



UFBA

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



FIOCRUZ

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DINÂMICA DA ANGIOGÊNESE NA EVOLUÇÃO DA  
FIBROSE SEPTAL HEPÁTICA INDUZIDA POR  
Capillaria hepatica, EM RATOS**

**LIDIANE GABAN**

Salvador – Bahia  
2009



004472

FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ

DINÂMICA DA ANGIOGÊNESE NA EVOLUÇÃO DA FIBROSE  
SEPTAL HEPÁTICA INDUZIDA POR *Capillaria hepatica*, EM  
RATOS

Lidiane Gaban

Orientador: Zilton de Araújo Andrade

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

**Salvador-2009**



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

Gaban, Lidiane  
G112d Dinâmica da angiogênese na evolução da fibrose septal hepática induzida por *Capillaria hepática*, em ratos [manuscrito] / Lidiane Gaban. - 2009.  
66 f.; 30 cm

**Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de  
Pesquisas Gonçalo**

**Moniz. Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2009.**

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Zilton de Araújo Andrade.

• 1. *Capillaria hepática* 2. Fibrose septal . 3. Angiogênese. 4. Pericitos 5. Células  
estrelares hepáticas I.Título.

CDU 616.995.132

Trabalho realizado no Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – CPqGM/FIOCRUZ, com auxílio financeiro da CAPES, FAPESB e FIOCRUZ.

# *DEDICATÓRIA*

*Aos meus queridos pais, pelo incentivo e  
apoio durante meu crescimento  
acadêmico e por sempre acreditarem nas minhas atitudes!*

*Amo Muito Vocês!!!*

*Ao meu Eterno Amor, Cleber Ramos, companheiro sempre  
presente em minha vida, seja nos momentos de alegria, seja  
nos momentos de tristeza, além do imenso apoio na  
realização deste trabalho.*

*Não existem palavras para descrever o  
quão importante você é para mim!*

*Te Amo Muito!!!*

*"A vida não é um corredor reto e tranquilo que nós  
percorremos livres e sem empecilhos, mas um labirinto de  
passagens, pelas quais nós devemos procurar nosso caminho,  
perdidos e confusos, de vez em quando presos em um beco  
sem saída. Porém, se tivermos fé, uma porta sempre será  
aberta para nós, não talvez aquela sobre a qual nós mesmos  
nunca pensamos, mas aquela que definitivamente se revelará  
boa para nós".*

*A. J. Cronin*

# *AGRADECIMIENTOS*

*Ao Dr. Zilton de Araújo Andrade, um verdadeiro exemplo de orientador e profissional. Estou imensamente grata por tê-lo conhecido bem como tido como meu orientador. Agradeço também pela paciência, confiança e amizade, além de seus valiosos ensinamentos que muito contribuíram com meu amadurecimento científico!*

*À Dra. Sônia G. Andrade, pela atenção sempre carinhosa comigo, pela amizade, por sua imensa sabedoria, além do auxílio e participação em minha jornada! Estou muito agradecida pelo apoio, confiança e tudo o que fez por mim!*

*À Dra. Márcia M. de Souza, pela imensa contribuição no desenvolvimento deste trabalho, pela paciência inigualável em suas valiosas explicações, além de sua amizade, incentivo e disponibilidade! Muito obrigada!*

*Ao Dr. Cleber D. L. Ramos pelo apoio e contribuição no decorrer deste trabalho, de suas significativas sugestões para a realização do mesmo, além do imenso companheirismo e amizade. Muito obrigada!*

*Ao Dr. Aryon De Almeida Barbosa Júnior pela contribuição nas análises morfométricas e sugestões preciosas deste trabalho. Muito obrigada!*

*Aos membros da banca: Dr. Raymundo Paraná, Dr. Eduardo Ramos e Dr. Washington Luis Conrado Dos Santos, pelo aceite e pela preciosa colaboração. Muito obrigada!*

*Ao CPqGM/FIOCRUZ, pela oportunidade e confiança, além do apoio indispensável para o desenvolvimento experimental de todo o trabalho.*



*À Bióloga e Mestre Ana Cristina (Tinha), pelas valiosas contribuições nas técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência, além das importantes explicações e grande amizade! Obrigada por tudo!*

*Ao Sr. Antônio Carlos S. Santos, técnico do LAPEX, um exemplo de profissional. Sempre disponível e disposto a ajudar, além do auxílio com o manuseio de animais e a indispensável amizade. Agradeço por tudo!*

*Ao biólogo e estudante de mestrado Yánnick Fonseca, pelo apoio e ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho, além da grande amizade! Muito obrigada!*

*Aos companheiros do LAPEX: Elisângela Trindade (agradeço pelos auxílios e ensinamentos das diversas técnicas!), Samaly (obrigada pela valiosa amizade!), Manuela Caldas (amiga para todas as horas!), Rodrigo Andrade (obrigada pelas diversas explicações e esclarecimentos de patologia!), Everton (obrigada pela valiosa amizade!).*

*Aos companheiros do LACEI: Jorge Nihei (obrigada pelos grandes ensinamentos!), Daniel Pessina, André Meyer (Bigas), Cila Luz, Ercy, Inês, Renata, Marcos – obrigada pela valiosa amizade de vocês!*

*À secretária Mirella Castelo pelos auxílios e prontidão nas minhas solicitações, além da grande amizade!*

*Às técnicas do Laboratório de Histopatologia do CPqGM/FIOCRUZ, pelo auxílio e profissionalismo no desenvolvimento das técnicas histopatológicas. Muito obrigada!*

*A todos os colegas da pós-graduação em especial: Liliane Cunha, Magda Seixas,, Sanara Marques, Lucilene Silva, Gracio, Glorinha, Zé Geraldo, Ana Carvalho, Fábio, Círio, Jaqueline França, Claire, Théo, Torricele – obrigada pela valiosa amizade e por todos os momentos que passamos!*

*À amiga Juliana Ribeiro de Freitas, pela grande amizade que cultivamos e por tudo o que fez por mim e pela minha dissertação. Ju estou extremamente grata pelo seu apoio!!!*

*Aos coordenadores do curso de Pós-graduação em Patologia, pela eficiência e auxílio durante o decorrer de todo o curso. Muito obrigada!*

*À coordenação de ensino do CPqGM/FIOCRUZ, em especial Tauar e Taise pela disponibilidade, auxílio e amizade!*

*A todos os funcionários do Biotério do CPqGM/FIOCRUZ, em especial à Rejane Márcia Chaves de Menezes pelo apoio, eficiência e agilidade, além do cuidado e organização dos animais. Obrigada por tudo!*

*A todos os funcionários da biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ pelo apoio e pela atenção na finalização deste trabalho. Muito obrigada!*

*Enfim, agradeço a todos que de alguma forma, seja direta ou indiretamente, me auxiliaram e contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Deixo aqui meus sinceros agradecimentos e minhas desculpas caso tenha omitido o nome de alguém!*

# ÍNDICE

Abreviaturas .....	14
Resumo .....	16
Abstract .....	17
1. Introdução .....	18
2- <i>Capillaria hepatica</i> .....	20
2.1- Infecção por <i>Capillaria hepatica</i> .....	22
3- Células Estrelares Hepáticas (HSCs).....	23
3.1- Angiogênese .....	25
3.2- Angiogênese e Pericitos.....	28
4. Hipótese .....	30
5. Justificativa .....	30
6. Objetivos .....	31
6.1- Objetivo Geral .....	31
6.2- Objetivos Específicos.....	31
7. Material e Métodos.....	32
7.1 - Histopatologia.....	32
7.2 - Imunofluorescência.....	32
7.2.1 - Caracterização de antígenos de <i>Capillaria hepatica</i> .....	32
7.2.2 - Expressão da Laminina.....	33
7.3 - Imunohistoquímica.....	34
7.4 - Avaliação Morfométrica da Matriz Conjuntiva.....	35
7.5 - Avaliação Morfométrica das Células Actina-Positivas.....	35
8. Resultados.....	36
8.1 - Análise da infecção e progressão da fibrose septal.....	38
8.2 - Detecção de antígenos em animais infectados por <i>C. hepatica</i> .....	38
8.3 - Investigação da presença de células actina-positivas.....	38
8.4 - Avaliação Morfométrica da Matriz Conjuntiva.....	50

**8.5 - Avaliação Morfométrica das Células marcadas pela  $\alpha$ -actina de Músculo**

**Liso..... 53**

**9. Discussão..... 56**

**10. Conclusões..... 60**

**11. Referências..... 61**

## ABREVIATURAS

Ang1- Angiopoetina - 1

bFGF- Fator de crescimento do fibroblasto – b

CCl<sub>4</sub>- Tetracloreto de carbono

HSC- Célula estrelada hepática

EGF- Fator de crescimento endotelial

FLK-1- Fígado fetal quinase

FLT-1- Fms-Like tirosina quinase

HGF- Fator do crescimento do hepatócito

IFN- $\gamma$ - Interferon Gamma

IGF-1- Fator de crescimento de insulina – 1

IGF-like- Fator de crescimento semelhante a insulina

IL-1- Interleucina - 1

IL-4- Interleucina – 4

i.p.- Intraperitoneal

MCP-1- Proteína quimioatraente de monócito-1

MMP- Metaloproteinase de matriz

PDGF- Fator de crescimento derivado de plaqueta

PGDF-R – Receptor de PGDF

TGF- $\beta$ - Fator de Transformação do Crescimento beta

TGF- $\beta$ R- Receptor do Fator de Transformação do Crescimento beta

TGF- $\beta$ 1- Fator de transformação do Crescimento beta -1

TIMP- Inibidor de metaloproteinase tecidual

TNF- $\alpha$ - Fator de Necrose Tumoral alpha

VEGF- Fator de crescimento do endotélio vascular

## **RESUMO**

DINÂMICA DA ANGIOGÊNESE NA EVOLUÇÃO DA FIBROSE SEPTAL HEPÁTICA INDUZIDA POR *Capillaria hepatica*, EM RATOS.

Ratos infectados com o helminto *Capillaria hepatica* desenvolvem invariavelmente um tipo de fibrose septal que se origina em espaços porta e os conectam uns com os outros, resultando numa septação fibrosa sistematizada por todo o fígado. Vários aspectos peculiares deste interessante modelo de fibrose hepática foram estudados em nosso Laboratório, entre eles uns que demonstram a participação inicial e proeminente da angiogênese na patogenia deste processo.

Os septos são vascularizados e seus vasos, venosos (portais), acabam por fazer conexão, seja através dos sinusóides, seja diretamente, com o sistema venoso hepático. Ao longo do tempo os septos fibrosos paulatinamente vão desaparecendo, seja após infecção única ou repetidas, mas alguns persistem até pelo menos 2 anos após a infecção inicial única. O presente trabalho tem o objetivo de seguir a evolução deste processo de fibrose septal ao longo do tempo, tomando como orientação a participação dos elementos vasculares e matriciais, identificando-os nos seus componentes celulares básicos, ressaltando a participação das células actina-positivas (leiomiócitos, miofibroblastos e pericitos) ao longo de um período de evolução desde poucas semanas até 1 ano a partir de uma infecção inicial e única. Espera-se que um estudo seqüencial dinâmico, envolvendo os componentes celulares fundamentais, vasculares e matriciais, participantes do processo de fibrogênese e do remodelamento, ao longo do tempo, possibilite uma melhor visão da patogenia e do significado da fibrose septal hepática.

PALAVRAS-CHAVE: Angiogênese, Fibrose septal, Miofibroblastos, Pericitos, *Capillaria hepatica*

## **ABSTRACT**

DYNAMIC EVOLUTION OF ANGIOGENESIS DURING HEPATIC SEPTAL FIBROSIS INDUCED IN RATS BY INFECTION WITH *Capillaria hepatica*.

Rats infected with the helminth *Capillaria hepatica* invariably develop a process of septal fibrosis throughout the liver which originates in portal spaces, with porta-porta connections. Several aspects of this interesting model of hepatic fibrosis have been studied in our Laboratory, among them one that demonstrated an early and decisive participation of angiogenesis in pathogenesis. Septa are profusely vascularized and their branches, veins and capillaries, usually make connections with the venous system of the liver, both by means of the sinusoids, and directly with the hepatic veins.

With passing time the fibrous septa gradually diminish in number and thickness, either after single or repeated infections, but some of them persist up to over a year.

