma via, 1ml de tinta da China a 10% sendo sacrificados 24h após. Os demais receberam três doses (3 em 3 dias) na mesma concentração de cloreto de gadolínio e, 24 h depois, administrou-se a solução de tinta da China a 10%, sacrificando-se 24h mais tarde.

4.6 HEPATECTOMIA PARCIAL

Os animais foram anestesiados com éter etílico, afixados a uma placa de contenção e, após assepsia, procedeu-se a abertura parcial do abdômen, realizando uma incisão de aproximadamente dois centímetros de comprimento, propiciando, assim, a exposição de um dos lobos hepáticos. Em seguida, o lobo foi ligado, utilizando-se um fio de algodão, seguido de secção. Após a secção, a amostra foi pesada, e um fragmento foi recortado e tomado o seu peso para posterior dosagem da hidroxiprolina. O fragmento maior foi cortado em finas fatias, fixado em líquido de Bouin e, após 5 horas, transferido para álcool a 70%. O fragmento menor, não fixado, foi acondicionado em gaze previamente umedecida com solução salina 0,85% e armazenado no refrigerador até o momento da dosagem bioquímica.

4.7 SACRIFÍCIO

Os animais foram anestesiados com éter etílico, afixados a uma placa de contenção e, após assepsia, realizou-se uma incisão da porção inferior do abdômen até o tórax, expondo desta forma todos os órgãos. Procedeu-se a exanguinação através de secção do plexo axilar, e em seguida, retirou-se o fígado, que foi examinado macroscopicamente, e anotou-se a sua aparência, avaliando-se semiquantitativamente a intensidade da infecção. O órgão foi pesado integralmente e, logo a seguir, tomou-se um fragmento de um dos lobos e pesou-se para posterior avaliação do conteúdo de hidroxiprolina. Após pesagem, o fragmento foi acondicionado em gaze previamente umedecida em solução salina a 0,85% e armazenado em refrigerador até o momento da dosagem. Um dos lóbulos do fígado foi fixado em líquido de Bouin, seguindo a metodologia já descrita, e outro, em formol Millonig (pH 7.4). Após a fixação, as amostras de fígado foram encaminhadas

para o processamento histológico de rotina.

4.8 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Após a fixação, as amostras de fígado foram desidratadas, diafanizadas e posteriormente incluídas em parafina histológica. Os blocos foram seccionados e os cortes obtidos com 5 μ m (micrômetros) de espessura foram submetidos aos seguintes métodos de coloração:

- Hematoxilina e Eosina
- Sírius Vermelho (Picrosírius-red), para fibras colágenas.

4.9 TÉCNICA BIOQUÍMICA - DOSAGEM DA HIDROXIPROLINA

O método utilizado para a dosagem da hidroxiprolina foi o preconizado por BERGMAN & LOXLEY, 1963. Resumidamente, os procedimentos consistiram no seguinte:

PREPARO DA AMOSTRA

Amostras de fígado pesando entre 200-350mg preservadas como descrito nos itens 6 e 7, foram acondicionadas em tubos de vidro com 5ml de ácido clorídrico 6N, tampados, e postos para hidrolisar por 18h a 110⁰C em estufa. Ao hidrolisado, adicionou-se 5ml de água destilada, filtrou-se e deixou-se sedimentar.

NEUTRALIZAÇÃO -Tomou-se 2ml da solução filtrada, adicionou-se 500 μ l de hidróxido de sódio a 10N para a neutralização da amostra e, em seguida, acrescentou-se uma gota de fenolftaleína (que atua como indicador de pH). Após a neutralização, as amostras foram levemente acidificadas com ácido clorídrico 3N e o volume final ajustado para 4ml com água destilada.

COLORAÇÃO - No interior de tubos testes transparentes, colocou-se uma alíquota de

200µl das amostras neutralizadas, acrescentou-se 400µl de isopropanol e agitou-se bem. Em seguida, promoveu-se a oxidação das amostras incubando-as por quatro minutos com a solução A (uma parte da solução de Cloramina T, com quatro partes de tampão acetato-citrato). Sob agitação constante, adicionou-se 2,5ml da solução B (reagente de Ehrlich + isopropanol) agitando ininterruptamente. Os tubos foram incubados a 60^o C por 25 minutos em banho-maria. Após os 25 minutos retirou-se os tubos, colocando-os em uma recipiente com água para resfriar. Posteriormente, procedeu-se a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro (Hitachi) no comprimento de onda de 558nm (absorbância). Os dados obtidos durante a leitura, foram transferidos e analisados em programa computadorizado (HYBOBII), onde se avaliou em micromol por grama de tecido a quantidade de hidroxiprolina nele contida.

ANÁLISE ESTATÍSTICA - A análise foi realizada utilizando os dados obtidos da mensuração feita pelo programa computadorizado HYBOBII em micrograma/mol, que foi transposto e avaliado através do método One-way ANOVA usando o Student-Newman-Keuls.

4.10 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA MATRIZ CONJUNTIVA

Para quantificar a matriz conjuntiva presente nas secções obtidas de fígados de ratos Wistar infectados por *Capillaria hepatica* e com fibrose septal, procedeu-se à análise dos casos referentes aos grupos experimentais previamente estabelecidos. Para cada caso, foi avaliada uma área seccional de $17,01 \times 10^6 \mu\text{m}^2$. Empregou-se a objetiva de 4x (Microscópio Leica Microstar IV) em 9 campos microscópicos, selecionados aleatoriamente, de preparações histológicas de biópsias hepáticas.

Foram utilizadas secções de fígado de 5µm de espessura, corados com Sírius vermelho (JUNQUEIRA et al., 1979), para estudo morfométrico semi-automático, utilizando-se o Sistema de Análise de Imagens Leica Quantimet Q500MC (Leica Cambridge, Inglaterra) como descrito anteriormente (COUTINHO, et al., 1997; FONSECA JUNIOR, 1998).

4.10.1 Análise estatística

Os resultados foram expressados em micrômetros quadrados. Calculou-se a média e o desvio padrão tanto da área ocupada pela fibrose, quanto da percentagem ocupada pela mesma em relação a área seccional total analisada, em todos os casos. A análise subsequente comparou estatisticamente as médias obtidas para cada animal de cada grupo com as médias para cada animal do grupo controle. Para isto, utilizou-se análise de variância com um fator (one-way ANOVA) seguida do teste de Student-Newman-Keuls para a comparação entre os grupos.

4.11 AVALIAÇÃO DO GRAU DE FIBROSE

A fibrose foi avaliada através da análise microscópica (semi-quantitativa) de lâminas coradas pelo Sírius vermelho, às cegas, por dois investigadores. Foram estabelecidos os seguintes critérios para a expressão do grau da fibrose: uma cruz (+) para a fibrose de grau discreto, duas cruzes (++) para a de grau moderado, três cruzes (+++) para a de grau intenso e 0 (zero) quando ausente. A Prancha 1, ilustra os respectivos graus considerados. Após análise de todo o material referente aos grupos experimentais, procedeu-se à decodificação dos casos analisados e avaliação da efetividade dos tratamentos em cada grupo.

5 RESULTADOS

5.1 ACHADOS HISTOLÓGICOS

As lesões parasitárias no 45^o dia de infecção, exibiam nítida fibrose, que formava uma cápsula na periferia do nódulo inflamatório contendo vermes desintegrados e ovos imaturos (PRANCHA 2-III). A cápsula fibrosa que se formava em torno dos restos parasitários exibia intenso infiltrado inflamatório, predominantemente mononuclear, com alguns macrófagos, linfócitos e fibroblastos, bem como alguns polimorfonucleares. Alguns focos de necrose, por vezes com hemorragia, apareciam de mistura com os parasitos desintegrados (PRANCHA 2-I). Além destas lesões focais, o restante do tecido hepático se apresentava dentro dos limites da normalidade, exceto pela presença da fibrose septal e por um discreto infiltrado mononuclear em alguns espaços porta. A fibrose septal dava ao parênquima um aspecto trabeculado.

Os septos fibrosos se estendiam por todo o parênquima conectando veias centrais entre si, ao longo da zona III do ácino, mas havia conexão também entre os espaços porta e a veia central e mesmo entre espaços porta entre si, nos casos mais avançados. Observaram-se alguns septos mais finos que penetravam o parênquima e se terminavam abruptamente no interior do mesmo (septos incompletos). Geralmente estes septos não exibiam presença de células inflamatórias.

No 107^o dia de infecção (três meses), as lesões em torno dos parasitos, apresentavam-se bem mais organizadas, compactas e pequenas. O infiltrado inflamatório formado por células mono e polimorfonucleares tornou-se menos intenso. Observou-se um pouco de fibrose e células inflamatórias circunscrevendo

os vasos. Os septos, apresentavam-se em maior número que no primeiro mês de infecção. Alguns septos tinham a aparência mais frouxa e espiralada, quando corados pelo Síríus vermelho. Outros aparentavam-se mais densos, com várias conexões colaterais à maior distância. Observaram-se também, septos bastante pequenos, espalhados pelo parênquima, principalmente nos grupos tratados, dando a impressão de que houve um bloqueio do estímulo à sua expansão pelo tecido hepático (PRANCHA 3-II).

Uma densa fibrose podia ser observada envolvendo grupos de ovos, a maioria bem conservados, assim como células inflamatórias mononucleares. Regiões necróticas também puderam ser notadas nas proximidades das lesões parasitárias e estas, nas lesões mais antigas, exibiam freqüentemente calcificação (grumos escuros fortemente basófilos) (PRANCHA 2-II). Mais tarde, a reação em torno dos parasitos era predominantemente macrofágica, com algumas células claras, finamente vacuoladas, identificadas como células epitelióides, bem como algumas células gigantes multinucleadas. A reação se tornava, pois, de tipo granulomatoso.

Nas secções coradas pelo Síríus vermelho, observou-se extensa malha de fibras em torno dos ovos, na sua maioria íntegros, além da fibrose septal espalhada por todo o parênquima que, em certos pontos, adensava-se (pela união de vários septos) em regiões confluentes. Alguns septos apresentavam espessura variada, formados por tecido conjuntivo frouxo e por tecido conjuntivo denso.

De forma geral, a estrutura acinar hepática manteve-se preservada não perdendo a sua organização peculiar frente à infecção por *Capiliaria hepatica*, embora nos casos com fibrose septal mais pronunciada pudesse se observar a formação de nódulos de regeneração (cirrose hepática).

5.2 AVALIAÇÃO DO GRAU DE FIBROSE

Como apresentado nas tabelas a seguir (TABELA 1 a 8), o grau da fibrose variou nos grupos tratados (TABELA 2 a 8) quando comparados ao Controle (Tabela 1) de acordo com o período analisado. Se na hepatectomia parcial, onde os animais ainda estavam sendo tratados ou se no momento do sacrifício, onde o tratamento já havia sido suspenso. Após a hepatectomia parcial, excetuando os grupos tratados com Cloreto de gadolínio (TABELA 8), Vitamina A (TABELA 6) e com Pentoxifilina pela via intravenosa (TABELA 5), houve uma tendência à diminuição da fibrose com a continuidade do tratamento. Os grupos mais expressivos foram o da Pentoxifilina (por via intraperitoneal/ TABELA 4/ PRANCHA 3-IV), e o do Interferon- α , tanto o grupo tratado com 500.000 U.I. (TABELA 2/ PRANCHA 3-III) onde a fibrose se apresentou mais leve que no controle, como o tratado com 800.000 U.I. (TABELA 3/PRANCHA 3-I e II) onde a fibrose de uma forma geral foi quase inexistente. Porém, nos demais grupos experimentais, a tendência da fibrose foi piorar após a suspensão do tratamento. Contudo, pode-se notar que o aumento da intensidade da fibrose septal nos grupos em que o tratamento foi ineficaz (Tabelas 5, 6, 7 e 8), não foi numa proporção tão intensa como aquela observada no grupo controle (Tabela 1), quando comparados durante o mesmo período da infecção.

