



FIOCRUZ

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia



UFBA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**LESÕES VASCULARES INTRA-HEPÁTICAS NA CIRROSE
HEPÁTICA.**

**TENTATIVA PARA A CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO
EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR.**

RODRIGO GUIMARÃES ANDRADE

**Salvador - Bahia – Brasil
2011**



FIOCRUZ

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia



UFBA

**LESÕES VASCULARES INTRA-HEPÁTICAS NA CIRROSE
HEPÁTICA.**

**TENTATIVA PARA A CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO
EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR.**

Orientador: Zilton de Araújo Andrade

Dissertação apresentada
para obtenção do grau de
mestre em Patologia Humana

**Salvador - Bahia – Brasil
2010**

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

Andrade, Rodrigo Guimarães
A598l Lesões Vasculares Intra-Hepáticas Na Cirrose Hepática. Tentativa Para A
Caracterização De Um Modelo Experimental Em Ratos Wistar.

[manuscrito] / Rodrigo Guimarães Andrade. - 2011.
62 f.: il.; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Fundação
Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2011.**

Orientador: Prof. Dr. Zilton de Araújo Andrade, Laboratório de Patologia
Experimental.

1 Lesão veno-obliterativa 2. Dimetilnitrosamina 3. Fibrose experimental

CDU 616.36-

004

AGRADECIMENTOS:

A Dr. Zilton de Araújo Andrade pelo modelo ímpar de integridade, capacidade e humildade, por muitos admirado. Seus sábios conselhos, conversas e “casos” ocorridos em sua trajetória profissional estarão sempre presentes com um guia na minha carreira. Ao mestre, amigo, mentor agradeço de coração por ter me mostrado o encanto da patologia como nenhum outro o faria.

A minha esposa Geise, sempre ao meu lado em momentos bons e difíceis, espantando o desânimo, me apoiando com seu carinho especial e sua habilidade invejável de me chamar à realidade em momentos de dispersão.

Aos meus queridos gatinhos, Gepeto e Foster, pela companhia, carinho sincero e momentos de diversão.

Aos meus pais, grandes “patrocinadores” e impulsionadores da minha vida pessoal e profissional. Que me ensinaram que nosso caminho é feito de escolhas, sendo essas sempre acompanhadas das conseqüências. A vocês eu só tenho a agradecer, pois minhas escolhas até o presente momento só têm me trazido imensas alegrias. Parabéns pelos pais que vocês são.

Aos meus irmãos, pela companhia durante todos esses anos, por terem moldado o “caçula” segundo seus principais atributos do gosto pelo estudo e da criatividade intelectual, os quais, orgulhosamente, carrego até hoje.

Aos demais familiares, avós, Rosa, tios e primos, pelo incentivo contínuo e pelas palavras de apoio.

Aos colegas do CPqGM-Lapex pelas valiosas dicas, troca de conhecimento e constante incentivo.

A Queli Lemos, por ter gentilmente cedido parte de seu material para realização deste trabalho.

A Márcia Souza pelo conhecimento compartilhado em todos estes anos de Fiocruz.

A biblioteca da Fiocruz-CPqGM, em especial Ana Maria Fiscina, por sua valiosa revisão do texto.

Ao Dr. Eduardo Studart pelas palavras de apoio e incentivo e pela compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus colegas de trabalho pela companhia e amizade desenvolvida ao longo destes anos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 ESTRUTURA ANATÔMICA E FUNCIONAL	13
2.2 LESÕES VASCULARES NA PATOLOGIA HEPÁTICA	15
2.2.1 Alterações do influxo sanguíneo	16
2.2.1.1 <i>Comprometimento da artéria Hepática</i>	16
2.2.1.2 <i>Obstrução e trombose da veia Porta</i>	16
2.2.1.3 <i>Hipertensão portal idiopática</i>	17
2.2.2 Alterações no fluxo intra-hepático	18
2.2.2.1 <i>Cirrose</i>	18
2.2.2.2 <i>Oclusão física dos sinusóides</i>	19
2.2.2.3 <i>Congestão passiva e necrose centrolobular</i>	19
2.2.2.4 <i>Pelióse hepática</i>	19
2.2.3 Alterações do efluxo sanguíneo	20
2.6.1 <i>Trombose das veias Hepática e Cava inferior</i>	20
2.6.2 <i>Síndrome de obstrução sinusoidal</i>	21
2.3 OCLUSÃO OBLITERATIVA DAS VEIAS HEPÁTICAS	23
2.4 LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA PELA DIMETILNITROSAMINA	23
3 OBJETIVOS	27
3.1 PRIMÁRIO	27
3.2 SECUNDÁRIOS	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 ANIMAIS	28
4.2 MODELO EXPERIMENTAL	28
4.3 GRUPO E	29
4.4 EUTANÁSIA	29
4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS OBTIDAS	29
4.5.1 Histoquímica	29
4.5.2 Imunohistoquímica	30
4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	31