The present investigation represents an attempt to follow the evolution of the process of *C. hepatica*-induced fibrosis in rats, since its earliest stages up to one year, by following the behavior of the fundamental cellular and matrix elements that are involved in fibrogenesis. Morphologic and morphometric observations were based on the behavior of actin-positive cells (leiomyocytes, pericytes and myofibroblasts), collagen and associated proteins, in relation to vascular proliferation and regression.

It is hoped that this approach will shed some light for the understanding of the pathogenesis of fibrogenesis and remodeling on this particular and interesting experimental model of hepatic fibrosis.

KEY-WORDS: Angiogenesis, Septal Fibrosis, Myofibroblats, Pericytes, *Capillaria hepatica*



# INTRODUÇÃO

## 1- Aspectos Gerais

A infecção experimental pelo nematódeo *Capillaria hepatica* no rato, se acompanha do desenvolvimento de um tipo peculiar de fibrose hepática – a fibrose septal. Esta patologia caracteriza-se por vários septos fibrosos conectando espaços-porta entre si e, eventualmente, com veias centrais, representando um aspecto histológico comum em doenças crônicas do fígado. A fibrose hepática é formada como conseqüência do acúmulo de proteínas da matriz (principalmente os colágenos de tipos I, III, V e VII). Entretanto, os conceitos sobre a patogênese da fibrose hepática enfatizam a ativação de células perisinusoidais, situadas nos espaços de Disse (lipócitos hepáticos, células estreladas, células de Ito), as quais quando ativadas, assumiriam um fenótipo inicialmente de miofibroblasto, onde as gotículas de gordura cederiam lugar a um rico retículo endoplasmático, engajando-se assim na síntese aumentada de proteínas da matriz extracelular.

A angiogênese, processo que participa na progressão da fibrose é caracterizada pela formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes. Dentre os diversos fatores angiogênicos, o fator de crescimento vaso-endothelial (VEGF), apresenta papel fundamental na divisão, migração e formação tubular das células endoteliais. Acreditava-se que a angiogênese participava apenas do processo de reparo, onde após a inflamação crônica, o tecido lesado iniciava a deposição de material conjuntivo reparando os danos causados no tecido. Entretanto, Rosmorduc *e cols.* (1999) verificaram o aumento da síntese do VEGF após a hipóxia hepatocelular no modelo de cirrose biliar experimental em ratos, concluindo que este fator poderia ser o promotor da proliferação micro-vascular associada à fibrose hepática. Esses achados estreitaram a relação entre os processos de angiogênese e a fibrose.

Estudos em nosso Laboratório demonstram uma acentuada angiogênese ocorrendo no início da deposição de colágeno no processo fibrótico, através da infecção por *C. hepatica* em ratos (Souza e cols., 2006). Desta forma, a fibrose induzida pela *C. hepatica* em ratos trata-se de um modelo extremamente interessante para pesquisas sobre fibrose hepática, especialmente sobre patogenia e tratamento. Dentro deste contexto, Souza e cols., (2000), utilizando o modelo de infecção pela *C. hepatica* demonstraram uma significativa redução da fibrose utilizando diversas drogas com potencial anti-fibrótico: pentoxifilina, cloreto de gadolínio e vitamina A. Entretanto, a pentoxifilina foi a mais efetiva na redução da fibrose quando comparada com as demais drogas.

No presente estudo, a evolução e a regressão da fibrose são analisadas ao longo de um tempo prolongado, em ratos infectados experimentalmente pela *C. hepatica*. A identificação dos elementos celulares (miofibroblastos e pericitos) e suas correlações com o aparecimento, progressão e regressão da fibrose ao longo de um tempo forneceram dados não só sobre a dinâmica da fibrose na capilaríase do rato, mas sobre as peculiaridades da patogenia da fibrose hepática em geral.

Os principais achados sugerem a intensa participação dos pericitos e dos miofibroblastos, no processo de fibrogênese, os quais foram caracterizados pela expressão de alfa-actina de músculo liso nos períodos iniciais da infecção; observamos também, em contraposição, a diminuição dessa expressão na fase avançada do processo fibrótico, que corresponde à fase de regressão e estabilização desse processo patológico onde os miofibroblastos, por vezes, estão completamente ausentes.

## 2- *Capillaria hepatica*

A *C. hepatica* é um helminto nematódeo, tricuroídeo, cosmopolita, muito comum como parasito do rato e de outros roedores. Contudo, este helminto também pode ser encontrado parasitando numerosas espécies de mamíferos, como a lebre, o cão, o gato, o macaco, entre outros (Moura, 1991) bem, como visto mais recentemente, as espécies de marmota, *Marmota monax* (Hilken *e cols.*, 2003) e *Marmota marmota* (Gortazar *e cols.*, 1996).

Dados na literatura mostram que a infecção humana pela *C. hepatica*, geralmente é apresentada como muito rara, extremamente grave, comumente fatal, ocorrendo em condições especiais, dentre estas, freqüentemente acidentais, que favorecem a ingestão, pelo homem, de grande quantidade de ovos embrionados do parasito. Essa ingestão resultará numa invasão maciça de larvas, seguida da localização, diferenciação e desintegração dos vermes e seus ovos no fígado provocando intensa reação inflamatória do tipo granulomatosa, proliferação de fibroblastos, acompanhada de fibrose multi-focal. (Cochrane *e cols.*, 1957; Piazza *e cols.*, 1963; Pereira & Mattosinho França, 1983, Yfanti *e cols.*, 1996; Sawamura *e cols.*, 1999). As principais características clínicas são: o aparecimento de dores abdominais, febre persistente, hepatomegalia e leucocitose com eosinofilia.

Morfologicamente, a fêmea da *C. hepatica* mede 2cm de comprimento enquanto o macho mede apenas a metade. O verme adulto 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 ainda, dimorfismo sexual (Wright, 1961). Os ovos são muito parecidos com os do tricocéfalo, com as mesmas cascas e rolhas polares, porém a membrana mais externa é atravessada por minúsculos canais que lhe emprestam aspecto estriado muito característico (McQuowm, 1954).

O ciclo vital da *C. hepatica* é direto, ou seja, independente de um hospedeiro intermediário. Os estágios larvais (L2-L4) e os vermes adultos são encontrados somente no interior do fígado do hospedeiro. O início do ciclo ocorre através da ingestão de ovos embrionados pelo hospedeiro. Estes ovos passam pelo tubo digestivo e eclodem ao nível do ceco, onde as larvas do primeiro estágio (L1) poderão ser encontradas. Posteriormente, essas larvas migram através das paredes intestinais e “caem” na corrente sanguínea pelo sistema porta-hepático. No fígado, as larvas atingem os estágios de L2, L3 e L4, e se transformam em vermes adultos. Esses vermes adultos têm seus ovos fecundados e liberados em torno das fêmeas, em pleno parênquima hepático. Muitos são liberados após a morte espontânea dos vermes, o que no rato, acontece habitualmente por volta do primeiro mês da infecção. Os ovos são depositados imaturos, e, enquanto estiverem no interior do fígado, irão conservar-se.

Existem duas possibilidades da eliminação dos ovos para o meio exterior, sendo, após a morte do hospedeiro e desintegração da sua carcaça ou quando um predador ingere ovos não-embrionados do fígado da sua presa e os elimina nas fezes. Portanto, a *C. hepatica* pertence ao grupo dos geo-helminths, ou seja, parasitos transmitidos a partir da contaminação do solo (Moura, 1991).

Em ratos de esgoto (*Rattus norvegicus*), a infecção atinge de 40 a 90% (Moura 1991). Chieffi e cols., (1981) necropsiaram 205 (191 *Rattus norvegicus* e 14 *Rattus rattus*) murídeos capturados vivos no município de São Paulo e verificaram que destes, 59% estavam parasitados por *C. hepatica*. Galvão verificou que 57% dos ratos capturados em Salvador, BA também albergavam a *C. hepatica*.

## 2.1- Infecção por *Capillaria hepatica*

A infecção causada pela *C. hepatica* pode se fazer sob duas formas: 1) Espúria: quando ocorre a ingestão, pelo hospedeiro, de ovos não-embrionados, e neste caso, os ovos passam intactos por todo o tubo digestivo, sendo eliminados nas fezes. A única consequência para o hospedeiro consiste no aparecimento de anticorpos circulantes contra o parasito, o que nem sempre acontece; 2) Verdadeira: Quando há ingestão de ovos embrionados, os quais contêm larvas infectantes e prontas para serem liberadas e completarem o ciclo no interior do novo hospedeiro.

Para ocorrer o embrionamento dos ovos é necessário o contato dos ovos imaturos com o meio exterior, conservando-se num ambiente propício, com luminosidade, umidade e temperatura adequadas (25 a 27°C). O processo tem duração de aproximadamente 30 dias para que ocorra a diferenciação de uma larva no interior dos ovos, tornando-os infectantes.

Ainda são pouco conhecidas as circunstâncias como o homem vem a se contaminar. O elevado grau de infecção dos ratos no Brasil (Galvão, 1976; Chieffi *e cols.*, 1981) bem como a existência de uma grande parcela da população mundial vivendo em condições precárias de higiene, contribuem para a existência da infecção humana por *C. hepatica*. Pode-se deduzir também que ovos presentes no solo e alimentos, carreados pelo vento, pela água, por insetos, etc, podem vir a ser deglutidos pelo homem, como também existe a possibilidade de animais domésticos, como gatos, que predam ratos infectados, eliminarem os ovos imaturos do parasito nas fezes, auxiliando para a sua disseminação no meio doméstico.

Recentemente, Lemos *e cols.*, (2002) através de sucessivas injeções i.p. de soro de porco, o qual induz a fibrose septal, demonstraram que ratos tolerizados com tal soro desde a

fase neonatal e posterior infecção por *C. hepatica*, apresentaram uma inibição parcial na formação da fibrose septal quando comparados com aqueles que foram infectados por *C. hepatica* na vida adulta, sugerindo que há uma base imunológica na formação dessa fibrose.

Fatores de crescimento como o PDGF, o TGF- $\beta$ 1 e o TGF- $\beta$ 1-R, que já foram descritos na literatura como participantes do processo de angiogênese e fibrogênese, participam em conjunto com o VEGF, estimulando tanto células endoteliais quanto células estreladas, induzindo-as a se transdiferenciarem (Dollecki & Connolly, 1991; Folkman & Klagsbrun, 1987; Folkman 1995 A, B; Gospodarowicz *e cols.*, 1987; Leveen *e cols.*, 1994; Pertovaara *e cols.*, 1994; Shibuya, 1995). Dados da literatura demonstram também, através de marcações imunohistoquímicas contra o fator de Von Willebrand (fator VIII),  $\alpha$ -actina de músculo liso, colágeno tipo IV e laminina (Souza *e cols.*, 2004) que a angiogênese parece exercer uma importante participação no início do processo da formação da fibrose septal hepática.

Diante dos relatos supracitados, nosso Laboratório vem investigando o processo e quais mecanismos estão envolvidos na gênese da fibrose septal, bem como sua patogenia e tratamento, através do modelo de infecção pela *C. hepática* (Souza *e cols.*, 2000).

### **3- CÉLULAS ESTRELARES HEPÁTICAS (HSCs)**

O parênquima hepático é composto por diversos tipos celulares, principalmente, por células hepáticas (hepatócitos), as células endoteliais de sinusóides, as células estrelares hepáticas (HSCs), células de Kupffer, células progenitoras e outros tipos celulares como, por exemplo, as células dendríticas. Os elementos celulares do parênquima hepático se organizam entre os sinusóides e, no espaço de Disse onde se encontra as células estrelares, compreende a região entre o pólo apical (sinusoidal) dos hepatócitos e a parede sinusoidal (Sato *e cols.*, 2003).

As células estreladas são pericitos especiais que desempenham diversas funções: 1) armazenagem de vitamina A no fígado; 2) produção de componentes da matriz extracelular e metaloproteinases (juntamente com as células de Kupffer); 3) produção de fatores de crescimento e citocinas; 4) contração e dilatação do lúmen sinusoidal em resposta à endotelina, angiotensina, tromboxanos ou prostaglandinas (Sato *e cols.*, 2003). As células estelares hepáticas participam ainda do desenvolvimento e regeneração do tecido hepático, reorganização da matriz extracelular hepática e desenvolvimento da fibrose. Estas células são consideradas as principais células mesenquimais na produção de componentes da matriz extracelular, incluindo os colágenos tipo I, III, IV e VI, fibronectina, laminina e proteoglicanos (Roskams *e cols.*, 2004).