TABELA 1

Avaliação histológica semi-quantitativa do grau de fibrose septal em ratos Wistar infectados com *Capiliaria hepatica* e tratados com solução salina 0,85% por via subcutânea.

Animais	Hepatectomia parcial	Sacrifício
1	+++	+++
2	+++	+++
3	+++	+++
4	+++	+++
5	+++	+++

Intensidade da fibrose: + discreta; ++ moderada; +++ intensa

TABELA 2

Avaliação histológica semi-quantitativa do grau de fibrose septal em ratos Wistar infectados com *Capiliaria hepatica* e tratados com interferon- α (500.000 U.I) por via subcutânea.

Animais	1 ^a hepatectomia parcial	2 ^a hepatectomia parcial	Sacrifício
1	+++	++	++
2	++	+++	+
3	++	+++	++
5	0	0	0

Intensidade da fibrose: + discreta; ++ moderada; +++ intensa; 0= ausente

TABELA 3

Avaliação histológica semi-quantitativa do grau de fibrose septal em ratos Wistar infectados com *Capillaria hepatica* e tratados com interferon- α (800.000 U.I) por via subcutânea.

Animais	1ª hepatectomia parcial	2ª hepatectomia parcial	Sacrifício
1	++	++	+
2	0	+	+
3	+	+	+
4	+	++	+
5	++	0	+

Intensidade da fibrose: + discreta; ++ moderada; +++ intensa; 0= ausente

TABELA 4

Avaliação histológica semi-quantitativa do grau de fibrose septal em ratos Wistar infectados com *Capillaria hepatica* e tratados com pentoxifilina por via intraperitoneal.

Animais	Hepatectomia parcial	Sacrifício
1	+++	++
2	+	+
3	++	+++
4	+++	+
5	+	0

Intensidade da fibrose: + discreta; ++ moderada; +++ intensa; 0= ausente

TABELA 5

Avaliação histológica semi-quantitativa do grau de fibrose septal em ratos Wistar infectados com *Capilaria hepatica* e tratados com pentoxifilina por via intravenosa.

Animais	Hepatectomia parcial	Sacrifício
1	++	+
2	+++	+++
3	+++	+++
4	+++	+++
5	+++	+++

Intensidade da fibrose: + discreta; ++ moderada; +++ intensa.

TABELA 6

Avaliação histológica semi-quantitativa do grau de fibrose septal em ratos Wistar infectados com *Capillaria hepatica* e tratados com vitamina A por via subcutânea.

Animais	Hepatectomia parcial	Sacrifício
1	+++	+
2	+++	+++
3	+++	+++
4	+++	+++
5	+++	+++

Intensidade da fibrose: + discreta; ++ moderada; +++ intensa.

TABELA 7

Avaliação histológica semi-quantitativa do grau de fibrose septal em ratos Wistar infectados com *Capillaria hepatica* e tratados preventivamente com cloreto de gadolínio por via intravenosa.

Animais	Hepatectomia parcial	Sacrifício
1	+++	+++
2	++	++
3	+++	+++
4	+++	++
5	+++	++

Intensidade da fibrose: + discreta; ++ moderada; +++ intensa.

TABELA 8

Avaliação histológica semi-quantitativa do grau de fibrose septal em ratos Wistar infectados com *Capillaria hepatica* e tratados curativamente com cloreto de gadolínio por via intravenosa.

Animais	Hepatectomia parcial	Sacrifício
1	+++	+++
2	+	++
3	++	++
4	+++	+++

Intensidade da fibrose: + discreta; ++ moderada; +++ intensa.

5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CLORETO DE GADOLÍNIO SOBRE AS CÉLULAS DE KUPFFER

Os cinco ratos Wistar tratados com cloreto de gadolínio (4mM/animal) e que foram injetados com tinta da China a 10%, foram sacrificados, dois deles, 48h após o início do tratamento. Os três restantes, receberam três doses de (3 em 3 dias) e posteriormente foram sacrificados. Os fígados foram seccionados e fixados em líquido de Bouin. Após o processamento histológico habitual, realização da coloração com hematoxilina e eosina, e observação microscópica (Fig.1), constatou-se que o número e distribuição das células que concentraram o carvão no seu citoplasma (células de Kupffer) não mostraram qualquer diferença quando os animais tratados pelo cloreto de gadolínio foram comparados com os respectivos controles.

5.4 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE HIDROXIPROLINA

A comparação das médias do teor de hidroxiprolina dos fígados entre ratos infectados com *Capilaria hepatica* e tratados, com relação ao controle (TABELA 9), demonstrou diferenças significantes favoráveis aos grupos tratados com Pentoxifilina (pela via intraperitoneal), Cloreto de gadolínio (tratamento preventivo) e Interferon- α (500.000 e 800.000 U.I.), com $p < 0,05$.

TABELA 9

Comparação entre as médias obtidas a partir da dosagem de hidroxiprolina hepática nos diversos grupos experimentais.

Grupo (n)	Média ($\mu\text{mol/g}$)/ Desvio padrão	Tratamento
1 (n=5)	8,84 \pm 1,91 **	Solução salina 0,85%
2 (n=4)	4,13 \pm 1,38*	IFN- α (500.000 U.I.)
3 (n=5)	3,95 \pm 0,73*	IFN- α (800.000 U.I.)
4 (n=5)	5,69 \pm 0,49*	Pentoxifilina (via intraperitoneal)
5 (n=5)	7,85 \pm 1,54	Pentoxifilina (via intravenosa)
6 (n=5)	7,08 \pm 0,97	Vitamina A
7(n=5)	6,41 \pm 0,89*	Cloreto de gadolínio (preventivo)
8 (n=4)	7,80 \pm 2,63	Cloreto de gadolínio (curativo)

* Diferença significativa em relação ao grupo controle**, com $p < 0,05$ avaliada pelo teste de Student-Newman-Keuls.

5.5 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO CONTEÚDO DE COLÁGENO HEPÁTICO

A comparação das médias das áreas seccionais representativas da matriz conjuntiva dos grupos tratados com relação ao controle (TABELAS 10 e 11), demonstrou diferenças estatisticamente significantes com $p < 0,05$ para os grupos tratados com Pentoxifilina (intraperitonealmente), e Interferon- α (500.000 e 800.000 U.I.).

TABELA 10

Comparação entre as médias obtidas a partir da análise morfométrica de secções hepáticas coradas com Sírius-vermelho (durante a hepatectomia parcial) nos diversos grupos experimentais.

Grupo (n)	Média (μm^2)/ Desvio padrão	Tratamento
1 (n=5)	$19,28 \times 10^4 \pm 2,17 \times 10^4$ **	Solução salina 0,85%
2(n=4)	$10,31 \times 10^4 \pm 3,59 \times 10^4$ *	IFN- α (500.000 U.I.)
3 (n=5)	$5,69 \times 10^4 \pm 2,74 \times 10^4$ *	IFN- α (800.000 U.I.)
4 (n=5)	$6,42 \times 10^4 \pm 6,65 \times 10^4$ *	Pentoxifilina (via intraperitoneal)
5 (n=5)	$16,94 \times 10^4 \pm 6,76 \times 10^4$	Pentoxifilina (via intravenosa)
6 (n=5)	$12,50 \times 10^4 \pm 3,87 \times 10^4$	Vitamina A
7 (n=5)	$14,68 \times 10^4 \pm 2,69 \times 10^4$	Cloreto de gadolínio (preventivo)

* Diferença significativa em relação ao grupo controle**, com $p < 0,05$ avaliada pelo teste de Student-Newman-Keuls.

TABELA 11

Comparação entre as médias dos grupos controle e tratado com cloreto de gadolínio (curativo), obtidas a partir da análise morfométrica de secções hepáticas coradas com Sírius-vermelho, quando sacrificados .

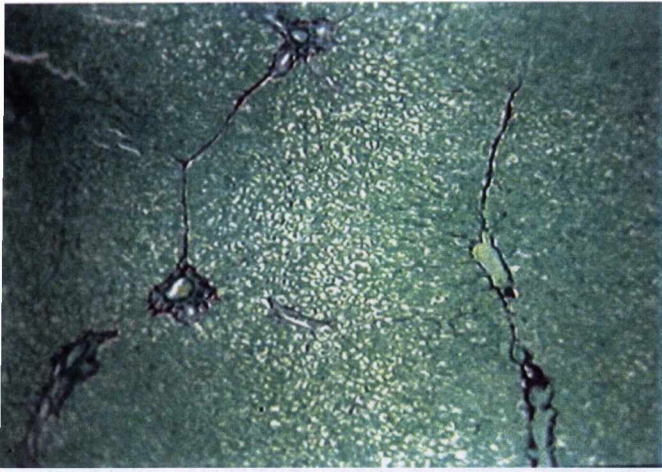
Grupo (n)	Média (μm^2)/ Desvio padrão	Tratamento
1 (n=5)	$32,24 \times 10^4 \pm 8,94 \times 10^4$	Solução salina 0,85%
8 (n=4)	$24,84 \times 10^4 \pm 4,59 \times 10^4$	Cloreto de gadolínio (curativo)

Teste t para amostras independentes.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

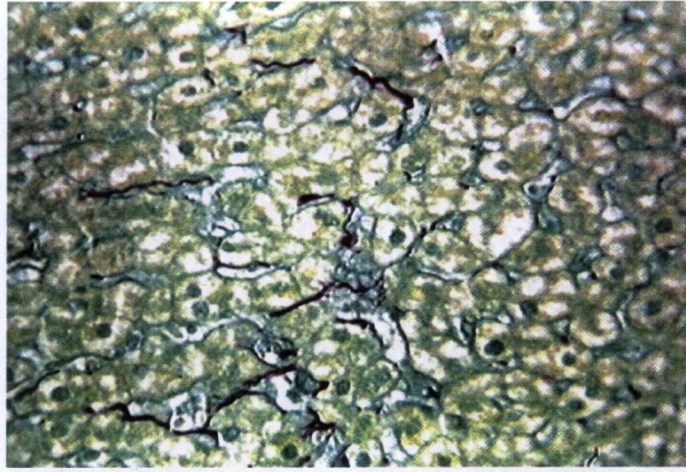
PRANCHA 1

Os diferentes graus histológicos da fibrose septal hepática observados em ratos infectados pela *Capillaria hepatica*.
(Método do Picro-sírius vermelho)