Em várias condições patológicas, as células estelares hepáticas proliferam e migram em direção às áreas de necrose e regeneração. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), produzido pelas células de Kupffer estimulam a mitose das HSCs (Battaler & Brenner, 2005). Há também outro mecanismo de sinalização importante neste processo entre as células de Kupffer e as HSCs: os radicais de oxigênio reativos produzidos pelas células de Kupffer podem aumentar a ativação das HSCs e como consequência aumentar a deposição de colágeno. Todos os dados mencionados suportam a hipótese de que as células de Kupffer exercem um papel chave na ativação das células estreladas e/ou no aumento de sua capacidade de produzir componentes da matriz extracelular na doença hepática (Battaler & Brenner, 2005). Outras células produtoras de radicais de oxigênio, como neutrófilos, também podem estimular diretamente a ativação das células estelares no fígado.

Após ativação, ocorre o desencadeamento de um período conhecido como perpetuação, mantendo o fenótipo das células estelares ativado, podendo gerar fibrose. Esse período é mantido por vários processos: continuação da proliferação baseada em citocinas como o PDGF;

pela quimiotaxia de células estelares aos pontos de inflamação; pela contínua fibrogênese, contratilidade e degradação da matriz extracelular através da produção de metaloproteínas. Nesse momento, as HSCs ativadas desenvolvem um fenótipo característico de miofibroblasto, adquirindo características contráteis, pró-inflamatórias e fibrogênicas (Battaler & Brenner, 2005). De acordo com as características ultraestruturais e na expressão de vimentina, desmina e  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA), as HSCs são referidas como miofibroblastos (Roskams *e cols.*, 2004).

No que pese a importância das células estreladas na fibrogênese hepática, os estudos com o modelo da fibrose septal associada à capilaríase do rato não conseguiram demonstrar uma participação relevante de tais células no processo (Fonseca *e cols.*, 2005; Souza *e cols.*, 2006).

O excessivo acúmulo de colágeno no fígado durante o processo fibrogênico envolve além dos macrófagos e células perisinusoidais, a síntese de proteínas específicas, as metaloproteínas e seus inibidores.

### **3.1- ANGIOGÊNESE**

A formação de novos vasos via brotamento de células endoteliais maduras de vasos pré-existentes pode ser caracterizada pelo processo de angiogênese (Yanconpoulos *e cols.*, 2000). Este processo é extremamente importante para a regularização do fluxo sanguíneo e aporte de oxigênio e nutrientes além de transportar as células de defesa para tecidos lesados (Walsh & Pearson, 2001).



A angiogênese é controlada por um equilíbrio entre fatores endógenos, sendo promotores e inibidores, onde participam desse processo diferentes tipos celulares, proteínas da matriz e outros vários fatores solúveis (Ueno *e cols.*, 2006). Portanto, a angiogênese é um processo complexo que envolve desde mediadores solúveis, interações célula-célula e célula-matriz extracelular, além de forças biomecânicas.

O processo angiogênico pode ser resumido nas seguintes etapas: 1) lise da membrana basal que circunda o vaso por proteases secretadas pelas células endoteliais; 2) migração de células endoteliais circulantes para o sítio de formação do vaso, onde proliferam e formam uma espécie de broto; 3) nova proliferação e diferenciação das células endoteliais com conseqüente crescimento e formação da luz do novo vaso; 4) secreção de fatores de crescimento pelas células endoteliais que atraem células de suporte (pericitos e células musculares lisas), formando a membrana basal. Tanto as células de suporte como a membrana basal são essenciais para o funcionamento e estabilidade do vaso formado. Nesse estágio final, os vasos adquirem características especializadas adequadas ao tecido ou órgão a que pertencem (Gerwins *e cols.*, 2000; Jain, 2003).

Em doenças não-neoplásicas, a inflamação e a hipóxia contribuem para a angiogênese, além de estimularem o processo angiogênico em diversas desordens. Monócitos, macrófagos, plaquetas, mastócitos e outros leucócitos liberam milhares de fatores angiogênicos incluindo: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), angiopoetina (Ang1), fator de crescimento de fibroblasto beta (bFGF), fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ 1), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento do hepatócito (HGF), fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1),

proteína quimiotática para monócito (MCP-1) entre muitas outras (Pinedo *e cols.*, 1998; Seljelid *e cols.*, 1999).

Dentre os fatores descritos como angiogênicos, o VEGF apresenta papel central na divisão, migração e formação tubular das células endoteliais vasculares (Mustonen & Alitalo, 1995; Brown *e cols.*, 1997; Ferrara & Davis-Smyth, 1997). O VEGF possui uma potente habilidade em aumentar a permeabilidade vascular e a vasodilatação, onde esta promove o aumento do fluxo sanguíneo precedendo a angiogênese (Nagy *e cols.*, 2007). Rosmorduc *e cols.* (1999) sugeriram ainda, que a angiogênese é estimulada primariamente pelo VEGF em resposta à hipóxia hepatocelular.

O VEGF é uma glicoproteína ligada a heparina com peso molecular de 45 Kda, que possui dois receptores: o FLT-1 (Fms-Like Tirosina quinase) e FLK-1 (Fígado Fetal quinase), ambos tirosina quinase transmembrana, regulados pela hipóxia. Acreditava-se que os receptores VEGFR tirosina quinase eram específicos das células endoteliais e, no entanto, sabe-se que várias células expressam ambos receptores.

Outros dois fatores apresentam importante papel no processo de angiogênese: o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (Folkman & Klagsbrun, 1997; Gospodarowicz *e cols.*, 1987; Levven *e cols.*, 1994). O FGF promove a angiogênese por um efeito direto ou indireto nas células endoteliais, seja ele produzido em células tumorais ou também em outros tipos de células normais, inclusive as endoteliais. Desta forma, o FGF atua induzindo a replicação e a migração das células endoteliais ou regula a expressão do VEGF.

Os estudos sobre angiogênese davam ênfase apenas nos componentes endoteliais, entretanto sabe-se que os capilares sanguíneos são constituídos por dois tipos celulares: as células endoteliais e os pericitos. Inicialmente descritas por Charles Rouget como célula de

músculo liso devido à presença de actina, os pericitos são células perivasculares que estão mergulhadas na membrana basal dos microvasos e estão em contato íntimo com as células endoteliais, onde compartilham íons, pequenas moléculas e também servem de suporte para as mesmas. Rajumar *e cols.*, (2005) descrevem a capacidade dos pericitos em se transformar em miofibroblasto durante o processo fibroso.

### 3.2- ANGIOGÊNESE E PERICITOS

Fisiologicamente, a angiogênese ocorre principalmente durante o desenvolvimento embrionário e na fase pós-natal. Em adultos, esse processo é raro, podendo ser observado principalmente no sistema reprodutor feminino, durante o ciclo menstrual e na gravidez. A forma patológica da angiogênese pode ser encontrada em inúmeras doenças, como câncer, retinoblastia diabética, degeneração macular, psoríase, artrite reumatóide, entre outras relacionadas com a idade. Ela é o elemento chave no processo de reparo dos ferimentos. A neovascularização também pode ser considerada maléfica, causando efeitos negativos em determinadas doenças e contribuindo para a progressão de outras. Esses efeitos podem ser caracterizados pela permeabilidade vascular anormal, remodelamento vascular e maturação defeituosos, promovendo hemorragia e inflamação (Holger Gerhardt & Christer Betsholtz, 2003).

Os pericitos e as células musculares lisas encontram na interface entre o endotélio e o tecido circundante (Figura 1) e, estão posicionados para participarem ativamente no processo angiogênico (Allt & Lawrenson 2001; Sims 1986).

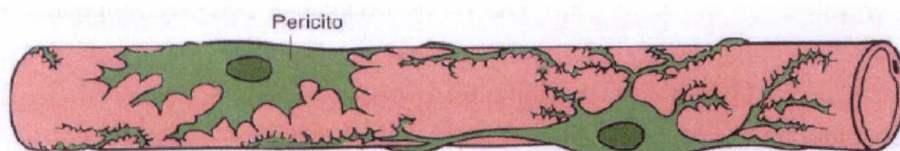
Hellstron *e cols.*, (2001), demonstrou através da análise da microvasculatura do PDGF em cérebro de embrião, que o processo angiogênico ocorre mesmo na ausência dos pericitos.

No entanto, os mesmos autores demonstraram que a ausência de pericito no PDGF coincide com hiperplasia endotelial, sugerindo que os pericitos possam controlar negativamente a proliferação endotelial.

Os pericitos parecem exercer um controle morfogênico no diâmetro capilar devido a sua habilidade contráctil. Interessantemente, o PDGF-B foi recentemente adicionado à lista de agentes que regulam a contração dos pericitos (Sakagami *e cols.*, 2001). O diâmetro do vaso deficiente de pericito é anormal, variando de forma extensiva, promovendo a idéia de que na presença dessas células, o vaso possui diâmetro uniforme.

É possível que os pericitos constituam uma reserva celular para a formação de um tecido não-vaso, remodelamento ou reparo, por exemplo, formação da medula (Diaz-Flores *e cols.*, 1992; Doherty & Canfield, 2000). Os pericitos possuem um fenótipo intermediário entre as células do músculo liso e fibroblastos, com a capacidade de se diferenciarem após seu direcionamento. Além disso, os pericitos contribuem na formação dos componentes fibróticos, na cicatrização e em outras situações de inflamação associada com tecido fibroso.

Diante desse contexto, torna-se essencial um estudo dinâmico do processo angiogênico, descrevendo quais células matriciais e quais elementos vasculares estão envolvidos no processo de fibrogênese, utilizando-se do modelo de infecção por *C. hepatica*. Assim, neste estudo buscamos esclarecer a patogenia bem como o significado da fibrose septal hepática, auxiliando em futuras terapias para esta patologia.



**Figura 1: Pericitos apoiados nas células endoteliais de um capilar.**

## **4- HIPÓTESE**

Um estudo seqüenciado das células actina-positivas presentes na fibrose septal hepática induzida por *Capillaria hepatica* no rato, ao longo de um tempo relativamente prolongado, comprovará a demonstração da participação da angiogênese na sua patogenia, ao destacar o comportamento dinâmico dos seus elementos celulares (pericitos e miofibroblastos) ao longo do processo fibrogênico.

## **5- JUSTIFICATIVA**

O acompanhamento da progressão e regressão da fibrose septal, acompanhada através do comportamento dinâmico dos elementos chaves da sua patogenia por um período prolongado, poderá fornecer dados não somente sobre a dinâmica da fibrose septal na capilaríase do rato, mas também sobre algumas peculiaridades da patogenia da fibrose hepática em geral, auxiliando na compreensão dos mecanismos envolvidos, e favorecendo pesquisas futuras e conseqüente desenvolvimento de terapêuticas mais efetivas.

## 6- OBJETIVOS

### 6. 1. Objetivo geral

Descrever a dinâmica da angiogênese no desenvolvimento da formação, progressão e regressão da fibrose septal hepática induzida por *Capillaria hepatica*, em ratos.

### 6. 2. Objetivos específicos

- Descrever e medir as variações celulares e matriciais que ocorrem durante a formação, evolução e regressão da fibrose septal no fígado de ratos infectados por *C. hepatica*.
- Identificar a participação das células actino-positivas associadas, com a formação e regressão da fibrose septal ao longo do tempo;
- Verificar a variação dos elementos associados com a angiogênese de acordo com os períodos de fibrogênese intensa (inicial), moderada (intermediária) e de regressão (final);
- Correlacionar a angiogênese com a presença de elementos parasitários e as modificações dos vários componentes da matriz extracelular.

## 7- MATERIAL & MÉTODOS:

Os blocos em parafina contendo o material utilizado neste estudo foram retirados dos arquivos do LAPEX (CPqGM) e provieram de ratos Wistar, que pesavam entre 200-300 g, e vinham sendo mantidos em condições controladas, com água e ração *ad libitum* no Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.

O procedimento de infecção por *C. hepatica* já está bem padronizado em nosso laboratório e, cada animal do material arquivado selecionado, foi infectado por entubação intragástrica, inoculando 500 ovos embrionados de *C. hepatica*. Em cada ponto, cinco animais foram submetidos à biópsia hepática.

Os blocos foram selecionados de acordo com o período de interesse para o presente estudo e compreendiam os períodos de 10, 14, 20 e 50 dias, e 4, 6 e 12 meses após a infecção experimental, de acordo com os dados de *Souza e cols.*, (2006). As secções histológicas obtidas foram submetidas às seguintes técnicas:

**7. 1. Histopatologia:** Para a análise do grau da infecção e da fibrose septal, os blocos contendo fragmentos de fígado fixados em formol Milloning (pH 7.4), foram cortados em micrótomo e as secções de 5 µm de espessura foram coradas pelos métodos de Hematoxilina-Eosina, picrossírius-vermelho contrastado com verde luz para a evidenciação de fibras colágenas.