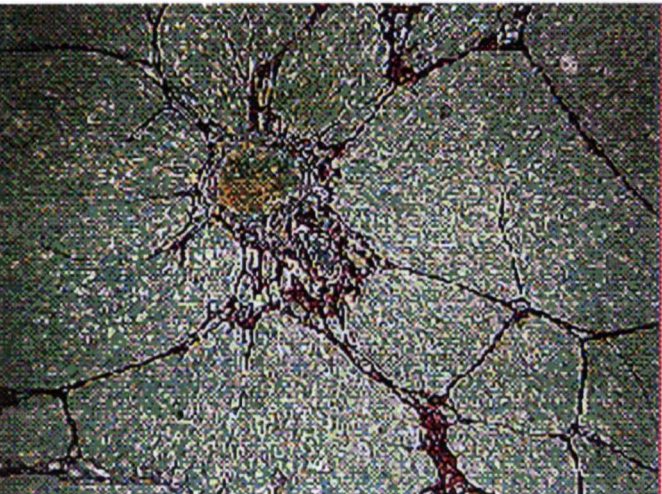
Grau I - 120 X

As lesões causadas pela *Capillaria hepatica* no fígado do rato, (Método do Picro-sírius vermelho)

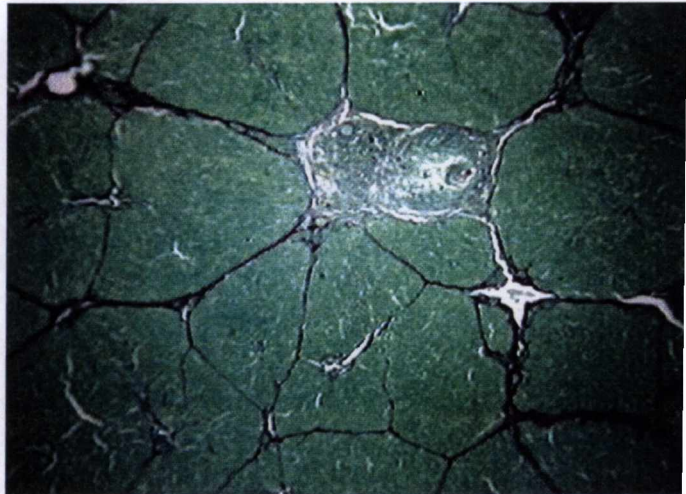


Grau I - 200 X

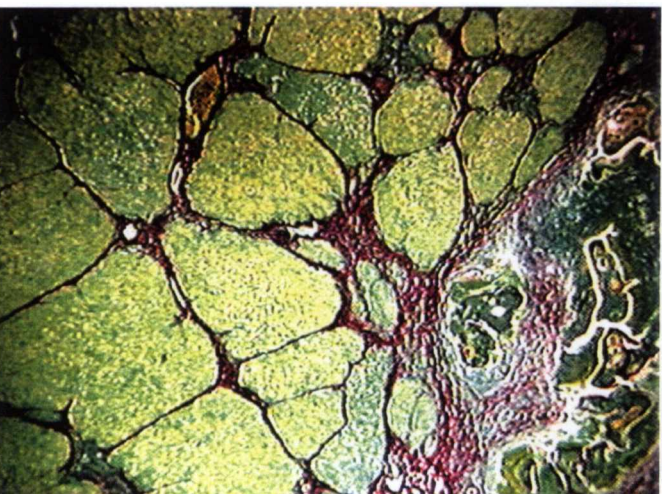
As lesões causadas pela *Capillaria hepatica* no fígado do rato, (Método do Picro-sírius vermelho)



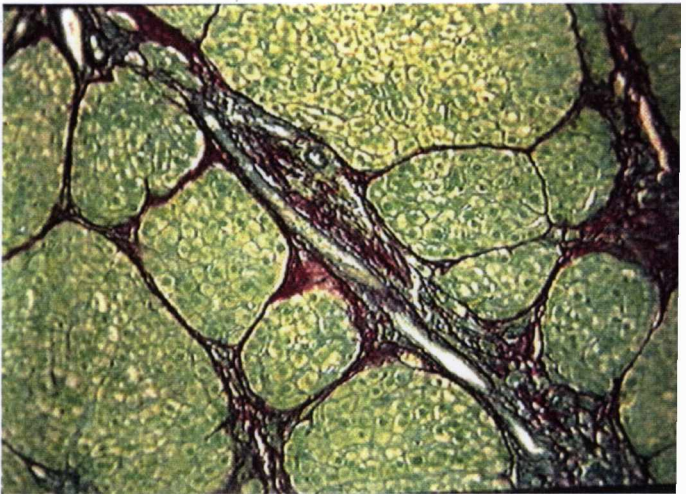
Grau II - 150 X



Grau II - 150 X



Grau III - 150 X



Grau III - 200 X

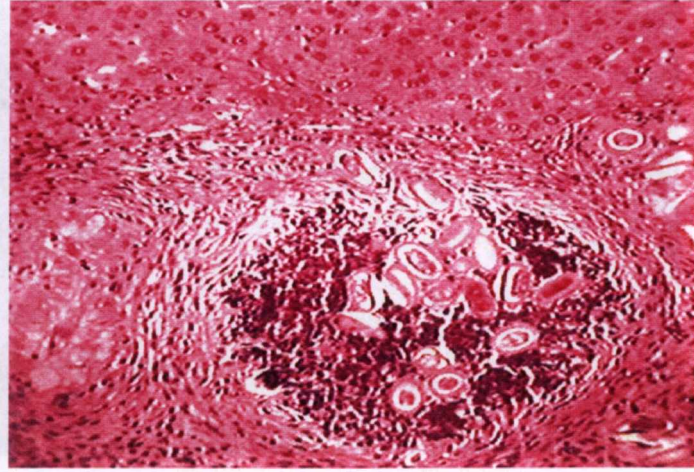
As lesões causadas pela *Capillaria hepatica* no fígado do rato, (Método do Picro-sírius vermelho)

PRANCHA 2

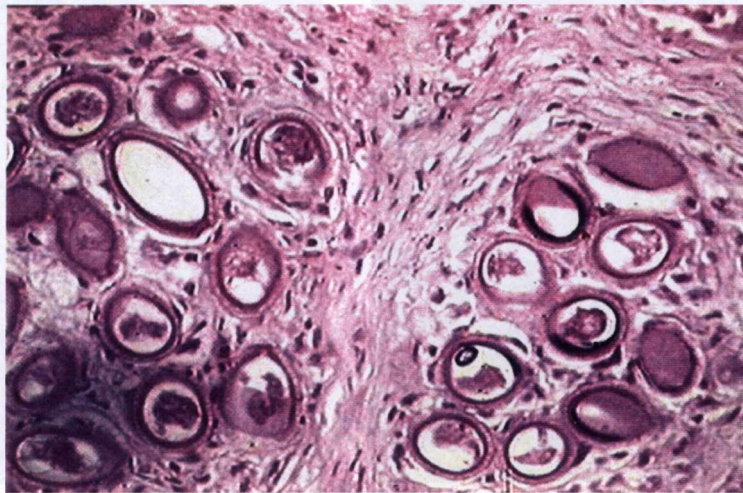
As lesões causadas diretamente pela *Capillaria hepatica* no fígado do rato.
(Hematoxilina-Eosina)



I - Vermes necróticos circundados por forte reação fibrosa, no interior da qual estão espalhados numerosos ovos do helminto. 120 X



II - Vermes e ovos aparecem no centro de uma lesão encapsulante, no centro da qual aparecem grumos de material fortemente basófilo (foco de calcificação). 120 X.



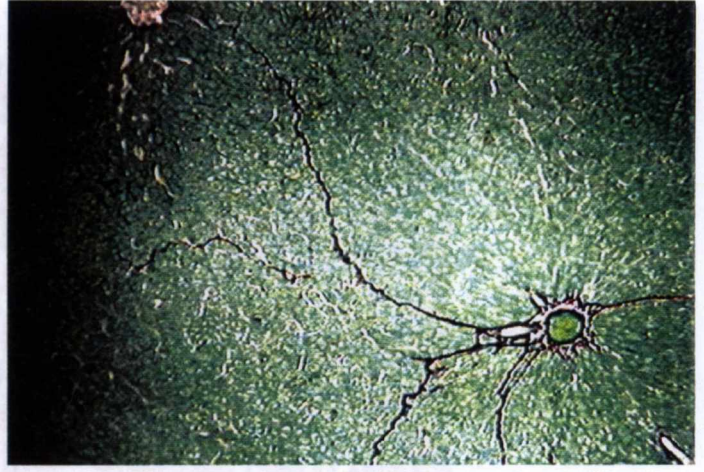
III - Ovos imaturos e em desintegração depositados no seio de tecido fibroso densamente colagenizado. 300 X.

PRANCHA 3

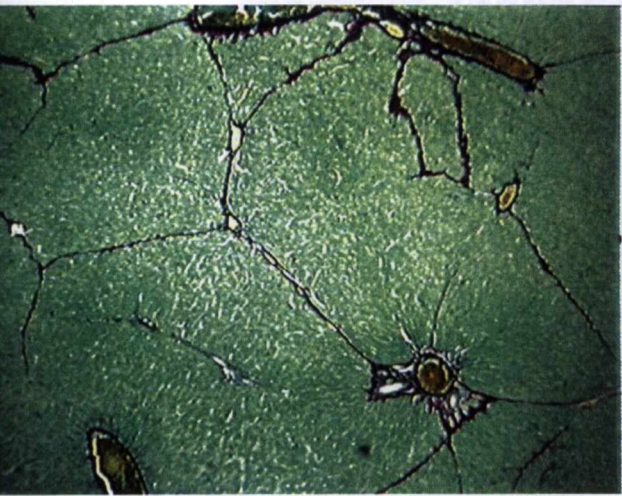
Efeitos do tratamento anti-fibrosante sobre a fibrose septal do rato infectado pela *Capillaria hepatica*.
(Método do Picro-sírius vermelho)



I - Mesmo em torno de lesão parasitária grande a fibrose septal aparece bem discreta. Interferon, 800.000 UI. 120 X.



II - Tratamento com Interferon, 800.000 UI. 120 X.



III - A fibrose é leve, mas um pouco mais intensa quando a dose de Interferon foi diminuída para 500.000 UI. 120 X



IV - Fibrose apenas discreta vista após tratamento com Pentoxifilina intraperitoneal. 120 X.

8 DISCUSSÃO

No presente trabalho, analisou-se o modelo da fibrose septal causada por *Casiana* em ratos. Para isso, foram utilizadas algumas drogas e o modelo de fibrose hepática. O modelo utilizado, baseado em estudos de outros autores, tanto na fase inicial quanto na fase avançada, para verificar a ação das drogas, foi o modelo de fibrose hepática. O mecanismo de ação das drogas foi estudado em diferentes grupos de ratos. Os resultados foram distintos da fibrose normal. Além disso, a presença de células marcadas em cada animal foi observada diretamente no fígado. A cinética de distribuição do carvão coloidal ao longo do tempo foi estudada em ratos. As células descritas por FERREIRA (1995) são semelhantes às descritas por FERREIRA & MORENO (1995). A distribuição do carvão coloidal é interessante devido não só à sua distribuição no parênquima, mas, principalmente, quanto à sua patogenicidade que ainda é desconhecida.