### 7. 2. Imunofluorescência:

#### 7.2.1 - Caracterização de antígenos de *Capillaria hepatica*

Para a caracterização da presença de antígenos em animais infectados por *C. hepatica*, o soro foi coletado e submetido ao ensaio de imunofluorescência. Para a realização desta etapa, os fragmentos de tecido hepático fixados em parafina foram desparafinizados, desidratados, lavados em água corrente e em seguida em água destilada. Posteriormente, a inibição das ligações inespecíficas foi realizada utilizando leite desnatado, diluído a 10% em PBS pH 7,4 à temperatura ambiente. Em seguida, para a marcação dos antígenos no tecido hepático, o soro de camundongo infectado pela *C. hepatica* foi colocado sobre as secções (1:1), a 37 °C. Após 30 minutos, o material foi lavado com PBS (3 banhos de 5 minutos) e adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), (Sigma-USA), diluído em PBS (1:60) e azul de Evans (1:2). O material foi acondicionado em câmara úmida a 37 °C por 30 minutos. Os cortes marcados foram examinados em microscópio Zeiss, Axioskop, com epiiluminação provida de lâmpada HBO de vapor de mercúrio potência 50w, com filtro de barreira e excitador apropriados para fluorescência.

### **7.2.2 - Expressão da Laminina**

Fragmentos de tecido hepático representativos dos diferentes períodos em estudo e que foram previamente criopreservados em nitrogênio líquido e preservados a -70°C foram submetidos ao ensaio de imunofluorescência para a detecção da laminina. Para a realização desta etapa foram obtidas secções de 5µm de espessura de fragmentos de tecido hepático a partir de um criostato a -20°C. Estas secções foram posteriormente fixadas em acetona gelada por cinco minutos e acondicionadas em freezer a -20°C. Posteriormente, foram hidratadas com PBS (pH 7,4) por cinco minutos e procedeu-se o bloqueio das reações inespecíficas com 10% de leite desnatado em PBS e em seguida, as secções foram incubadas em câmara úmida como



anticorpo anti-laminina (1:100) a 37<sup>0</sup>C por 30'. O anticorpo anti-laminina (Ref. 24851, Lot. 188) foi produzido em coelho, no Instituto Pasteur em Lyon (França) e cedido pelo Dr. Jean-Alexis Grimaud. Após a marcação com o anticorpo primário as lâminas foram lavadas com PBS (pH 7,4) e em seguida, adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (SIGMA, USA) conjugado com isocianato de fluoresceína diluído em PBS (1:20) e azul de Evans, sendo as lâminas acondicionadas em câmara úmida a 37<sup>0</sup>C por 30'. Os cortes marcados foram examinados em microscópio Zeiss, Axioskop, com epiiluminação provida de lâmpada HBO de vapor de mercúrio potência 50w, com filtro de barreira e excitador apropriados para fluorescência.

**7. 3. Imunohistoquímica:** Para a realização desta etapa, os fragmentos de tecido hepático fixados em parafina foram seccionados em micrótomo e secções de 5µm de espessura foram montadas em lâminas pré-tratadas com Poly-L-Lisina a 10% (SIGMA ST. Louis, Mo. USA). As lâminas foram desparafinizadas em xilol (3 banhos de 10 minutos), posteriormente, colocadas em álcool absoluto (2 banhos, de 5 minutos), lavadas em água corrente (4 banhos) e por fim, com água destilada (4 banhos). Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica em tampão citrato (pH 6,0) em banho-maria por 30 minutos, a 96 <sup>0</sup>C. Após a hidratação com PBS (5') foi feito o bloqueio da peroxidase endógena usando o bloqueador de peroxidase endógena (DAKO Envision System) por 30 minutos. Os cortes foram lavados em água destilada e hidratados com PBS/BSA (2 banhos de 5 minutos). Imediatamente depois, a inibição das ligações inespecíficas foi realizada utilizando leite desnatado a 10% em PBS (pH 7,4), por 20', à temperatura ambiente. As secções foram então incubadas em câmara úmida com o anticorpo primário monoclonal anti-alfa actina humano produzido em camundongos (DAKO, Clone 1A4,

Lot. M0851) e deixadas na geladeira (4<sup>0</sup>C) toda a noite. No dia seguinte, após o equilíbrio da temperatura, por 1 hora, as secções foram lavadas com PBS (3 banhos de 5 minutos) e então, foi colocado o anticorpo secundário (30') produzido em cabra anti-coelho conjugado à peroxidase (DAKO Envision System-Labelled polymer). O material foi lavado com PBS (3 banhos de 5 minutos) e procedeu-se a revelação com DAB (Kit da DAKO). Posteriormente, as secções foram contra-coradas com Hematoxilina de Mayer e montadas para a visualização ao microscópio ótico.

**7. 4. 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, secções teciduais de 5 mm foram coradas pelo Picrosírius - Vermelho (Junqueira *e cols.*, 1979) e, posteriormente, submetidas ao teste morfométrico. Para a realização desta etapa, foi utilizado o microscópio Leica, equipado com o Sistema de Análise de Imagens QWIN 3.1. Para cada período, foi avaliada uma área seccional total de 1,04 x 10<sup>7</sup> mm<sup>2</sup>, e consideradas apenas as fibras marcadas neste procedimento. Empregou-se a objetiva de 4x em 5 campos microscópicos, selecionados aleatoriamente.

**7. 5. Avaliação Morfométrica das Células Actina-Positivas:** Para avaliarmos o número de células marcadas pela  $\alpha$ -actina de músculo liso nas secções obtidas de fígados de ratos Wistar infectados por *Capillaria hepatica*, secções teciduais de 5 mm foram submetidas à técnica de imunohistoquímica. Em seguida, o material foi submetido ao teste morfométrico, utilizando o microscópio Leica equipado com o Sistema de Análise de Imagens QWIN 3.1. Para cada período, foi analisada uma área seccional total de 1,5 x 10<sup>6</sup> mm<sup>2</sup>, Empregou-se a objetiva

de 10x em 5 campos microscópicos, selecionados aleatoriamente. Foram consideradas todas as células marcadas positivamente.

## **8- RESULTADOS**

### **8.1. Análise da infecção e progressão da fibrose septal**

A infecção pelo helminto *C. hepatica* foi confirmada pela intensa presença de vermes e ovos imaturos no parênquima hepático. A fibrose septal hepática também foi desenvolvida e, sua progressão foi observada principalmente, após 20 dias de infecção. A partir do 20<sup>o</sup> dia de infecção, observaram-se lesões focais acompanhadas por uma intensa reação inflamatória com predomínio de células mononucleares (Prancha 1). Os septos fibrosos, os quais foram originados a partir dos espaços-porta, foram proeminentes a partir de 20 dias, permanecendo até 12 meses de infecção, com menor intensidade. As fibras colágenas presentes nas lesões focais e na formação dos septos foram observadas na coloração por picrossírius - vermelho. A presença dessas fibras também foi observada com 12 meses de infecção. (Prancha 2).

A angiogênese foi mais evidente no início da infecção, podendo ser evidenciada também nos períodos mais tardios, onde alguns vasos, no interior da fibrose septal, mesmo após 12 meses de infecção ainda estavam presentes (Prancha 3).

Com 50 dias de infecção, foi possível demonstrar a extensão dos septos fibrosos pelo parênquima hepático, conectando-se com espaços-porta e, eventualmente com veias centrolobulares, o que a demonstração de células actino-positivas (leiomiócitos, pericitos e miofibroblastos) ajudou na sua evidenciação (Pranchas 4 e 5).

Após 4 meses de infecção, os septos fibrosos bem como restos de vermes e ovos puderam ser observados, porém, com menos intensidade quando comparados com os períodos iniciais da infecção.

## **8.2. Detecção de antígenos em animais infectados por *C. hepatica***

A presença de antígenos de *C. hepatica* foi bem evidenciada nos períodos iniciais da infecção, principalmente com 14 e 20 dias. Nos períodos tardios, foi possível observar poucos antígenos presentes nos espaços-porta.

A partir dos 4 meses de infecção, os antígenos de *C. hepatica* apresentavam-se distribuídos, principalmente, nos espaços-porta e alguns pelo parênquima hepático.

A presença desses antígenos colabora com a manutenção dos septos fibrosos que ainda estão presentes após os 4 meses de infecção. Neste ensaio, a marcação demonstra a presença de ovos e que os mesmos estão viáveis em períodos tardios da infecção.

## **8.3. Investigação da presença de células actina-positivas**

Nos períodos iniciais da infecção, 14, 20 e 50 dias, observou-se intensa participação das células actina positivas (pericitos e miofibroblastos) acumulando-se, principalmente na região dos espaços-porta. Observou-se também a presença dessas células em torno da veia centrolobular, conectando vários septos entre si por todo o parênquima hepático. No entanto, mesmo com a intensa marcação dessas células no período de 50 dias de infecção, a proporção começa a ser menor quando comparada com os períodos de 14 e 20 dias.

Após 4 meses de infecção, observou-se uma moderada a discreta presença desses pericitos e miofibroblastos nas regiões dos espaços-porta. Entretanto, a marcação apresenta-se mais evidente nos septos fibrosos, os quais estão mais intensos quando comparados com os períodos iniciais da infecção.

Aos 6 e 12 meses de infecção, os septos fibrosos estão proeminentes, conectando espaços-porta entre si sendo nessa região que pode-se encontrar a presença dos pericitos e miofibroblastos. Contudo, nos espaços-porta, a presença dessas células passa a ser discreta.

Nesta investigação, observamos também a presença dessas células actina-positivas nas lesões focais causadas pelos ovos do parasito, distribuídos ao redor dos espaços-porta e pelo parênquima hepático.