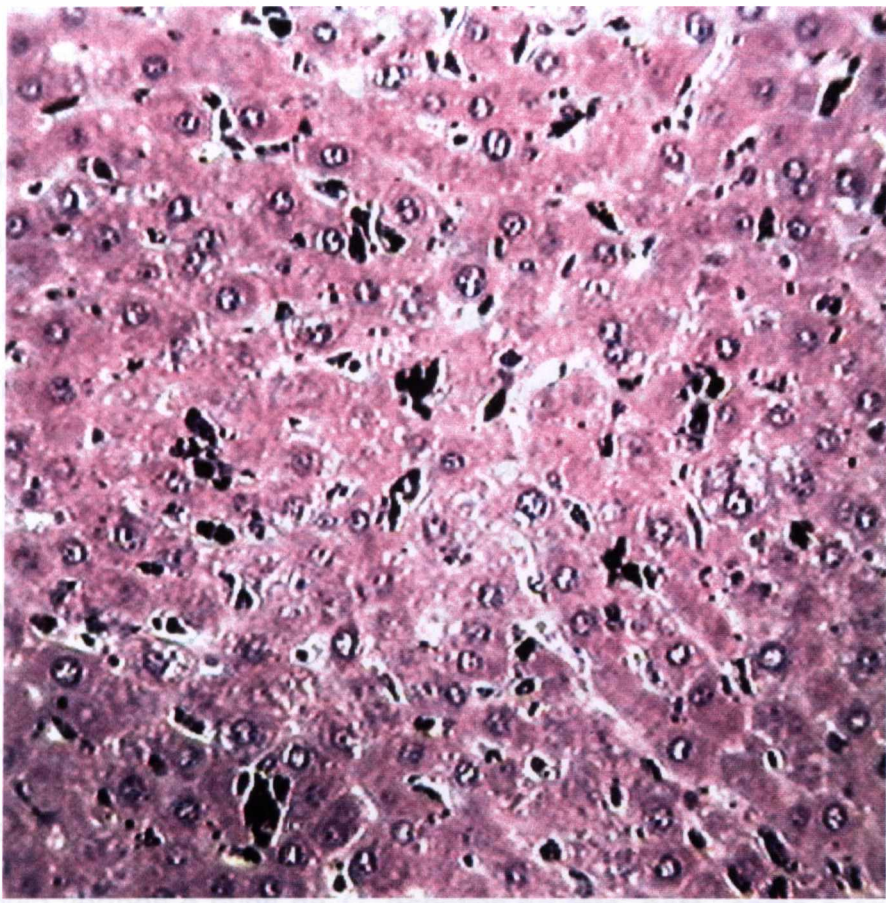


Fig. 1 - Fígado após injeção venosa (veia da cauda) de carvão coloidal, mostrando células marcadas (granulopenia) nos sinusóides hepáticos, semelhante ao que pode ser observado num fígado normal. O animal (rato) não foi infectado, mas foi tratado com 3 doses de cloreto de gadolínio, de 3 em 3 dias. Hematoxilina-eosina, 150 X.

Em experimento preliminar realizado em 2005 no Laboratório (dados não publicados) utilizando o modelo de *C. hepatica* para o estudo da fibrose septal, testou-se o interferon-alfa seguindo a metodologia (dose) descrita no trabalho de MORENO & MURIEL (1995), e constatou-se após análise morfológica e bioquímica (dosagem de hidroxiprolina) das seções de fígados previamente fixadas, que não

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, utilizou-se o modelo da fibrose septal causada por *Capillaria hepatica* numa tentativa de se fazer avaliação acerca de algumas drogas tidas como anti-fibrosantes. Dado às características já mencionadas do modelo utilizado, pretendeu-se testar não só o modelo, como as referidas drogas, tanto na fase inicial de instalação da fibrose, como numa fase mais avançada, para verificar assim a possibilidade de reversibilidade da fibrose septal do rato, como a ação das drogas acima mencionadas. Procurou-se inquirir ainda, sobre o possível mecanismo de ação das drogas empregadas. Para tanto, os animais dos diversos grupos experimentais foram submetidos a hepatectomias parciais em momentos distintos da infecção na tentativa de se avaliar não só a progressão da fibrose como também, a possível ação antifibrosante das drogas já mencionadas, uma vez que cada animal servia como seu próprio controle.

Os aspectos mais relevantes das alterações histológicas diretamente causada pelo vermes e ovos da *C. hepatica* no rato, bem como a sua cinética ao longo do período de observação concordam inteiramente com àquelas descritas por FERREIRA & ANDRADE (1993). A fibrose septal aqui mencionada é interessante devido não só à sua distribuição no parênquima, mas, principalmente, quanto à sua patogenia que ainda é desconhecida.

Em experimento preliminar realizado em nosso Laboratório (dados não publicados) utilizando o modelo da *C. hepatica* para o estudo da fibrose septal, testou-se o interferon-alfa seguindo a metodologia (dose) descrita no trabalho de MORENO & MURIEL (1995), e constatou-se após análise morfométrica e bioquímica (dosagem da hidroxiprolina) das secções de fígados previamente fixadas, que não

houve redução significativa do teor de colágeno quando foram comparados os resultados obtidos com aqueles dos controles infectados. Na época, considerou-se que talvez a dose empregada (100.000 U.I.) não tivesse sido suficiente.

Nesta investigação, o tratamento realizado com interferon-alfa não-espécie específico demonstrou eficácia, mas quando administrado em altas doses. Os animais que receberam 500.000 U.I responderam positivamente ao tratamento, o que foi constatado após análise microscópica (semiquantitativa) das secções coradas com sÍrius-red. Este resultado foi confirmado quando se comparou estatisticamente os resultados obtidos da avaliação morfométrica e da dosagem da hidroxiprolina hepática dos animais infectados com *Capillaria hepatica* e não tratados com o do grupo tratado, e demonstrou uma redução significativa da fibrose ($p < 0,05$). Com relação aos animais submetidos ao mesmo tratamento, mas que receberam 800.000 U.I, a redução da fibrose foi ainda mais evidente, tanto microscópica, bioquímica e morfometricamente, apontando para um efeito anti-fibrosante do interferon-alfa neste modelo diretamente relacionado à dose administrada.

O Cloreto de gadolínio, um metal raro da família dos lantanídeos, tem sido utilizado em diversos trabalhos descritos na literatura, por sua capacidade em bloquear a fagocitose das células de Kupffer (RENAUD et al.,1989; KAMEI et al.,1990; JAESCHKE & FARHOOD (1991); JENEI et al., 1991; ZHOU, et al. 1992; HARDONK et al., 1992; EDWARDS et al., 1993; ROLAND et al., 1993; VIDAL et al., 1993; ARII et al., 1994; LAZAR et al., 1994; SHIRATORI et al., 1994; DEACIUC et al., 1994; ZHONG et al., 1995; KNECHT et al., 1995; BANNENBERG et al., 1995; ISHIYAMA et al., 1995; HIGASHITSUJI et al., 1995; SUZUKI et al., 1996; SAUER et al., 1997; KOOP et al., 1997; KUKAN et al., 1997; ZHONG et al., 1997; RIZZARDINI

et al., 1998; OLYNYK et al., 1998).

BANNENBERG et al., (1995), pré-tratando ratos com cloreto de gadolínio demonstraram que este metal não possui nenhum efeito sobre os macrófagos pulmonares, mesmo quando o dobro da dose usual (que é de 10mg/Kg) é administrada sistemicamente, concluindo, desta forma, que a ação do referido metal é específica para as células de Kupffer.

As células de Kupffer são predominantemente encontradas na região periportal do fígado, que aparenta ser uma localização ideal para monitorar a entrada de sangue neste órgão. As células de Kupffer são, contudo, encontradas em cada região do fígado, e dentro do ácino, 43% das células de Kupffer são periportais, 32% mediozonais, e 25% perivenosas (KUIPER et al., 1994; SLEYSTER et al., 1982). As células de Kupffer encontradas na região periportal do fígado parecem ser as grandes, por conterem mais lisossomos heterogêneos, e por serem mais ativas no processo de fagocitose. As células de Kupffer pequenas na região perivenosa, por outro lado, parecem ser mais ativas na produção de citocina e possuem uma alta capacidade citotóxica (KUIPER et al., 1994; SLEYSTER et al., 1982; DAEMEN et al., 1989).

ROLAND et al., (1996), utilizando o cloreto de gadolínio *in vivo*, demonstraram que o mesmo atua alterando vários aspectos da fisiologia das células de Kupffer, por exemplo, diminuindo a liberação de óxido nítrico em resposta a lipossacarídeos.

O trabalho realizado por SHIRATORI et al., (1996), sugere que a supressão das células de Kupffer devido ao tratamento prévio com cloreto de gadolínio reduz a concentração no soro tanto de IL-6 quanto de TNF-alfa (após hepatectomia parcial) e distúrbios no processo de regeneração hepática. Esses resultados apontam para

um papel dos macrófagos hepáticos e seus mediadores, especialmente TNF-alfa, na regeneração hepática. Na tentativa de elucidar os aspectos obscuros quanto à regeneração hepática, RAI et al. (1996a) realizaram um experimento onde foi testado o papel do TNF-alfa na regeneração hepática em ratos tratados ou não por cloreto de gadolínio. Os resultados demonstraram que a depleção das células de Kupffer (cloreto de gadolínio) promoveu um aumento de seis a oito vezes de transcritos de TNF quando se comparou com os animais controles. Neste grupo (tratado com cloreto de gadolínio), a hepatectomia parcial induziu um aumento na produção de IL-6 (uma citocina indutora de TNF) de doze a dezesseis vezes, avaliada através de PCR. Estes resultados sugerem que, embora o cloreto de gadolínio cause uma depleção de células de Kupffer, não há uma diminuição do TNF hepático e que essa depleção aumenta a regeneração hepática após hepatectomia parcial.

Na tentativa de esclarecer o exato destino das células de Kupffer após tratamento com cloreto de gadolínio, RAI et al. (1996b) realizaram um experimento em que, através de administração de esferas de látex marcadas (a ratos controles e a outros tratados com cloreto de gadolínio), tentaram determinar se havia ou não uma diminuição no número total de células de Kupffer. Os resultados indicaram que o cloreto de gadolínio não reduz significativamente o número de células fagociticamente ativas, mas altera a sua distribuição acinar e pode provocar uma mudança no fenótipo destas células. Esta mudança fenotípica tem conseqüências importantes por permitir uma expressão excessiva de TNF-alfa. LOFFREDA et al., (1997), sugerem que a depleção das células de Kupffer por cloreto de gadolínio, pode levar outras células a produzir TNF durante a regeneração. RAI et al. (1997), avaliaram experimentalmente a expressão de TNF-alfa pré- e pós-hepatectomia

parcial após tratamento com cloreto de gadolínio, bem como citocinas induzidas por TNF-alfa: IL-1, IL-6 e citocinas que regulam negativamente a sua expressão: TGF-beta1 e IL-10. Os autores concluíram que as citocinas induzidas por TNF estão aumentadamente expressadas e que as que regulam negativamente o TNF, são afetadas diferencialmente. A IL-10 é abolida, enquanto TGF-beta1 fica inalterado. Esses achados sugerem que a produção de IL-10 pelas células de Kupffer é um importante mecanismo na regulação negativa do TNF durante a regeneração hepática.

As células de Kupffer representam uma importante classe de fagócitos mononucleares. Elas têm uma forma e posição altamente variáveis nos sinusóides, em contraste às células endoteliais e perisinusoidais. Este aspecto, indica que a célula de Kupffer é mais móvel que outros constituintes da parede sinusoidal. Algumas vezes, especialmente sob condições experimentais ou patogênicas, elas são vistas no interior do espaço de Disse, isto é, em contato com as células perisinusoidais e os hepatócitos. As células de Kupffer têm contato intercelular direto com as células endoteliais, "pit cells", células sanguíneas e, via fenestrações endoteliais, com as células perisinusoidais e hepatócitos, BOUWENS & WISSE (1992).