## PRANCHA 1

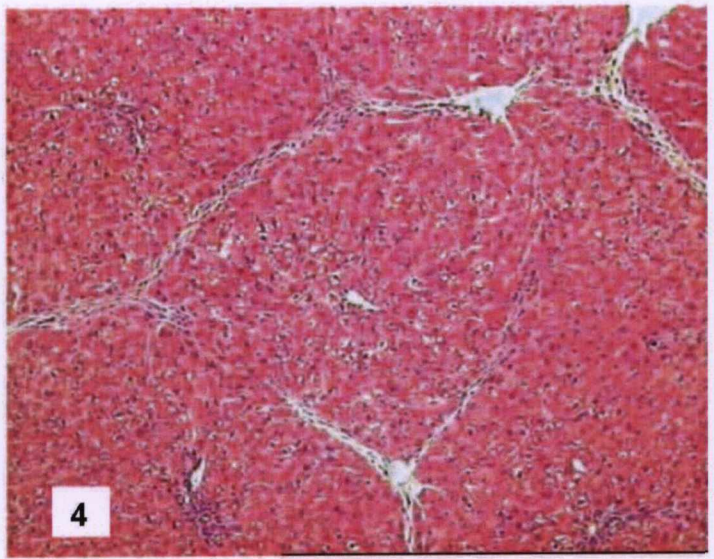
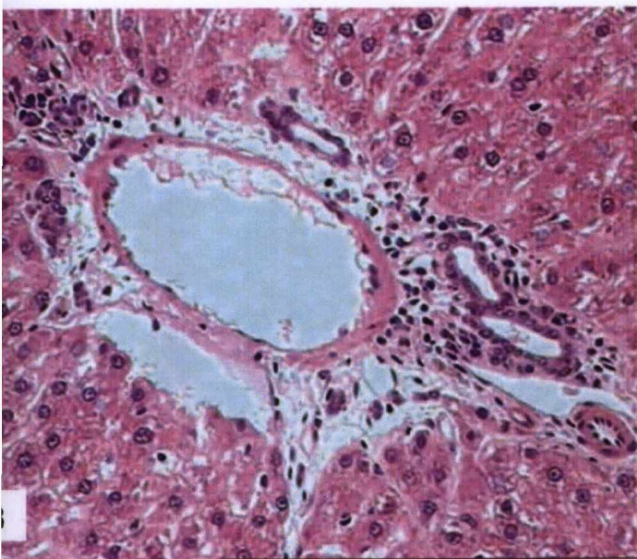
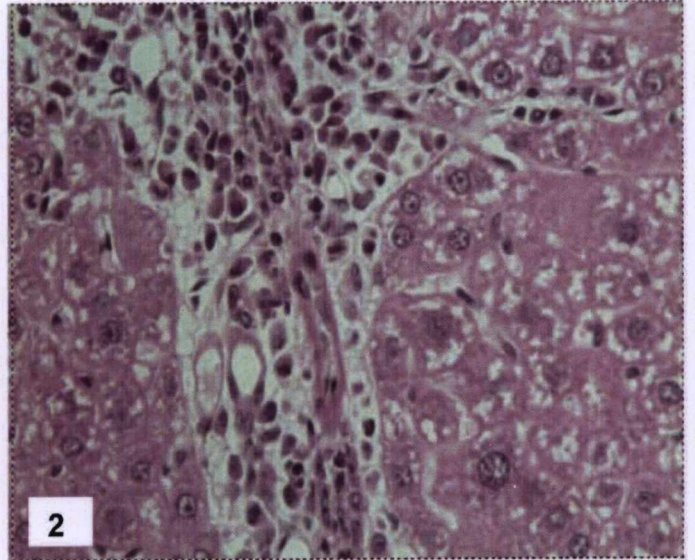
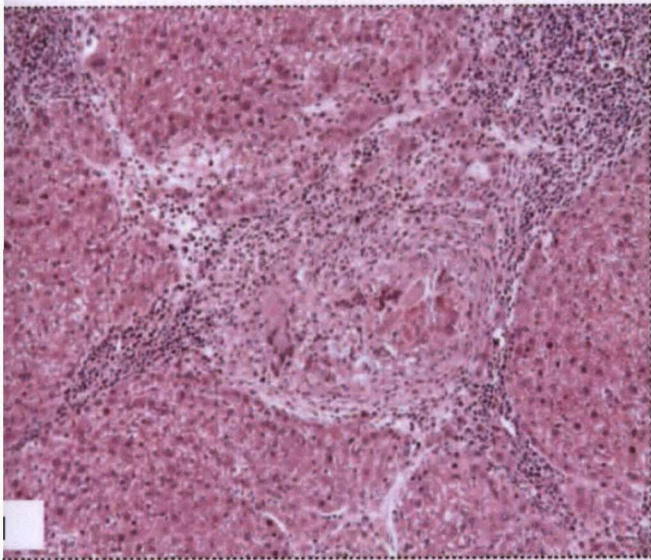
**Fig. 1 - Aspecto inicial da fibrose septal, onde se vê na parte central da figuras evidência da lesão parasitária, com restos de uma formação granulomatosa contendo algumas células gigantes. Os septos iniciais já começam a aparecer celulosos e a se irradiar a partir de pequenos espaços porta. Infecção de 20 dias. H&E, 10X.**

**Fig. 2 – Detalhe de um septo na fase inicial de sua formação onde se notam a rica vascularização e a presença de muitas células mononucleares. H&E, 100X.**

**Fig. 3 – Proliferação de células mononucleares distribuídas, sobretudo em torno de ductos biliares. Infecção de 3 meses de duração. H&E, 200 X.**

**Fig. 4 – Vista panorâmica da fibrose septal plenamente desenvolvida aos 50 dias de uma infecção por *Capillaria hepatica*. H&E, 100X.**

# PRANCHA 1





## PRANCHA 2

**Figuras 1 a 4 - Aspectos da distribuição do colágeno na fibrose septal da capilaríase do rato mostrando variação de densidade em diferentes períodos da evolução da infecção. Coloração pelo método do Picrosírius - Vermelho**

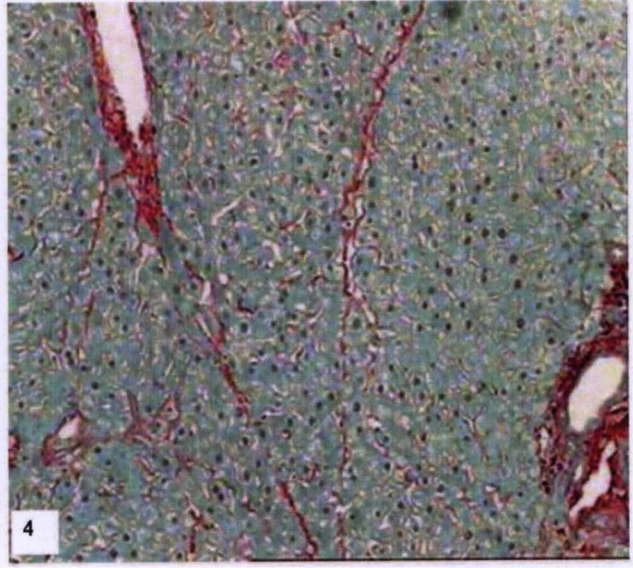
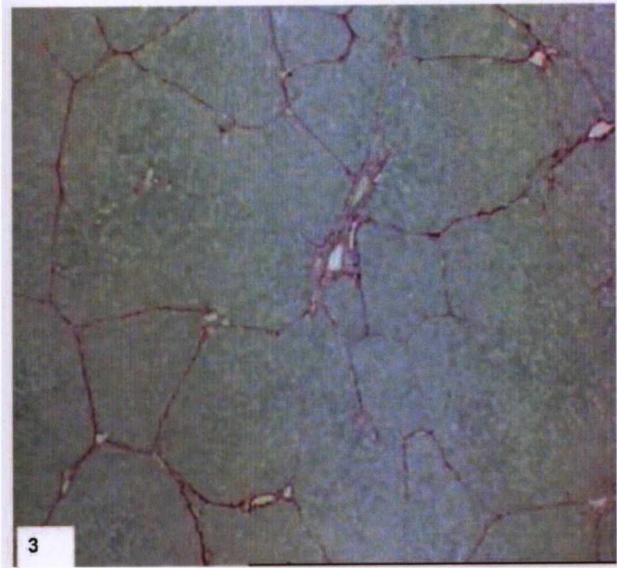
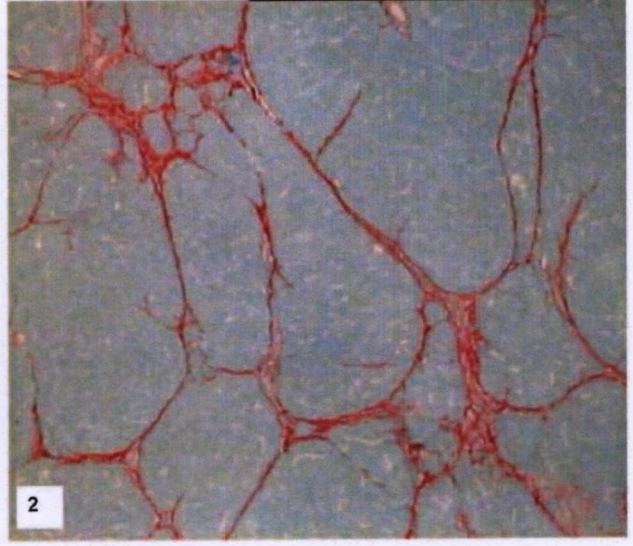
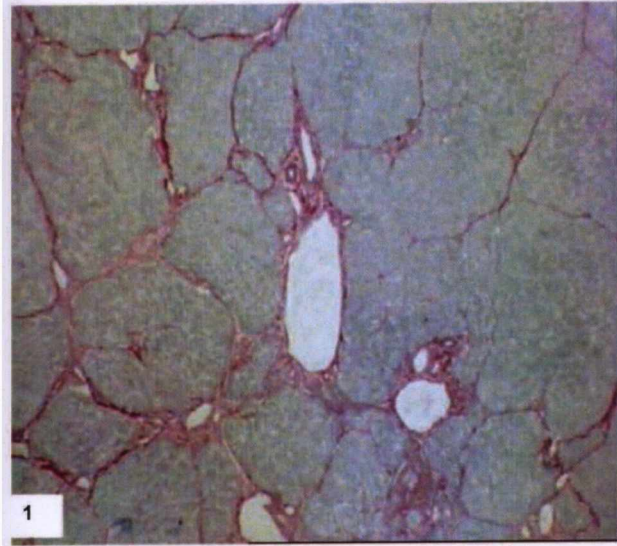
**Fig 1 -100X, 20 dias.**

**Fig 2 – 200X, 50 dias.**

**Fig 3 – 100X, 6 meses.**

**Fig 4 – 100X, 1 ano.**

## PRANCHA 2



### PRANCHA 3

**Figuras 1 a 4 destacam a presença de laminina para evidenciar a membrana basal, sobretudo dos vasos sanguíneos, destacando a rica vascularização dos septos fibrosos que se formam durante a infecção do rato pela *C. hepatica*, em diferentes períodos de evolução da infecção.**

**Técnica da imunofluorescência indireta com anti-laminina fluoresceinada.**

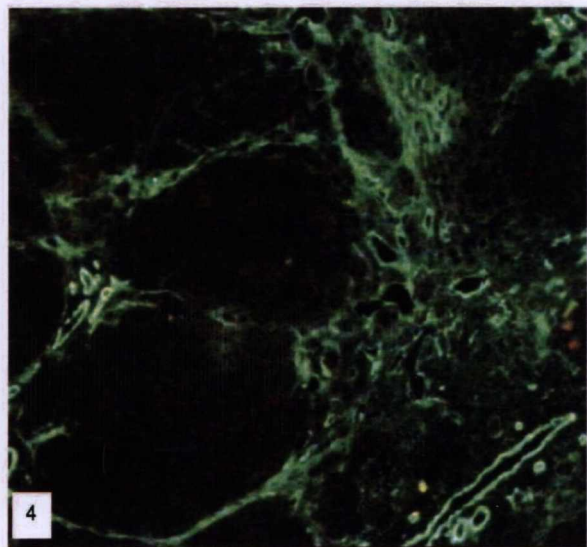
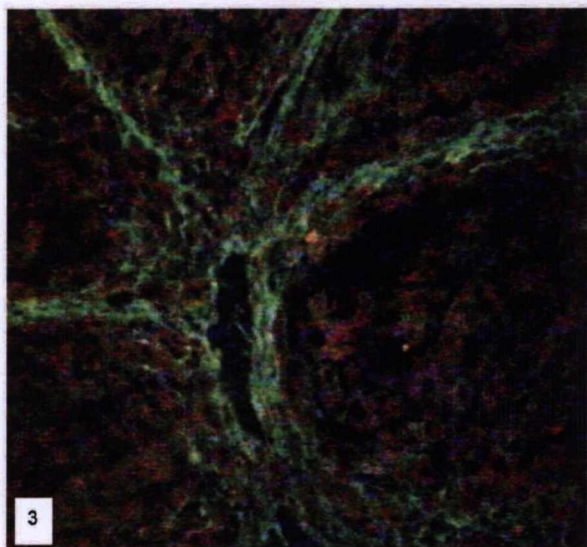
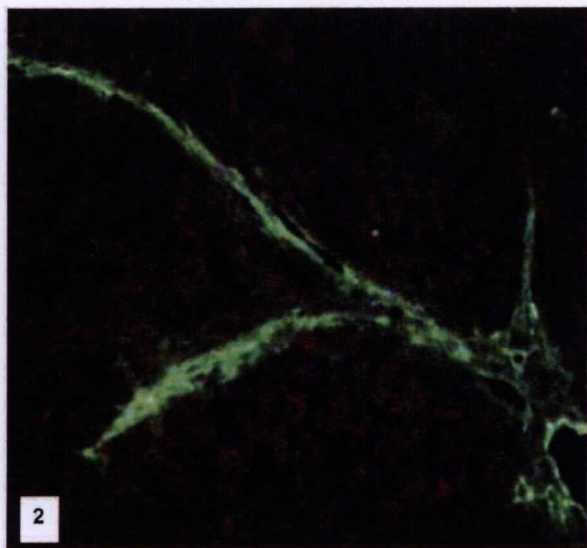
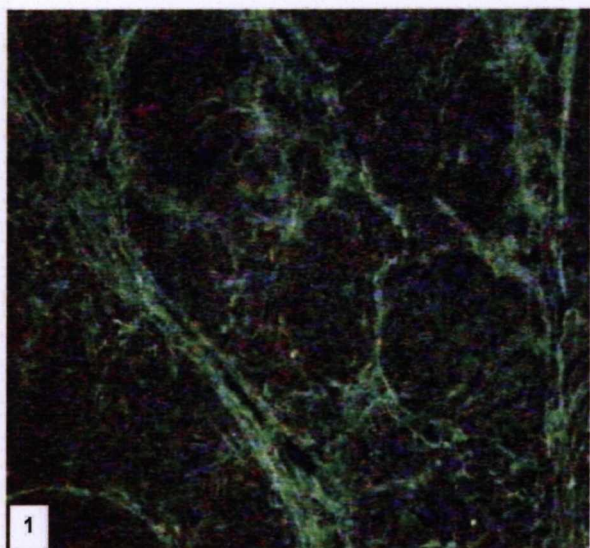
**Fig 1 – 100X, 20 dias.**

**Fig 2 – 200X, 40 dias (detalhe).**

**Fig 3 – 200X, 50 dias.**

**Fig 4 – 200X, 4 meses.**

### PRANCHA 3



## PRANCHA 4

Figuras destacam as alterações iniciais do processo de fibrose septal hepática na capilaríase do rato através da evidenciação imunohistoquímica da  $\alpha$ -actina.

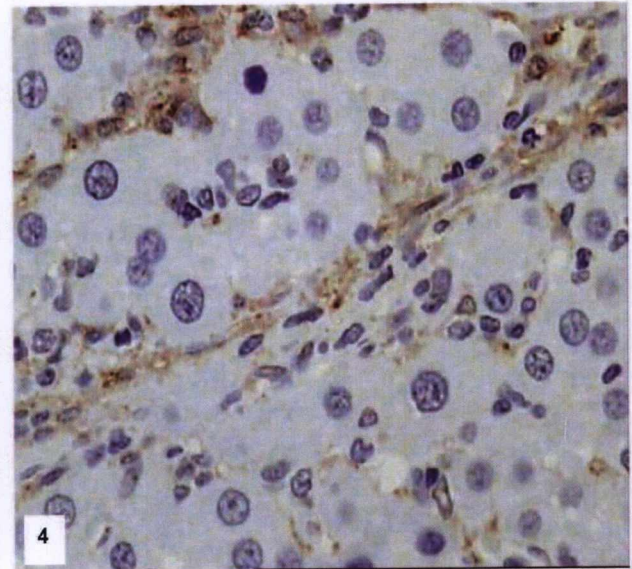
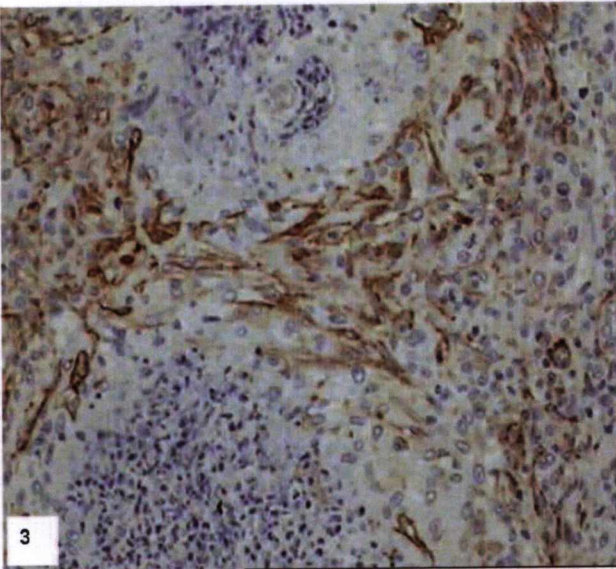
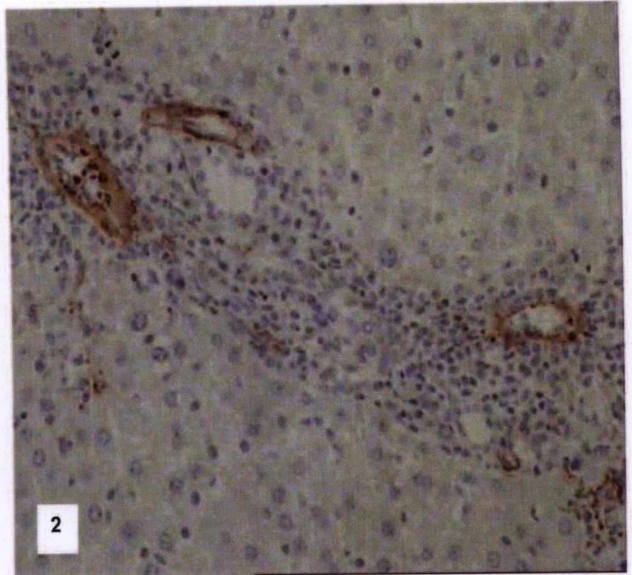
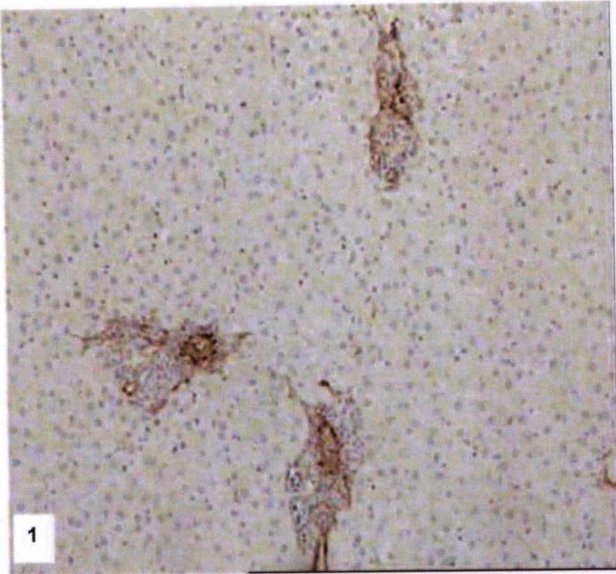
**Fig 1 – Aos 14 dias da infecção, quando ainda não apareceu a fibrose septal, a técnica para evidenciar as células actina-positivas nos espaços porta marcam quase que exclusivamente os leiomíócitos nas paredes dos vasos dos espaços porta. 10X.**

**Fig 2 – Outro aspecto do mesmo fígado mostrado acima exhibe uma densa infiltração mononuclear em um espaço porta, onde apenas raras células actina-positivas podem ser identificadas. 100X.**

**Fig 3 – Aos 20 dias da infecção, quando a formação dos septos fibrosos se torna nítida, a infiltração celular do espaço porta e septos põem em destaque a intensa proliferação de células actina-positivas. 100 X.**

**Fig 4 – Aos 20 dias da infecção aparecem células actina-positivas distribuídas em fileira no interior do parênquima hepático, sem evidências de colagenização, confirmado dados que mostram a angiogênese precedendo a fibrogênese na capilaríase do rato. 200X.**

# PRANCHA 4



## PRANCHA 5

**Figuras destacam as alterações tardias do processo de fibrose septal hepática na capilaríase do rato através da evidenciação imuno-histoquímica da  $\alpha$ -atina.**

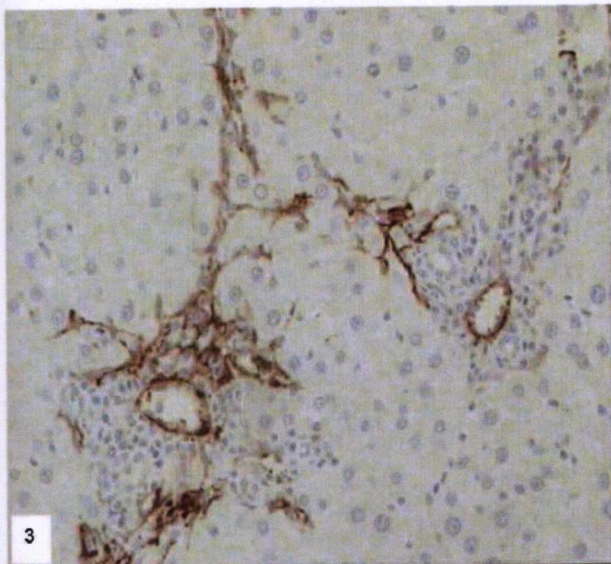
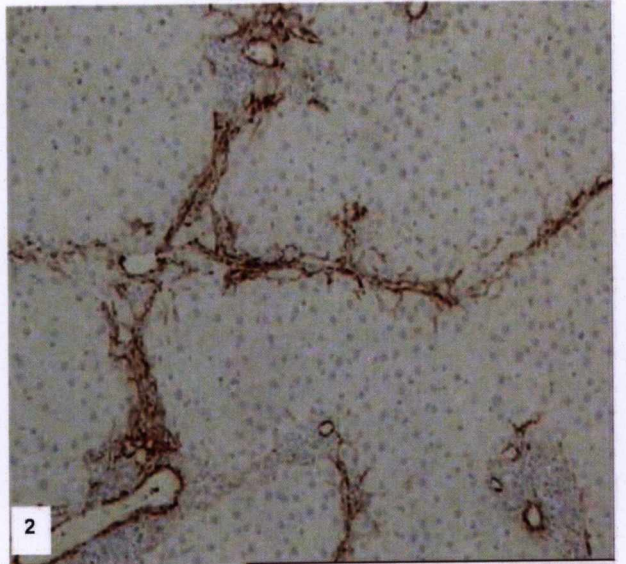
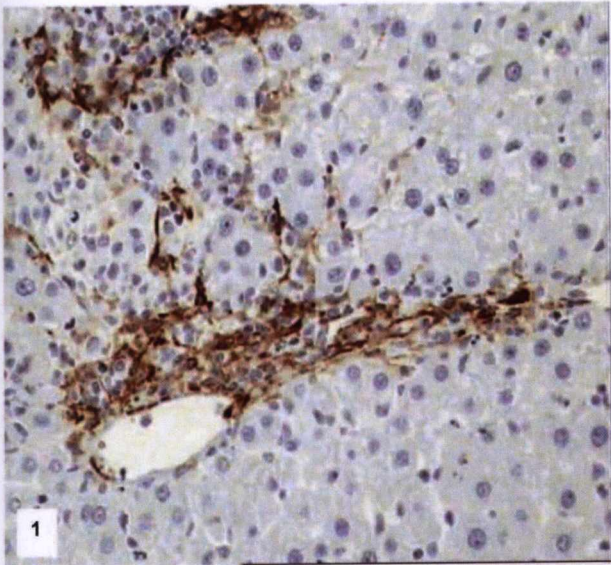
**Fig. 1 – Septo ainda bem ativo, com células actina-positivas não totalmente polarizadas observado aos 4 meses da infecção. 200X.**

**Fig 2 – Septos finos, mas ainda celulosos, dissecando o parênquima hepático aos 4 meses da infecção. 100X.**

**Fig 3 – A técnica imuno-histoquímica ajuda a evidenciar septos um pouco menos marcados, indicativo do processo de involução visto aqui aos 6 meses da infecção. 100X.**

**Fig 4 – Um septo isolado, visto numa infecção de um ano de duração, mostrando persistência de pericitos e miofibroblastos. 200X.**

## PRANCHA 5



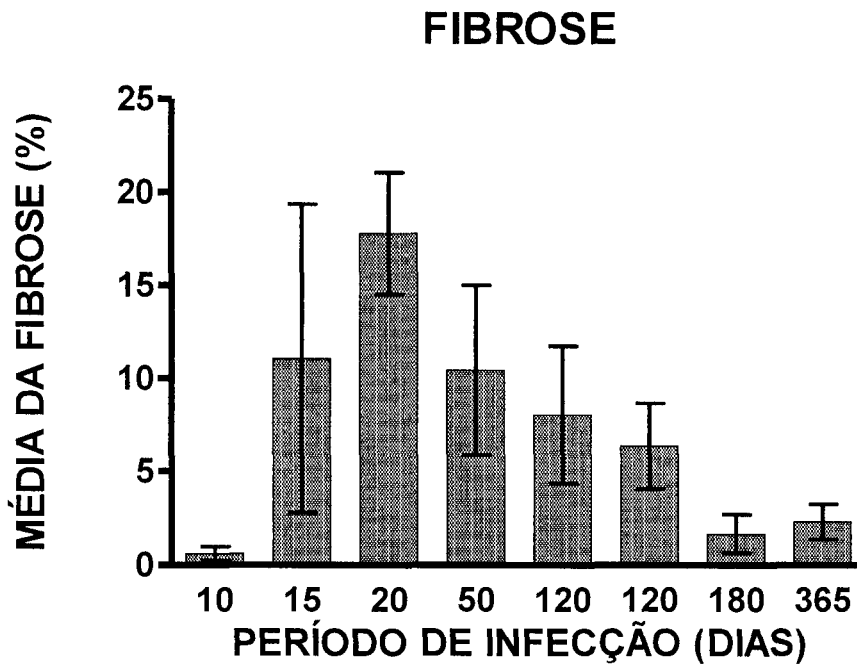


## **8.4. Avaliação Morfométrica da Matriz Conjuntiva**

Com o objetivo de quantificarmos a porcentagem da fibrose hepática, as amostras foram submetidas à análise morfométrica, demonstrando o grau fibrogênico existente em cada período.