Como já foi ressaltado, atualmente a explicação mais aceita para a origem da fibrose hepática tem sido o eixo formado pelas células de Kupffer/ células perisinusoidais. As primeiras, provavelmente por um estímulo de natureza imunológica, produziriam fatores ou citocinas que estimulariam as células perisinusoidais através de receptores específicos existentes em sua membrana que induziriam a produção e deposição no interstício do parênquima de componentes da matriz extracelular .

Em experimento realizado para testar a eficácia do cloreto de gadolínio como droga depletora de células de Kupffer, foi utilizada a solução de tinta da China 10%. Foi então constatado, após análise microscópica das secções hepáticas coradas, que as células armazenadoras do pigmento (células de Kupffer) permaneceram intactas, ativas e com distribuição regular por todo o parênquima.

Em nosso material, observou-se nos animais tratados com cloreto de gadolínio preventivamente (antes da hepatectomia parcial), diminuição significativa no teor de colágeno quando comparado ao controle, avaliado através de dosagem da hidroxiprolina hepática. Contudo, a avaliação morfométrica não confirmou estes resultados. A ineficácia desta droga (neste modelo) na cura da fibrose, avaliada morfométrica e bioquimicamente, sugere que a mesma pode ter promovido alterações apenas de ordem fenotípica sobre às células de Kupffer, o que viria a corroborar os achados de RAI et al., (1996b). Um outro aspecto do trabalho de RAI et al., (1996b), que pode vir a explicar a manutenção da fibrose septal tanto no grupo tratado preventiva como curativamente com cloreto de gadolínio, é a produção excessiva de TNF-alfa devida a uma mudança fenotípica nas células de Kupffer que, segundo esses autores, essa substância induz em animais hepatectomizados parcialmente.

As células perisinusoidais também chamadas de células armazenadoras de gordura ou células de Ito, são células mesenquimais implicadas na fibrogênese (BAIL et al., 1990; GEERTS, et al., 1994; CARLONI et al., 1996). Contudo, pouco se sabe sobre as possíveis interações entre as células estreladas hepáticas e os vários componentes da matriz extracelular (CARLONI et al., 1996).

No que diz respeito ao uso de vitamina A como anti-fibrosante, uma possibilidade a ser considerada seria de natureza puramente mecânica, pois as

células abarrotadas de lipídios poderiam funcionar preferencialmente como armazenadoras e ter inibidas as suas funções secretórias.

As células perisinusoidais têm sido definidas como elementos mesenquimais com possíveis funções pericíticas dentro do fígado. A abundância de gotas de gordura contendo vitamina A intracitoplasmática representa o aspecto morfológico mais original desse tipo de célula. Elas possuem diversas características que podem variar de acordo com a sua localização dentro do lóbulo hepático: as localizadas na zona 1 são pequenas e com pequeno conteúdo de vitamina A; as localizadas na zona lobular 2 estocam abundantes gotículas de gordura contendo vitamina A; enquanto que as pericentraes tornam-se mais alongadas assumindo uma aparência dendrítica com pequena quantidade de vitamina A (PINZANI, 1995). Essa heterogeneidade intracinar das células perisinusoidais pode refletir diferenças no controle metabólico da vitamina A. A transição fenotípica da célula perisinusoidal em direção ao fenótipo semelhante a miofibroblasto inclui uma gradual e completa perda de gotículas de vitamina A (PINZANI, 1995).

Ainda não está claro se o conteúdo das gotículas de gordura contendo retinóides durante a ativação das células perisinusoidais em cultura e *in vivo* é requerido para a iniciação da ativação (PINZANI, 1995). Vários estudos têm mostrado que quando o retinol ou ácido retinóico são reintroduzidos em culturas de células perisinusoidais que tenham sofrido uma completa transição para células semelhantes a miofibroblastos, a supressão da proliferação, a produção de colágeno e expressão de TGF-beta são consistentemente observados (DAVIS et al., 1987; DAVIS & VUCIC, 1989).

Embora tenha sido sugerido que os retinóides regulam a proliferação das células perisinusoidais e síntese de colágeno, pouco se conhece sobre a capacidade

destas células em responder aos retinóides *in vivo* (WEINER et al.,1992). Devida à habilidade dos retinóides em mediar seus efeitos moleculares através de receptores que induzem modificações nucleares, WEINER et al., (1992), realizaram um experimento através de hibridização *in situ* em que as células perisinusoidais foram examinadas para que se pudesse avaliar a presença de receptores nucleares (especificamente o receptor para ácido retinóico nuclear beta). A modulação deste receptor foi também estudada durante cultura celular e fibrogênese hepática. Os resultados demonstraram que as células perisinusoidais isoladas de ratos com fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono, apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de mRNA para o receptor beta quando se comparou com as células perisinusoidais de ratos normais. Já MARGIS et al., (1992), utilizando uma estabelecida linhagem celular murina (GRX), representativa das células do tecido conjuntivo hepático e com características miofibroblásticas, demonstraram que a adição de retinol induziu essa célula a assumir o fenótipo da célula perisinusoidal e diminuiu a taxa de proliferação da população celular em questão. A secreção de colágeno também foi especificamente diminuída. Os autores concluíram que a modulação dos componentes pericelulares induzida por retinol pode alterar as relações entre as células mesenquimais hepáticas e pode estar relacionada às modificações induzidas pela vitamina A na homeostasia do tecido conjuntivo hepático e na fibrose hepática.

Estudos recentes têm mostrado que a administração de retinóide suprime o estabelecimento da fibrose hepática e estimula a regressão (teor de vitamina A) em ratos normais tratados com tetracloreto de carbono (SEIFERT et al.,1994). Em seu experimento, SEIFERT et al., (1994), avaliaram o grau da fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono em ratos com baixos níveis de retinóides hepáticos e em

ratos com os níveis de retinóides normais, e perceberam que a fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono foi mais pronunciada nos primeiros, do que nos animais com níveis suficientes de retinóides hepáticos, o que foi confirmado morfológicamente e pelo conteúdo da hidroxiprolina hepática. Dessa forma, sugeriram que os retinóides modulam a síntese de colágeno e deposição em necrose hepatocelular induzida por tetracloreto de carbono. Em trabalho anterior, BIOULAC-SAGE et al., (1988), analisando material de biópsia hepática de um paciente de 50 anos de idade, que havia se submetido a tratamento utilizando vitamina A em altas doses por mais de quatro anos, observaram, através de microscopia óptica (Sírius vermelho) e eletrônica, alterações nas células perisinusoidais que se apresentavam com a aparência semelhante a miofibroblato, e aumento nas quantidades dos colágenos de tipos I, III, IV, laminina e fibronectina. Esses elementos foram demonstrados através de imunohistoquímica, sugerindo que a vitamina A, independentemente de outras alterações celulares decorrentes do seu excesso, é responsável pela fibrose. Contudo, YAMANE et al., (1993), através da detecção de perisinusoidais por imunoperoxidase utilizando um anticorpo anti-desmina analisado morfometricamente através de contagem, sugerem a existência de uma significativa correlação negativa entre o nível de retinil palmitato e o conteúdo de colágeno hepático, bem como o nível de hidroxiprolina no fígado fibrótico. Assim sendo, os autores inferem que um aumento do retinol hepático, assim como uma diminuição de retinil palmitato, pode facilitar o processo de fibrose hepática produzida por células perisinusoidais.

Em nosso experimento, não se observou uma diminuição significativa no conteúdo de colágeno avaliado por dosagem de hidroxiprolina das secções hepáticas dos ratos tratados com vitamina A em altas doses, quando se comparou

com os animais controles. Os resultados da análise morfométrica onde se avaliou o conteúdo do colágeno das secções coradas com Sírius vermelho também foram concordantes. Esses achados sugerem que a vitamina A quando administrada em altas doses pode atuar aumentando a quantidade de fibrose hepática, o que discorda dos achados de YAMANE et al., (1993) e concorda com os achados de BIOULAC-SAGE et al., (1988). Assim sendo, a vitamina A não demonstrou ser capaz de impedir o estabelecimento da fibrose septal (ação preventiva) no presente modelo e nas presentes condições experimentais, o que contradiz os achados de SEIFERT et al., (1994). Em suma, a vitamina A parece ter uma atuação dependente de outros fatores presentes no parênquima hepático durante a fibrose septal, o que possivelmente pode lhe conferir um papel indutor da mesma.

Os resultados com a pentoxifilina demonstraram uma potente ação anti-fibrosante desta droga, quando administrada por via intraperitoneal, mas não pela via intravenosa. A ação da pentoxifilina parece ser das mais complexas.

Análises bioquímicas determinaram que macrófagos ativados produzem seis fatores de crescimento : interleucina -1 (IL-1), fator de necrose tumoral- alfa (TNF-alfa), interleucina-6 (IL-6), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e fator de transformação do crescimento-beta (TGF-beta). Duas dessas citocinas, TGF-beta e PDGF, têm sido referidas como sendo altamente fibrogênicas e hábeis em disparar diretamente a proliferação de fibroblastos e/ou estimular a produção de tecido conjuntivo (KOVACS, 1991). TGF- β é o agente fibrogênico melhor caracterizado e tem sido utilizado para estimular a expressão de genes do colágeno e fibronectina tão bem como para estimular a produção de proteínas (KOVACS, 1991).

O papel de outras citocinas tais como IL-1 e TNF- α na produção de

colágeno é questionável. Enquanto a IL-1 β não estimula a síntese de colágeno, ela pode afetar o acúmulo de moléculas na matriz extracelular promovendo ou inibindo a atividade de colagenases. Com relação ao TNF- α , estudos indicam que a sua presença aumenta a síntese de colágeno, enquanto outros mostram que suprime (KOVACS, 1991).

A fibrogênese é um processo extremamente complexo em que as citocinas produzidas localmente e fatores de crescimento agem em vários tipos de células. Um evento chave no desenvolvimento da fibrose hepática é a ativação das células estreladas perisinusoidais hepáticas e aumento na expressão de TGF-beta. TGF-beta é expresso por muitos tipos de células, incluindo as células estreladas perisinusoidais e as células de Kupffer, além de induzir a expressão de receptores nas células perisinusoidais para o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF). A aumentada expressão de PDGF e do seu receptor tem sido demonstrada em fígado fibrótico. Essas alterações juntas resultam em uma progressiva proliferação da matriz produzida pelas células estreladas diminuindo o potencial regenerativo dos hepatócitos (MOSHAGE, 1997).

A pentoxifilina (uma metilxantina) tem sido referida por inibir a síntese de colágeno (DUNCAN et al., 1995), suprimir a ativação das células de Kupffer e promover a diminuição no soro de TNF-alfa após isquemia (NISHIZAWA et al., 1997). Ela também pode atuar como um agente antifibrogênico, por inibir a proliferação e/ou deposição de colágeno em tipos celulares responsáveis pelo acúmulo de matrix extracelular (ROMANELLI et al., 1997).

A ativação das células estreladas em cultura e *in vivo* está também associada com a expressão de potentes inibidores das metaloproteinases: inibidor tissular de metaloproteinase 1 e 2 (TIMP-1 e TIMP-2). A expressão desses inibidores

também tem sido demonstrada na doença hepática humana e em modelos animais de fibrose hepática (IREDALE, 1997).

As células estreladas perisinusoidais hepáticas ativadas, mas não as quiescentes, têm um alto nível de colágeno tipo I e são positivas para actina de músculo liso. Além disso, a ativação das células estreladas perisinusoidais é um passo crítico na fibrose hepática (LEE et al., 1997). Segundo esses autores, o tratamento de ratos com tetracloreto de carbono estimula a cascata de eventos característicos do estresse oxidativo hepático, marcadamente a estimulação das células estreladas perisinusoidais a entrarem na fase S. Nesse experimento, eles demonstraram que essas mudanças foram prevenidas por pentoxifilina, o que também diminuiu a lesão hepática induzida por tetracloreto de carbono. O tratamento com pentoxifilina previniu as anormalidades moleculares características da ativação das células estreladas perisinusoidais induzidas por tetracloreto de carbono independentemente do efeito inibitório das fosfodiesterases, por interferir com a cascata de eventos do estresse oxidativo.

ROMANELLI et al., (1997), investigaram em que ponto a pentoxifilina pode afetar a síntese e a degradação do colágeno tipo I em células estreladas perisinusoidais hepáticas humanas, células, essas, que atuam como elemento chave na deposição de tecido conjuntivo no fígado fibrótico. A síntese e a liberação de pró-colágeno tipo I foram avaliadas em células mantidas em meio livre de soro e insulina por 48h, e então estimuladas por TGF-beta1 por diferentes períodos de tempo na ausência e na presença de pentoxifilina. Houve um aumento nos níveis de mRNA para pró-colágeno tipo I 3-6h após a estimulação. Este efeito foi seguido por uma produção aumentada de proteínas extracelulares em ambas as células, 9-12h após a adição do TGF-beta1. A marcação com L-[³H]-prolina revelou que a

pentoxifilina foi hábil em induzir a degradação do pró-colágeno, principalmente no compartimento extracelular. A co-incubação com pentoxifilina reduziu consistentemente os níveis de mRNA para pró-colágeno I basais tanto quanto como sob estimulação. A análise subsequente verificou o efeito da pentoxifilina na via envolvida na degradação do colágeno tipo I. A pentoxifilina não afetou a expressão do mRNA para a metaloproteinase 1 (MMP-1) nem na condição de estimulação, nem na basal, onde estava marcadamente reduzida a expressão do mRNA para o tecido inibidor de metaloproteinase1 (TIMP-1). Em suma, a incubação com pentoxifilina aumenta os níveis de "MMP-1 ativadas" nas células sobrenadantes em condições basais ou sob estimulação, sugerindo uma ação antifibrótica da pentoxifilina em células estreladas perisinusoidais humanas mais pela degradação da taxa do colágeno extracelular do que por uma redução na síntese de colágeno.

Nossos resultados demonstraram que a via de administração da pentoxifilina é de fundamental importância para sua eficácia como droga antifibrótica. Os ratos infectados com *C. hepatica* e que foram tratados pela via intravenosa, não responderam ao tratamento preventivo com pentoxifilina. A fibrose foi avaliada pelo teor de colágeno tecidual através da dosagem da hidroxiprolina hepática, bem como, pela análise morfométrica das secções coradas com Sírius vermelho. As análises mostraram que não houve inibição da formação da fibrose septal, nem diminuição significativa da fibrose quando se compararam os resultados com os controles infectados, não tratados, com o mesmo tempo de infecção. Já nos animais tratados pela via intraperitoneal, seguindo a mesma metodologia do grupo anterior, observou-se uma diminuição significativa da fibrose ($p < 0,05$) quando se comparou com o grupo controle. Os resultados desta avaliação coincidiram microscópica, morfométrica e bioquimicamente. Esses resultados, apontam para a

importância da via de administração da droga (pentoxifilina) como um fator diretamente relacionado à sua eficácia, bem como sugere a (provável) atuação da pentoxifilina sobre as principais células envolvidas no processo de fibrose (células de Kupffer e as células perisinusoidais) que, possivelmente por sua inativação ou bloqueio, estariam sendo impedidas de depositarem quantidades exageradas de componentes da matriz extracelular no parênquima hepático .

Em suma, os resultados demonstraram uma potente ação antifibrosante principalmente da Pentoxifilina (por via intraperitoneal) e do Interferon- α (500.000 e 800.000 U.I.) no modelo de fibrose septal causada por *C. hepatica*. Os resultados também apontaram para a importância da via de administração e da dose administrada para se obter o efeito antifibrosante. As vantagens de se contar com um modelo experimental com produção regular de fibrose e alto grau de reprodutibilidade foram óbvias .

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCOLADO, R.; ARTHUR, M.J.P.; IREDALE, J.P. Pathogenesis of liver fibrosis. **Clin. Sci.**, **92**: 103-112, 1997.
- ANDRADE, Z.A. Contribution to the study of septal fibrosis of the liver. **Int. J. Exp. Path.**, **72**: 553-62, 1991.
- ANDRADE, Z.A. Evolution and involution of hepatosplenic schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **84**: 58-75, 1989. Suppl.
- ARII, S.; MONDEN, K.; ADACHI, Y.; ZHANG, W.; HIGASHITSUJI, H.; FURUTANI, M.; MISE, M.; FUJITA, S.; NAKAMURA, T.; IMAMURA, M. Pathogenic role of Kupffer cell activation in the reperfusion injury of cold-preserved liver. **Transplantation**, **58**: 1072-7, 1994.
- ARTHUR, M.J.P. Degradation of matrix proteins in liver fibrosis. **Pathol. Res. Pract.**, **190**: 825-33, 1994.
- BAIL, B.L.; BIOULAC-SAGE, R.; SENUITA, A.; QUINTON, J.S.; BALABAUD, C. Fine structure of hepatic sinusoids and sinusoidal cells in disease. **J. of Elect. Microsc. Tech.** **14**: 257-82, 1990.
- BANNENBERG, G.; LUNDBORG, M.; JOHANSSON, A. Pulmonary macrophage function in systemic gadolinium chloride-pretreated rats. **Toxicol. Lett.**, **80**: 105-7, 1995.
- BERGMAN, I. & LOXLEY, R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. **Anal. Chem.**, **35**: 1961-65, 1963.

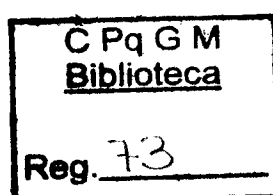
- BERMAN, B. & DUNCAN, M.R. Pentoxifylline inhibits normal human dermal fibroblast *in vitro* proliferation, collagen, glycosaminoglycan, and fibronectin production, and increases collagenase activity. **J. Invest. Dermatol.**, **92**: 605-10, 1989.
- BHUNCHET, E. & KENJIRO, W. Role of mesenchymal cell populations in porcine serum- induced rat liver fibrosis. **Hepatol.**, **16**: 1452-73, 1992.
- BIOULAC-SAGE, P.; QUINTON, A.; SARIC, J.; GRIMAUD, J.A.; MOUREY, M.S.; BALABAUD, C. Chance discovery of hepatic fibrosis in patient with asymptomatic hypervitaminosis A. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **112**: 505-9, 1988.
- BLACKWELL, J.B. Cirrhosis resulting from repeated injections of antigen. **J. Path. Bact.** **90**: 245-58, 1965.
- BLANER, S.W. Retinoid (vitamin A) metabolism and the liver. (eds) In: ARIAS, M.; BOXER, I.L.; FAUSTO, N.; JAKOBY, W.B.; SCHACHTER, D.A.; SHAFRITZ, D.A. *The liver: Biology and Pathology*. 3.ed. New York: Raven press, 1994. Cap. 30. p. 529-41.
- BLOMHOFF, R. & WAKE, K. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. **FASEB J.**, **5**: 271-277; 1991.
- BLOMHOFF, R.; GREEN, M.H.; BERG, T.; NORUM, K.R. Transport and storage of vitamin A. **Science**, **250**: 399-404, 1990.
- BLOMHOFF, R.; NORUM, K.R.; BERG, T. Hepatic uptake of [³H] retinol bound to the serum retinol binding protein involves both parenchymal and perisinusoidal stellate cells. **J. Biol. Chem.**, **260**: 13571-75, 1985a.

- BLOMHOFF, R.; RASMUSSEN, M.; NILSSON, A.; NORUM, K.R.; BERG, T; BLANER, W.S.; KATO, M.; MERTZ, J.R.; GOODMAN, D.S.; ERIKSSON, U.; PETERSON, P. Hepatic retinol metabolism. **J. Biol. Chem.**, **260**: 13560-5, 1985b.
- BOUMA, J.M.W. & SMIT, M.J. Gadolinium chloride selectively blocks endocytosis by Kupffer cells. (ed.) In: WISSE, E.; KNOOK, D.L.; DECKER, K. *Cells of The Hepatic Sinusoid*. The Netherlands: Kupffer Cell Foundation, 1989. p.132-33.
- BOUWENS, L. & WISSE, E. The origin of Kupffer cells and their anatomic relationship to hepatocytes. (ed.) In: BILLIAR, T.R.; CURRAN, R.D. *Hepatocyte and Kupffer cell interactions*. CRS Press, Boca Ranton, 1992. p. 3-21.
- CAMPBELL, J.A.H. The effects of adrenalectomy in experimental non-dietary cirrhosis. **Br. J. Exper. Pathol.** **44**: 66-71, 1963.
- CARLONI, V.; ROMANELLI, R.G.; PINZANI, M.; LAFFI, G.; GENTILINI, P. Expression and function of integrin receptors for collagen and laminin in cultured human hepatic stellate cells. **Gastroenterology**, **110**: 1127-36, 1996.
- CHIEFFI, P.P.; DIAS, R.M.D.S.; MANGINI, A.C.S.; GRISPINO, D.M.A.; PACHECO, M.A.D. *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) em murídeos capturados no município de São Paulo, SP, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **23**: 143-6, 1981.
- COUTINHO, E.M.; SOUZA, M.M.; SILVA, L.M.; CAVALCANTI, C.L.; ARAÚJO, R.E.; BARBOSA Jr., A. A., CHEEVER, AW.; ANDRADE, Z.A. Pathogenesis of schistosomal “pipestem” fibrosis: a low-protein diet inhibits the development of “pipestem” fibrosis in mice. **Int. J. Exp. Pathol.**, **78**: 337-42, 1997.

- CZAJA, M.J.; WEINER, F.R.; TAKAHASHI, S.; GIAMBRONE, M.A.; van der MEIDE, P.H.; SCHELLEKENS, H.; BIEMPICA, L.; SERN, M.A. γ -Interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. **Hepatology**, **10**: 795-800, 1989.
- DAEMEN, T.; VENINGA, A.; ROERDINK, F.H.; SCHERPHOF, G.L. Endocytic and tumoricidal heterogeneity of rat macrophage populations. **Sel. Cancer. Ther.**, **5**: 157-67, 1989.
- DAVIS, B.H. & VUCIC, A. Transforming growth factor-beta modulates hepatic Ito cell proliferation, collagen synthesis and vitamin A metabolism *in vitro*. (ed.) In: WISSE, E.; KNOOK, D.L.; DECKER, K. *Cells of The Hepatic Sinusoid*. The Netherlands: Kupffer Cell Foundation, 1989. p.39-42.
- DAVIS, B.H.; PRATT, B.M.; MADRI, J.A. Retinol and extracellular collagen matrices modulate hepatic Ito cell collagen the phenotype and cellular retinol binding protein levels. **J. Biol. Chem.**, **262**: 10280-86, 1987.
- DEACIUC, I.V.; BAGBY, G.J.; NIESMAN, M.R.; SKREPNIK, N.; SPITZER, J.J. Modulation of hepatic sinusoidal endothelial cell function by Kupffer cells: an example of intercellular communication in the liver. **Hepatology**, **19**: 464-70, 1994.
- DIANZANI, F.; ANTONELLI, G.; CAPOBIANCHI, M.R. The biological basis for clinical use of interferon. **J. Hepatol.**, **11**: S5-S10, 1990.
- DOHERTY, G.M.; JENSEN, C.; ALEXANDER, R.; BURESH, C.M.; NORTON, J.A. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. **Surgery**, **110**: 192-98, 1991.