Nos períodos iniciais foi possível observar uma discreta fibrose que se torna mais proeminente com 20 e 50 dias de infecção. No entanto, a partir de 120 dias ainda é possível identificá-la, persistindo mesmo com um ano de infecção (inferior a 5%) (Gráfico 1).

Na tabela 1 está demonstrado o valor obtido de cada período, avaliados em uma área seccional total de  $1,04 \times 10^7 \text{ mm}^2$ . Foi utilizada a objetiva de 4x em 5 campos microscópicos, os quais foram selecionados aleatoriamente.



**Gráfico 1: Avaliação Morfométrica da Matriz Conjuntiva.** As barras representam a média da fibrose existente nos diferentes períodos da infecção causada pela *C. hepatica*, em ratos.

**Tabela 1: Avaliação Morfométrica da Matriz Conjuntiva**

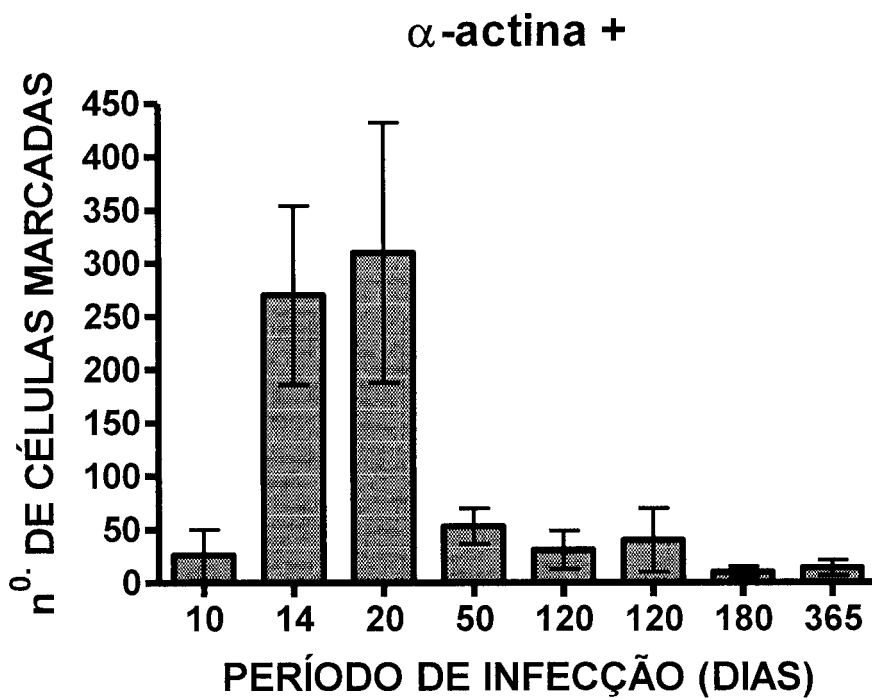
<b>PERÍODO DE INFECCÃO</b>	<b>MÉDIA DA FIBROSE</b>
<b>10 DIAS</b>	<b>0.61 +/- 0.38</b>
<b>14 DIAS</b>	<b>11.08 +/- 8.28</b>
<b>20 DIAS</b>	<b>17.80 +/- 3.28</b>
<b>50 DIAS</b>	<b>10.45 +/- 4.57</b>
<b>120 DIAS</b>	<b>8.06 +/- 3.71</b>
<b>120 DIAS</b>	<b>6.38 +/- 2.3</b>
<b>180 DIAS</b>	<b>1.68 +/- 1.03</b>
<b>365 DIAS</b>	<b>2.32 +/- 0.13</b>

## **8.5. Avaliação Morfométrica das Células marcadas pela $\alpha$ -actina de Músculo Liso**

Para quantificarmos a presença das células  $\alpha$ - actina de músculo liso, as quais são sugeridas no presente estudo como pericitos e/ou miofibroblastos, as amostras foram submetidas à morfometria.

Nossos resultados demonstram a intensa participação dessas células a partir de 14 dias de infecção, decrescendo a partir de 50 dias. Entretanto, mesmo nos períodos tardios, é possível identificá-las, persistindo até com um ano de infecção (Gráfico 2).

Conforme podemos observar na tabela 2, foi analisada para cada período uma área seccional total de  $1,5 \times 10^6 \text{ mm}^2$ . A objetiva de 10x foi utilizada em 5 campos microscópicos e estes foram selecionados aleatoriamente. Todas as células marcadas foram consideradas, incluindo as células de vaso.



**Gráfico 2- Avaliação Morfométrica das Células marcadas pela  $\alpha$ -actina de Músculo Liso.** As barras representam o número de células marcadas pela  $\alpha$ -actina de músculo liso existentes nos diferentes períodos da infecção causada pela *C. hepatica*, em ratos.

**Tabela 2: Avaliação Morfométrica das Células marcadas pela  $\alpha$ -actina de  
Músculo Liso**

<b>PERÍODO DE INFECCÃO</b>	<b>Nº DE CÉLULAS MARCADAS</b>
<b>10 DIAS</b>	<b>26 +/- 24</b>
<b>14 DIAS</b>	<b>270+/- 84</b>
<b>20 DIAS</b>	<b>310+/- 122</b>
<b>50 DIAS</b>	<b>53 +/- 17</b>
<b>120 DIAS</b>	<b>31 +/-18</b>
<b>120 DIAS</b>	<b>40 +/- 30</b>
<b>180 DIAS</b>	<b>10 +/- 5</b>
<b>365 DIAS</b>	<b>14 +/- 7</b>

## 9- DISCUSSÃO

O processo angiogênico é caracterizado pela proliferação vascular, a partir de vasos pré-existent, constituindo o clássico “tecido de granulação” do reparo, hoje reconhecido como uma peculiaridade de qualquer tipo de fibrose, em qualquer parte do organismo. Já em 1972 McGree e Patrick afirmavam que toda fibrose é precedida pela formação do clássico tecido de granulação, ao contestarem a existência de uma fibrose pós-colapso, que se seguiria aos surtos de necrose maciça ou sub-maciça no fígado. Ao atingir a cicatrização e principalmente durante o processo de regressão da fibrose, o excesso de vasos é reabsorvido paulatinamente, deixando um novo tecido mais firme, esbranquiçado e corado (cicatriz) ou podendo mesmo ser totalmente absorvido. Este tipo de evolução foi agora acompanhada no presente trabalho, ao longo do tempo de evolução da fibrose septal hepática induzida pela infecção do rato com a *C. hepatica*, através da demonstração do comportamento das células actina-positivas: pericitos e miofibroblastos.

Atualmente, estudos na literatura demonstram a importância da angiogênese relacionada à fibrose em outras doenças hepáticas, como o câncer e a hepatite (Carmeliet & Jain, 2002). Neste sentido, um estudo dinâmico da angiogênese é de fundamental importância para a compreensão e possível controle do processo fibrótico. A intensa proliferação de vasos e a participação das células actina-positivas demonstrada logo no início do processo fibrótico pode corroborar com a formação de um arcabouço para posterior depósito de material conjuntivo, como sugerido por Rapaport *e cols.* (1983).

Utilizando-se paralelamente a coloração pelo picrossírius-vermelho para colágeno foi possível correlacionar a presença da angiogênese com a fibrogênese nos diversos períodos

estudados. Nossos resultados demonstram a elevada intensidade do processo angiogênico nos espaços periportais no início da formação dos septos fibrosos. Esses dados corroboram os achados de Souza *e cols.*, (2006) que descreveram nas fases iniciais da fibrogênese hepática da capilaríase do rato a intensa proliferação de células mesenquimais e vasos, que se enfileiravam formando os septos, precedendo o aparecimento das primeiras fibras colágenas. Nossos dados demonstram ainda que a fibrose septal está mais avançada a partir do 20º dia pós-infecção. Além disso, foi possível observar no mesmo período lesões focais parenquimatosas, diretamente relacionadas com vermes, larvas e ovos, acompanhadas por uma intensa reação inflamatória bem como a presença de vasos e fibras colágenas.

A análise morfométrica da matriz conjuntiva permitiu verificar o grau fibrogênico de cada período. Observamos que no início da infecção a fibrose apresentou-se discreta, aumentando após 20 e 50 dias pós-infecção. Mesmo com 12 meses de infecção foi possível verificar a persistência de variável quantidade de septos fibrosos, sempre bem menos que nos períodos mais recentes.

Diversos trabalhos têm sido realizados objetivando identificar a origem celular do aumento da síntese da matriz extracelular na fibrose hepática. Neste contexto, as células estelares hepáticas ganham maior destaque, já que no início de 1970 essas células foram descritas como maiores auxiliadoras para o depósito da matriz na fibrogênese hepática. Além disso, estudos enfatizavam que a ativação dessas células era de fundamental importância para promover a fibrose. Grinko *e cols.*, (1995), demonstraram que em condições patológicas de estresse e lesão tecidual, as células estelares hepáticas eram ativadas e assumiriam o fenótipo de miofibroblastos. Ramadori (1991) descreveu a capacidade dessas células em proliferar e migrar, explicando a sua atuação na resposta fibrogênica tanto na região centro-lobular, septal quanto portal. Entretanto, Fonseca *e cols.*, (2005), investigando a participação dessas células na



fibrogênese portal hepática na capilaríase demonstraram que sua presença não ocorreu de forma relevante durante o desenvolvimento do processo, reforçando a idéia de que há participação de outros elementos celulares na fibrose hepática.

Nossos resultados mostram a intensa marcação das células positivas para alfa-actina de músculo liso acumulados principalmente na região dos espaços-porta logo nos períodos iniciais da infecção. Possivelmente, essas células são os miofibroblastos e/ ou pericitos, já descritos por outros autores como células imuno-reativas para alfa-actina de músculo liso e que são responsáveis pelo excesso de depósito de matriz extracelular no processo fibrótico. A produção dessas células ocorre após uma lesão, não estando presentes no fígado normal e, no entanto, sua origem continua obscura.

A presença de células actina positivas também foi observada em torno da veia centrolobular, conectando vários septos entre si por todo o parênquima hepático. A intensidade da participação dessas células é diminuída a partir de 50 dias pós-infecção. Essas células também estão presentes nas lesões focais causadas pelos ovos do parasito.

Neste estudo quantificamos também as células  $\alpha$ - actina de músculo liso, onde foi possível observar de forma detalhada a presença dessas células em cada período. Nossos resultados demonstram a intensa participação dessas células no desenvolvimento do processo fibroso. A regressão das mesmas é acompanhada com a diminuição da fibrose, a partir de 50 dias pós-infecção, sugerindo a intensa participação dessas células neste processo.

Atualmente, outras células têm sido incluídas no processo fibroso com capacidade de se diferenciarem em miofibroblastos e sendo capazes de sintetizar proteínas do tecido conjuntivo (Staton, 2004). Dentre elas podemos citar: os fibroblastos do trato portal (residentes do tecido conjuntivo que rodeia os vasos e ductos biliares); células do músculo liso da parede dos vasos

(fibroblastos da segunda camada da veia centro-lobular); as células endoteliais e as células perivasculares chamadas de pericitos. Atualmente, essas células têm despertado um enorme interesse nos pesquisadores por atuarem como células-tronco, possuindo a habilidade de se diferenciarem em fenótipos variáveis de acordo com as circunstâncias (Ramadori, 2004). De acordo com Guyot *e cols.*, (2006), a distribuição variável da fibrose procede justamente da hipótese de que diferentes células com potencial fibrogênico podem estar envolvidas no processo ou que diferentes tipos celulares podem predominar em diferentes modelos.

Em nosso estudo investigamos também a presença de antígenos de *C. hepatica* nos períodos propostos, os quais foram observados logo no início da infecção, regredindo ao longo do tempo. A presença destes antígenos sugere a manutenção dos septos fibrosos, uma vez que os mesmos estão presentes após os 4 meses de infecção, porém em menor intensidade. Um achado importante neste ensaio é a presença de ovos contendo material antigênico no seu interior muito tempo depois da morte dos vermes. Todavia para saber da viabilidade dos mesmos seriam necessários testes de embrionamento nos períodos tardios da infecção. Testes preliminares feitos em nosso Laboratório demonstraram que após 6 meses de infecção não foi possível verificar a presença de ovos maduros após os testes.

Nossos resultados analisados em conjunto sugerem a importância das células positivas para alfa-actina de músculo liso no processo fibroso e que a angiogênese apresentou-se como importante fator no desenvolvimento da fibrose. Estes achados foram observados logo no início da infecção.

Além disso, nossos dados evidenciaram a participação dos componentes celulares básicos e que estes se apresentam proeminentes no início da fibrose e ainda, foi possível observar que a regressão dos mesmos é concomitante à diminuição do processo fibroso.

## **10- CONCLUSÕES**

- 1- A angiogênese foi observada durante o processo fibroso e que sua dinâmica nas várias fases consideradas mostrou-se intimamente relacionada com a formação, progressão e regressão da fibrose septal hepática;
- 2- As células actina-positivas participam ativamente do processo fibroso, sendo que tal participação, muito marcada de início, tornou-se gradualmente reduzida com o passar do tempo;

## 11- REFERÊNCIAS

ALCOLADO, R.; ARTHUR, M.J.P.; IREDALE, J.P. Pathogenesis of liver fibrosis. **Clin. Sci.**, **92**: 103-112, 1997.

ALLT, G. & LAWRENSON, J., G. Pericytes: cell biology and pathology. **Cells Tissues Organs** 169:1-11, 2001.

ANDRADE, Z. A. Evolution and involution of hepatosplenic schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **84**: 58-75, 1989.

ANDRADE, Z. A. Contribution to the study of septal fibrosis of the liver. **Int. J. Exp. Pathol.**, **72**: 553-62, 1991.

ARTHUR, M.J.P. Degradation of matrix proteins in liver fibrosis. **Pathol. Res. Pract.**, **190**: 825-33, 1994.

BATTALER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. **J Clin Invest.**, **115**: 209- 218, 2005.

BRANTON, Mh.; JEFFREY, Bk. TGF- $\beta$  and fibrosis. **Microbes infect.**, **1**: 1349-65, 1999.

BROWN, L. F.; DETMAR, M.; CLAFFEY, K.; NAGY, J. A.; FENG, D.; DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. **EXS**, **79**: 233-69, 1997.

BURT, A. D. Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. **J. pathol.**, **170**: 105-14, 1993.

CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, **407**: 249-59, 2002.

CHIEFFI, P. P.; DIAS, R. M.; MANGINI, A. C.; GRISPINO, D. M.; PACHECO, M. A. *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) in *Muridae* trapped in the municipality of Sao Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**, **23**: 143-146, 1981.

COCHRANE, J. C.; SAGORIN, L.; WILCOCKS, M. G. *Capillaria hepatica* infection in man: a syndrome of extreme eosinophilia, hepatomegaly and hyperglobulinaemia. **S Afr Med J.**, **31**: 751-755, 1957.

DE LEEUW, A. M.; MCCARTHY, S. P.; GEERTS, A.; KNOOK, D. L. Purified rat liver fast-storing cells in culture divide and contain collagen. **Hepatology**, **4**: 392-403, 1984.

DIAZ-FLORES, L.; GUTIERREZ, R.; LOPEZ-ALONSO, A.; GONZALES, R.; VARELA, H. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. **Clin Orthop** **275**:280–286, 1992.

DOLECKI, G. J.; CONNOLLY, D. T. Effects of a variety of cytokines and inducing agents on vascular permeability factor mRNA levels in U937 cells. **Biochem Biophys Res. Commun**, **180**: 572-578, 1991.

DOHERTY, M. J.; CANFIELD, A. E. Gene expression during vascular pericyte differentiation. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr** **9**:1–17, 2000.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocrin. Rev.**, **18**: 4-25, 1997.

FRIEDMAN, H.; MOBARHAN, S.; HUPERT, J.; LUCCHESI, D.; HENDERSON, C.; LANGENBERG, P.; LAYDEN, T. J. In vitro stimulation of rat liver retinyl ester hydrolase by ethanol. **Arch. Biochem. Biophys.**, **269**: 69-74, 1989.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science** **235**: 442-447, 1987.

FOLKMAN, J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. **N. Engl. J. Méd.**, **333**: 1757-1763, 1995.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science**, **235**: 442-7, 1997.

FONSECA, Y. O.; LIMA, C., B.; SANTOS, E., T.; ANDRADE, Z., A. On the presence of hepatic stellate cells in portal spaces. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **100 (3)**: 289-91, 2005.

GALVÃO, V. A. *Capillaria hepática*, estudo da incidência em ratos de Salvador, Bahia, e dados imunopatológicos preliminares. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **10**: 333-337, 1976.

GERBER, M. A. & VERNACE, S. Chronic septal hepatitis. *Virchow's Arch.* **A. Path. Anat. Histol.**, **362**: 303-9, 1974.

GORTAZAR, C.; HERRERO, J.; GARCIA-SERRANO, A.; LUCIENTES, J.; LUCO D. F. Données préliminaires sur les parasites digestifs de la marmotte alpine (*Marmota marmota*) dans les Pyrénées du sud-ouest. **In**: Le Berre M, Ramousse R, Le Guelte L. Biodiversité chez les marmottes. **Internat Marmot Network**, 105-108, 1986, 1996.

GOSPODAROWICZ, D.; NEUFELD, G.; SCHWEIGERER, L. Fibroblast growth factor: structural and biological properties. **J Cell Physiol Suppl.**, **5**: 15-26, 1987.

GRINKO, I.; GEERTS, A.; WISSE, E. Experimental biliary fibrosis correlates with increased numbers of fast-storing and Kupffer cells, and portal endotoxemia. **J. hepatol.**, **23** (4): 449-58, 1995.

GERHARDT, H. & BETSHOLTZ, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. **Cell Tissue Res** **314**:15-23, 2003.

GUYOT, C.; LEPREUX, S.; COMBEA, C.; DOUDNIKOFF, E.; BIOULAC-SAGE, P.; BALABAUD, C.; DESMOULIERE, A. Hepatic fibrosis and cirrhosis: The (my)fibroblastic cell subpopulations involved. **Inst. J. Biochem Cell Biol.** **38**: 135-51, 2006.

HELLSTROM, M.; GERHARDT, H.; KALÉN, M.; LI, X.; ERIKSSON, U.; WOLBURG, H.; BETSHOLTZ, C. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. **J Cell Biol** **153**: 543-553, 2001.

HILKEN, G.; BÜTTNER, D.; MILTZER, K. Three important endoparasites of laboratory woodchucks (*Marmota monax*) caught in the wild: *Capillaria hepatica*, *Ackertia marmotae*, and *Taenia crassiceps*. **Scand J Lab Anim Sci**, **30**: 151-156, 2003.

KOVACS, E.J. Fibrogenic cytokines: The role of immune mediators in the development of scar tissue. **Immun. Tod.**, **12**: 17-23, 1991.

LEVEEN, P.; PEKNY, M.; GEBRE-MEDHIN, S.; SWOLIN, B.; LARSSON, E.; BETSHOLTZ, C. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. **Genes Dev.**, **8**: 1875-1887, 1994.

LEMONS, Q. T.; MAGALHÃES-SANTOS, I. F.; ANDRADE Z. A. Immunological basis of septal fibrosis of the liver in *Capillaria hepatica*-infected rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **36**: 1202-07, 2003.

MCGREE JOD, PATRICK RS. The role of perisinusoidal cells in hepatic fibrogenesis. An electron microscopic study of acute carbon tetrachloride liver injury. **Inter Acad Pathol** 1972; 26: 429-40.

MCQUOWN, A. L. *Capillaria hepatica*. **Amer. J. Clin. Pathol.**, **24**: 448-452, 1954.

MOSCHCOWITZ, E. Laennec. Cirrhosis: its histogenesis with special references to the role of angiogenesis. **Arch. Pathol.**, **45**: 187-215, 1948.

MOURA, H. Trichuris, Trichinella e outros nematóides. In: REY, L. **Parasitologia**. 2º. ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan Brazil, Cap 51, p. 565-571, 1991.

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

NAGY, J. A.; DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F. VEGF-A and the induction of Pathological Angiogenesis. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, **2**: 252-75, 2007.

PEREIRA, V. G.; MATTOSINHO FRANÇA, L. C. Successful treatment of *Capillaria hepatica* infection in an acutely ill adult. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **32**: 1272-1274, 1983.

PERTOVAARA, L.; KAIPAINEN, A.; MUSTONEN, T.; ORPANA, A.; FERRARA, N.; SAKSELA, O.; ALITALO, K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. **J. Biol. Chem.**, **269**: 6271-6274, 1994.

PIAZZA, R.; CORREA, M. O.; FLEURY, R. N. On a case of human infestation with *Capillaria hepatica*. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo** **5**: 37-41, 1963.

PINEDO, H. M.; VERHEUL, H. M.; D'ÁMATO, R. J.; FOLKMAN, J. Involvement of platelets in tumour angiogenesis? **Lancet**, **352**: 1775-7, 1998.

RAJKUMAR, V. S.; HOWELL, K.; CSISZAR, K.; DENTON, C. P.; BLACK, C. M., ABRAHAN, D. J. Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblasts lineage in fibrosis. **Arthritis Res. Ther.**, **7**: 1113-1123, 2005.

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

ROSKAMS, T.; CASSIMAN, D.; VOS, R.; LIBBRECHT, L. Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver. **The anatomical record part 280**: 910-923, 2004.

ROSMODUC, O.; WENDUM, D.; CPERCHOT, C.; GALY, B.; SEBBAGH, N.; RALEIGH, J.; HOUSSEY, C. Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. **Am. J. Pathol.**, **155**: 1065-73, 1999.

SAKAGAMI, K.K.; ODAMA, T.; PURO, D. G. PDGF-induced coupling of function with metabolism in microvascular pericytes in the retina. **Invest Ophthalmol Vis Sci** **42**:1939–1944, 2001.

SATO, M.; SUZUKI, S.; SENOO, H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. **Cell Structure and function**, **28**: 105-112, 2003.

SAWAMURA, R.; FERNANDES, M. I.; PERES, L. C.; GALVAO, L. C.; GOLDANI, H. A.; JORGE, S. M.; de MELO, Rocha G.; de SOUZA N. M. Hepatic capillaritis in children: report of 3 cases in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **61**: 642-647, 1999.

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.

SELJELID, R.; JOZEFOWSKI, S.; SVEINBJORNSSON, B. Tumor stroma. **Anticancer Res.**, **19**: 4809-22, 1999.



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

SIMS, D.E. The pericyte—a review. **Tissue Cell** **18**:153–174, 1986.

SOUZA, M. M.; SILVA, L. M.; BARBOSA, A. A. Jr.; de OLIVEIRA, I. R.; PARANA, R.; ANDRADE, Z. A. Hepatic capillaritis in rats: a new model for testing antifibrotic drugs. **Braz J Med Biol Res.** **33 (11)**:1329-34, 2000.

SOUZA, M. M.; TOLENTINO, Jr. M.; ASSIS, B. C. A.; GONZÁLEZ, A. C. O.; SILVA, T. M. C.; ANDRADE, Z. A. Significance and fate of septal fibrosis of the liver. **Hepatol Res.** **2006 May**; **35(1)**:31-6, 2004.

SOUZA, M. M.; JÚNIOR, M. T.; ASSIS, B. C. A.; GONZÁLES, A. C. O.; SILVA, T. M. C.; ANDRADE, Z. A. Pathogenesis of septal fibrosis of the liver. An experimental study with a new model. **Pathol. Res. Pract.** **883-9**, 2006.

STATON, S. A.; STRIBBLING, S. M.; TAZZYMAN, S.; HUGHES, R.; BROWN, N. N. J.; LEWIS, C. E. Current methods for assaying angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. **Ins. J. Exp. Path.** **85**: 233-48, 2004.

UENO, T.; NAKAMURA, T.; TORIMURA, T.; SATŌ, M. Angiogenic cell therapy for hepatic fibrosis. **Med. Mol. Morphol.**, **39**: 16-21, 2006.

YANCONPOULOS, G. D.; DAVIS, S.; GALÉ, N. W.; RUDGE, J. S.; WIEGAND, S. J.; HOLASH, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, **407**: 242-8, 2000.

YFANTI, G.; ANDREADIS, E.; SPILIADOU, C.; DIAMANTOPOULOS, E. J. A woman with fever and a jejunal stricture. **Lancet**, **347**: 802, 1996.

WRIGHT, K. A. Observations on the life cycle of *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) with a description of the adult. **Can. J. Zool.**, **38**: 167-182