- DUNCAN, M.R.; HASAN, A.; BERMAN, B. Pentoxifylline, pentifylline, and interferons decrease type I and III procollagen mRNA levels in dermal fibroblasts: evidence for mediation by nuclear factor1 down-regulation. **J. Investig. Dermatol.**, **104**: 282-86, 1995.
- EDWARDS, M.J.; KELLER, B.J.; KAUFFMAN, F.C.; THURMAN, R.G. The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, **119**: 275-9, 1993.
- FARHANG-AZAD. Ecology of *Capillaria hepatica* (BANCROFT, 1893) (Nematoda). II- Egg-releasing mechanism and transmission. **J. Parasitol.** **63**: 701-6, 1977.
- FERREIRA, L.A. & ANDRADE, Z.A. *Capillaria hepatica*: a cause of septal fibrosis of the liver. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **88**: 441-47, 1993.
- FONSECA JÚNIOR, L.E. **Alterações hepáticas em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida. Avaliação histopatológica e ultraestrutural. Estudo através de biópsias hepáticas.** Salvador, 1997. 153p. Tese (Doutoramento em Patologia Humana) Faculdade de Medicina, UFBA, 1998.
- FORT, J.; PILETTE, C.; OBERTI, F.; VEAL, N.; GALLOIS, Y.; DOUAY, O. Effets de l'hypertension portale chez le rat (resumê). **Gastroenterol. Clin. Biol.**, **20**: 812, 1996.
- GALVÃO, V.A. *Capillaria hepatica*, estudo da incidência em ratos de Salvador, Bahia, e dados imunopatológicos preliminares. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **10**: 333-8, 1976.
- GALVÃO, V.A. Estudos sobre *Capillaria hepatica*: Uma avaliação do seu papel patogênico para o Homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **76**: 415-33, 1981.
- GALVÃO, V.A. Tentativa para detectar infecção por *Capillaria hepatica* no homem. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **21**: 231-6, 1979.

- GEERTS, A.; De BLESER, P.; HAUTEKEETE, M.L.; NIKI, T.; WISSE, E. Fat-storing (Ito) cell biology. (ed.) In: ARIAS, I.M.; BOYER, J.L.; FAUSTO, N.; JAKOBY, W.B.; SCHACHTER, D.A.; SHAFRITZ, D.A. *The liver: Biology and Pathobiology*, 3.ed. New York: Raven Press, 1994. Cap. 42. p.819-38.
- GERBER, M.A. & VERNACE, S. Chronic septal hepatitis. **Virchow's Arch. A. Path. Anat. Histol.** **362**: 303-9, 1974.
- GOLDRING, M.B.; SANDELL, L.J.; STEPHENSON, M.L.; KRANE, S.M. Immune interferon suppress levels of procollagen mRNA and type II collagen synthesis in cultured human articular and costal chondrocytes. **J. Biol. Chem.**, **261**: 9049-56, 1986.
- GUIDO, M.; RUGGE, M.; CHEMELLO, L.; LEANDRO, G.; FATTOVICH, G.; GIUSTINA, G.; CASSARO, M.; ALBERTI, A. Liver stellate cells in chronic viral hepatitis: the effect of interferon therapy. **J. Hepatol.**, **24**: 301-7, 1996.
- HARDONK, M.J. & DIJKHUIS, F.W.J. Influence of selective depletion of Kupffer cells by gadolinium chloride on silica-induced formation of granulomas. (ed.) In: KNOOK, D.L. & WISSE, E. *Cells of The Hepatic Sinusoid*. The Netherlands: Kupffer Cell Foundation, 1993. p.101-04.
- HARDONK, M.J.; DIJKHUIS, F.W.; HULSTAERT, C.E.; KOUDSTAAL, J. Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. **J. Leukoc. Biol.**, **52**: 296-302, 1992.
- HENDRIKS, H.F.J.; HORAN, M.A.; DURHAM, S.K.; EARNEST, D.L.; BROUWER, A.; HOLLANDER, C.F.; KNOOK, D.L. Endotoxin induced liver injury in aged and subacutely hypervitaminotic A rats. **Mech. of Ag. and Dev.**, **41**: 241-50, 1987.



- HIGASHITSUJI, H.; ARII, S.; FURUTANI, M.; MISE, M.; MONDEN, K.; FUJITA, S.; ISHIGURO, S.; KITAO, T.; NAKAMURA, T.; NAKAYAMA, H. Expression of cytokine genes during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **J. Surg. Res.**, **58**: 267-74, 1995.
- HORISBERGER, M.A. & DE STARITZKY, K. A recombinant human interferon- α B/D hybrid with a broad host -range. **J. Gen. Virol.**, **68**: 945-48, 1987.
- IREDALE, J.P. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, **29**: 43-54, 1997.
- ISHIYAMA, H.; OGINO, K.; HOBARA, T. Role of Kupffer cells in rat liver injury induced by diethyldithiocarbamate. **Eur. J. Pharmacol.**, **292**: 135-41, 1995.
- JAESCHKE, H. & FARHOOD, A. Neutrophil an Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. **Am. J. Physiol.**, **260**: G355-62, 1991.
- JENEI, B.; LAZAR, G.; BARTHA, K.; MEDGYESI, G.A. Hypotensive action of IgG preparations containing aggregates is suppressed by PAF-receptor antagonist BN 52021 and by gadolinium chloride (an agent blocking Kupffer cell function). **Agents & Actions**, **32**: 333-8, 1991.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem. J.**, **11**: 447-55, 1979.
- KAMEI, T.; CALLERY, M.P.; FLYE, M.W. Kupffer cell blockade prevents induction of portal venous tolerance in rat cardiac allograft transplantation. **J. Surg. Res.**, **48**:393-6, 1990.

- KNECHT, K.T.; ADACHI, Y.; BRADFORD, B.U.; LIMURO, Y.; KADIISKA, M.; XUANG, Q.H.; THURMAN, R.G. Free radical adducts in the bile of rats treated chronically with intragastric alcohol: inhibition by destruction of Kupffer cells. **Mol. Pharmacol.**, **47**: 1028-34, 1995.
- KOHATSU, H.; ZAHA, O.; SHIMADA, K.; CHIBANA, T.; YARA, I.; SHIMADA, A.; HASEGAWA, H.; SATO, Y. A space-occupying lesion in the liver due to *Capillaria* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **52**: 414-18, 1995.
- KOOP, D.R.; KLOPFENSTEIN, B.; LIMURO, Y.; THURMAN, R.G. Gadolinium chloride blocks alcohol-dependent liver toxicity in rats treated chronically with intragastric alcohol despite the induction of CYP2E1. **Mol. Pharmacol.**, **51**: 944-50, 1997.
- KOUDSTAAL, J.; DIJKHUIS, F.W.J.; HARDONK, M.J. Selective depletion of Kupffer cells after intravenous injection of gadolinium chloride. (ed.) In: WISSE, E.; KNOOK, D.L.; McCUSKEY, R.S. *Cells of The Hepatic Sinusoid*. The Netherlands: Kupffer Cell Foundation, 1991. p.87-91.
- KOVACS, E.J. Fibrogenic cytokines: The role of immune mediators in the development of scar tissue. **Immun. Tod.**, **12**: 17-23, 1991.
- KOZAKI, K.; EGAWA, H.; BERMUDEZ, L.; KEEFE, E.B.; SO, S.K.; ESQUIVEL, C.O. Effects of pentoxifylline pretreatment on Kupffer cells in rat liver transplantation. **Hepatology**, **21**: 1079-82, 1995.
- KUIPER, J.; BROUWER, A.; KNOOK, D.L.; van BERKEL, T. J. C. Kupffer and sinusoidal endothelial cells. (ed.) In: ARIAS, I.M.; BOYER, J.L.; FAUSTO, N.; JAKOBY, W.B.; SCHACHTER, D.A.; SHAFRITZ, D.A. *The liver: Biology and Pathobiology*. 3.ed. New York: Raven Press, 1994. Cap. 41. p.791-918.

- KUKAN, M.; VAJDOVA, K.; HORECKY, J.; NAGYOVA, A.; MEHENDALE, H.M.; TRNOVEC, T. Effects of blockade of Kupffer cells by gadolinium chloride on hepatobiliary function in cold ischemia-reperfusion injury of rat liver. **Hepatology**, **26**: 1250-7, 1997.
- LAUTA, V.M. Update on the use of interferons in clinical practice. **Clin. Ter.**, **146**: 393-448, 1995.
- LAZAR JUNIOR, G. ; LAZAR, G.; KASZAKI, J.; OLAH, J.; KISS, I.; HUSZTIK, E. Inhibition of anaphylactic shock by gadolinium chloride-induced Kupffer cell blockade. **Agents & Actions**, **41**: C97-8, 1994.
- LEE, K.S.; COTTAM, H.B.; HOUGLUM, K.; WASSON, D.B.; CARSON, D.; CHOJKIER, M. Pentoxifylline blocks hepatic stellate cell activation independently of phosphodiesterase inhibitory activity. **Am. J. Physiol.**, **273**: G1094-100, 1997.
- LOFFREDA, S.; RAI, R.; YANG, S.Q.; LIN, H.Z.; DIEHL, A.M. Bile ducts and portal and central veins are major producers of tumor necrosis factor alpha in regenerating rat liver. **Gastroenterology**, **112**: 2089-98, 1997.
- LONGCOPE, W.T. Cirrhosis of the liver produced by chronic protein intoxication. **Trans. Am. Assoc. Phycns.** **28**: 497-512, 1913.
- LUTTERMOSER, G.W. Factors influencing the development and viability of the eggs of *Capillaria hepatica*. **Amer. J. Hyg.**, **27**: 275-89, 1938.
- MALLAT, A.; PRÉAUX, A.M.; BLAZEJEWSKI, S.; ROSENBAUM, J.; DHUMEAUX, D.; MAVIER, P. Interferon α and γ inhibit proliferation and collagen synthesis of human Ito cells in culture. **Hepatology**, **21**: 1003-10, 1995.

- MARGIS, R.; PINHEIRO-MARGIS, M.; da SILVA, L.C.; BOROJEVIC, R. Effects of retinol on proliferation, cell adherence and extracellular matrix synthesis in a liver myofibroblast or lipocyte cell line (GRX). **Int. J. Exp. Pathol.**, **73**: 125-35, 1992.
- MARTIN, S.R. Changes in Kupffer cell phenotype and acinar location induced by intravenous gadolinium chloride. (ed.) In: KNOOK, D.L.; WISSE, E. *Cells of The Hepatic Sinusoid*. The Netherlands: Kupffer Cell Foundation, 1993. p.168-70.
- McQUOWN, A.L. *Capillaria hepatica*. **Amer. J. Clin. Pathol.**, **24**: 448-52, 1954.
- MEISTER, A.; UZÉ, G.; MOGENSEN, K.E.; GRESSER, I.; TOVEY, M.G.; GRUTTER, M.; MEYER, F. Biological activities and receptor binding of two human recombinant interferons and their hybrids. **J. Gen. Virol.**, **67**: 1633-43, 1986.
- MORENO, M.G. & MURIEL, P. Remission of liver fibrosis by interferon- α_{2b} . **Biochem. Pharm.**, **50**: 515-20, 1995.
- MOSHAGE, H. Cytokines and the hepatic acute phase response. **J. Pathol.**, **181**: 257-66, 1997.
- MOURA, H. Trichuris, Trichinella e outros Nematóides. In: REY, L. *Parasitologia*. 2.ed. Rio de Janeiro: Koogan, 1991. Cap. 51. p.565-71.
- MURIEL, P. Alpha-interferon prevents liver collagen deposition and damage induced by prolonged bile duct obstruction in the rat. **J. Hepatol.**, **24**: 614-21, 1996.
- MURIEL, P.; BOLANOS, J.; BARRAL, J.M.; TORRES, G. Effect of alpha-interferon on erythrocyte and hepatocyte plasma membranes derived from cirrhotic rats. **Pharmacology**, **48**: 63-8, 1994.

- NISHIZAWA, H.; EGAWA, H.; INOMATA, Y.; UEMOTO, S.; ASONUMA, K.; KIUCHI, T.; YAMAOKA, Y.; TANAKA, K. Efficiency of pentoxifylline in donor pretreatment in rat liver transplantation. **J. Surg. Res.**, **72**: 170-6, 1997.
- OLYNYK, J.K.; YEOH, G.C.; RAMM, G.A.; CLARKE, S.L.; HALL, P.M.; BRITTON, R.S.; BACON, B.R.; TRACY, T.F. Gadolinium chloride suppresses hepatic oval cell proliferation in rats with biliary obstruction. **Am. J. Pathol.**, **152**: 347-52, 1998.
- PARONETTO, F. & POPPER, H. Chronic liver injury induced by immunologic reactions. Cirrhosis following immunization with heterologous sera. **Am. J. Pathol.**, **40**: 1087-1101, 1966.
- PETERSON, T.C. Pentoxifylline prevents fibrosis in animal model and inhibits platelet-derived growth factor-driven proliferation of fibroblasts. **Hepatology**, **17**: 486-93, 1993.
- PILETTE, C.; FORT, I.; RIFFLET, H.; CALES, P. Effets anti-fibrosants des interférons: Mécanismes d'action et perspectives thérapeutiques. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, **21**: 466-71, 1997.
- PINZANI, M. Novel insights into the Biology and Physiology of the Ito cell. **Pharmacol. Ther.**, **66**: 387-412, 1995.
- PLATANIAS, L.C. Interferons: laboratory to clinic investigations. **Curr. Opin. Oncol.**, **7**: 560-5, 1995.
- PRÉAUX, ANNE-MARIE; MALLAT, A.; ROSENBAUM, J.; ZAFRANI, ELIE-SERGE; MAVIER, P. Pentoxifylline inhibits growth and collagen synthesis of cultured human hepatic myofibroblast-like cells. **Hepatology**, **26**: 315-22, 1997.

- RAI, R.M.; LOFFREDA, S.; KARP, C.L.; YANG, S.Q.; LIN, H.Z.; DIEHL, A.M. Kupffer cell depletion abolishes induction of interleukin-10 and permits sustained overexpression of tumor necrosis factor alpha messenger RNA in the regenerating rat liver. **Hepatology**, **25**: 889-95, 1997.
- RAI, R.M.; YANG, S.Q.; McCLAIN, C.; KARP, C.L.; KLEIN, A.S.; DIEHL, A.M. Kupffer cell depletion by gadolinium chloride enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **Am. J. Physiol.**, **270**: G909-18, 1996a.
- RAI, R.M.; ZHANG, J.X.; CLEMENS, M.G.; DIEHL, A.M. Gadolinium chloride alters the acinar distribution of phagocytosis and balance between pro- and anti-inflammatory cytokines. **Shock**, **6**: 243-7, 1996b.
- RENAUD, G.; HAMILTON, R.L.; HAVEL, R.J. Hepatic metabolism of colloidal gold-low-density lipoprotein complexes in the rat: evidence for bulk excretion of lysosomal contents into bile. **Hepatology**, **9**: 380-92, 1989.
- RIZZARDINI, M.; ZAPPONE, M.; VILLA, P.; GNOCCHI, P.; SIRONI, M.; DIOMEDE, L.; MEAZZA, C.; MONSHOUWER, M.; CANTONI, L. Kupffer cell depletion partially prevents hepatic heme oxygenase 1 messenger RNA accumulation in systemic inflammation in mice: role of interleukin 1 beta. **Hepatology**, **27**: 703-10, 1998.
- ROLAND, C.R.; MANGINO, M.J.; DUFFY, B.F.; FLYE, M.W. Lymphocyte suppression by Kupffer cells prevents portal venous tolerance induction: a study of macrophage function after intravenous gadolinium. **Transplantation**, **55**: 1151-8, 1993.
- ROLAND, C.R.; NAZIRUDDIN, B.; MOHANAKUMAR, T.; FLYE, M.W. Gadolinium chloride inhibits Kupffer cell nitric oxide synthase (iNOS) induction. **J. Leukoc. Biol.**, **60**: 487-92, 1996.

- ROMANELLI, R.G.; CALIGIURI, A.; CARLONI, V.; DeFRANCO, R.; MONTALTO, P.; CENI, E.; CASINI, A.; GENTILINI, P.; PINZANI, M. Effect of pentoxifylline on the degradation of procollagen type I produced by human hepatic stellate cells in response to transforming growth factor-beta 1. **Br. J. Pharmacol.**, **122**: 1047-54, 1997.
- SAMLASKA, M.C.P. & WINFIELD, E.A. Pentoxifylline. **J. Am. Acad. Dermatol.**, **30**: 603-21, 1994.
- SAUER, J.M.; WAALKES, M.P.; HOOSER, S.B.; KUESTER, R.K.; McQUEEN, C.A.; SIPES, I.G. Suppression of Kupffer cell function prevents cadmium induced hepatocellular necrosis in the male Sprague-Dawley rat. **Toxicology**, **121**: 155-64, 1997.
- SCHUPPAN, D.; ATKINSON, J.; RUEHL, M.; RIECKEN, E.O. Alcohol and liver fibrosis pathobiochemistry and treatment. **Z. Gastroenterol.**, **33**: 546-50, 1995.
- SCIOT, R.; STAESSEN, D.; Van DAME, B.; Van STEENBERGEN, W.; FEVERY, J.; de GROOTE, J.; DESMET, V.J. Incomplete septal cirrhosis: histopathological aspects. **Histopathology**. **13**: 593-603, 1988.
- SEIFERT, W.F.; BOSMA, A.; BROUWER, A.; HENDRIKS, H.F.; ROHOLL, P.J.; van-LEEuwEN, R.E.; THIEL-de-RUITER, van G.C.; SEIFERT-BOCK, I.; KNOOK, D.L. Vitamin A deficiency potentiates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. **Hepatology**, **19**: 193-201, 1994.
- SEIFERT, W.F.; BOSMA, A.; HENDRIKS, H.F.J.; DE RUITER, G.C.F.; VAN LEEuwEN, R.E.W.; KNOOK, D.L.; BROUWER, A. Dual role of vitamin A in experimentally induced liver fibrosis. (ed.) In: WISSE, E.; KNOOK, D.L.; DECKER, K. *Cells of The Hepatic Sinusoid*. The Netherlands: Kupffer Cell Foundation, 1989. p.43-8.

- SENOO, H. & KENJIRO, W. Suppression of experimental hepatic fibrosis by administration of vitamin A. **Lab. Invest.**, **52**: 182-194, 1985.
- SHIRATORI, Y.; HONGO, S.; HIKIBA, Y.; OHMURA, K.; NAGURA, T.; OKANO, K.; KAMII, K.; TANAKA, T.; KOMATSU, Y.; OCHIAI, T.; TSUBOUCHI, H.; OMATA, M. Role of macrophages in regeneration of liver. **Dig. Dis. Sci.**, **41**: 1939-46, 1996.
- SHIRATORI, Y.; KIRIYAMA, H.; FUKUSHI, Y.; NAGURA, T.; TAKADA, H.; HAI, K.; KAMII, K. Modulation of ischemia-reperfusion-induced hepatic injury by Kupffer cells. **Dig. Dis. Sci.**, **39**: 1265-72, 1994.
- SLEYSTER, E.C. & KNOOK, D.L. Relation between localization and function of rat liver Kupffer cells. **Lab. Invest.**, **47**: 484-90, 1982.
- SUZUKI, S.; NAKAMURA, S.; SERIZAWA, A.; SAKAGUCHI, T.; KONNO, H.; MURO, H.; KOSUGI, I.; BABA, S. Role of Kupffer cells and the spleen in modulation of endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy. **Hepatology**, **24**: 219-25, 1996.
- TSUKAMOTO, H.; MATSUOKA, M.; FRENCH, S.W. Experimental models of hepatic fibrosis: A review. **Sem. Liv. Dis.**, **10**: 56-65, 1990.
- VIDAL, C.; GONZALEZ-QUINTELA, A.; CUERVAS-MONS, V. Influence of Kupffer cell phagocytosis blockade on the production of ovalbumin-specific IgE and IgG1 antibodies in an experimental model. **Clin. Exp. Allergy**, **23**: 15-20, 1993.
- WEINER, F.R.; BLANER, W.S.; CZAJA, M.J.; SHAH, A.; GEERTS, A. Ito cell expression of a nuclear retinoic acid receptor. **Hepatology**, **15**: 336-42, 1992.
- WINDMEIER, C. & GRESSNER, A.M. Effect of pentoxifylline on the fibrogenic functions of cultured rat liver fat-storing cells and myofibroblasts. **Bioch. Pharm.**, **51**: 577-84, 1996.

- WRIGHT, W.H. Observation on the life cycle of *Capillaria hepatica* (BANCROFT, 1893) with a description of the adult. **Can. J. Zool.**, **39**: 167-82, 1961.
- YAMANE, M.; TANAKA, Y.; MARUMO, F.; SATO, C. Role of hepatic vitamin A and lipocyte distribution in experimental hepatic fibrosis. **Liver**, **13**: 282-7, 1993.
- ZHONG, Z.; CONNOR, H.; MASON, R.P.; QU, W.; STACHLEWITZ, R.F.; GAO, W.; LEMASTERS, J.J.; THURMAN, R.G. Destruction of Kupffer cells increases survival and reduces graft injury after transplantation of fatty livers from ethanol-treated rats. **Liver Transpl. Surg.**, **2**: 383-7, 1997.
- ZHONG, Z.; CONNOR, H.D.; MASON, R.P.; QU, W.; GAO, W.; LEMASTERS, J.J.; THURMAN, R.G. Role of Kupffer cells in reperfusion injury in fat-loaded livers from ethanol-treated rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **275**: 1512-7, 1995.
- ZHOU, W.; McCOLLUM, M.O.; LEVINE, B.A.; OLSON, M.S. Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. **Hepatology**, **16**: 1236-40, 1992.