4.6.1	Quantificação das lesões vasculares	31
4.6.2	Quantificação da fibrose	31
4.6.2.1	Por análise histológica	31
4.6.2.2	Por análise morfométrica	32
4.6.3	Avaliação de focos de extinção do parênquima	33
4.6.4	Avaliação da ativação de células estreladas	33
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5	RESULTADOS	34
6	DISCUSSÃO	47
7	COMENTÁRIOS FINAIS	53
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE ABREVIATURAS

DMN	DIMETILNITROSAMINA
CO ₂	DIÓXIDO DE CARBONO
CCL ₄	TETRACLORETO DE CARBONO
CE	CÉLULA ENDOTELIAL
CYP450	CITOCROMO P450
GSH	GLUTATIÃO
MMP	METALOPROTEINASES DE MATRIZ
TGF β	FATOR DE CRESCIMENTO TUMORAL β
HE	HEMATOXILINA-EOSINA
PAS	ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF
mRNA	ÁCIDO RIBONUCLÉICO MENSAGEIRO

RESUMO

ANDRADE, RG. Lesões Vasculares Intra-Hepáticas Na Cirrose Hepática. Tentativa Para A Caracterização De Um Modelo Experimental Em Ratos Wistar. 2011, 62 f Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia/ Fundação Oswaldo Cruz/Salvador/BA, 2011.

Lesões vasculares são importantes na patogênese de muitas das doenças agudas e crônicas do fígado e estão relacionadas às principais doenças hepáticas no nosso meio, como esquistossomose, hepatites e cirrose. Estudos recentes têm focado a importância da fibrose obliterativa de veias centrais, porém seu completo entendimento ainda não foi estabelecido e muitos de seus aspectos fisiopatológicos permanecem obscuros. Neste contexto, a eficácia e reprodutibilidade dos modelos animais são fundamentais e cruciais para o estudo destas alterações, permitindo avanço científico na área.

Para o presente estudo analisamos as alterações histopatológicas nos fígados de 28 ratos tratados por quatro semanas com injeções intraperitoneais de dimetilnitrosamina (DMN). Nas duas primeiras semanas de tratamento com DMN os animais apresentavam alterações necro-hemorrágicas na zona 3 acinar, além da presença de espessamento fibroso subendotelial em ramos da veia central e discreta fibrose portal. Nas duas últimas semanas de tratamento pudemos observar a associação de fibrose hepática e ativação de células estreladas, com a oclusão parcial ou total dos ramos de médio calibre da veia central.

Nossos achados nos permitem inferir que as alterações vasculares observadas em ramos da veia central são fundamentais para o agravamento da fibrose no órgão. Propomos ainda que o modelo experimental de agressão hepática tóxica pela DMN se mostra adequado para o estudo destas lesões vasculares.

Palavras-chave: Fibrose experimental; Lesão veno-obliterativa; Dimetilnitrosamina.

ABSTRACT

ANDRADE, RG. Intrahepatic Vascular Lesions In Hepatic Cirrhosis. Attempt to characterize an experimental model in Wistar rats. 2011, 62 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia/ Fundação Oswaldo Cruz/Salvador/BA, 2010.

Vascular lesions are important features in the pathogenesis of acute and chronic liver diseases and are related to the major diseases of the organ, such as schistosomiasis, hepatitis and cirrhosis. Recent studies have focused on the importance of obliterative fibrosis in central veins, but its complete understanding has not yet been established and many of its pathophysiological aspects remain unclear. In this context, efficiency and reliability of animal models are essential and crucial to the study of these changes, allowing scientific advances in the area.

For this study we analyzed the histopathological changes in the livers of 28 rats treated with intraperitoneal injections of dimethylnitrosamine (DMN), for four weeks. In the first two weeks of treatment animals showed necro-hemorrhagic changes in acinar zone 3 and the presence of subendothelial fibrous thickening in the central vein branches, beyond mild portal fibrosis. In the last two weeks of treatment we observed hepatic fibrosis and stellate cell activation, associated with partial or complete occlusion of medium-caliber branches of central vein.

Our findings allow us to infer that the vascular changes observed in the central vein branches are critical to the worsening of liver fibrosis. We also propose that the experimental model of toxic liver injury by DMN is adequate for the study of these vascular lesions

Keywords: Experimental fibrosis; Veno-obliterative lesion; Dimethylnitrosamine.

“LESÕES VASCULARES INTRA-HEPÁTICAS NA CIRROSE HEPÁTICA.
TENTATIVA PARA A CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL
EM RATOS WISTAR.”

RODRIGO GUIMARÃES ANDRADE

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOCRUZ

Dr. Luíz Antônio Rodrigues de Freitas
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOCRUZ

Dr. Zilton de Araújo Andrade
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOCRUZ

1 INTRODUÇÃO

Lesões vasculares são importantes na patogênese de muitas das doenças agudas e crônicas do fígado e estão relacionadas às principais doenças hepáticas no nosso meio como esquistossomose, hepatites e cirrose. Na cirrose as alterações anatômicas determinam, em grande parte, anormalidades vasculares na circulação intra-hepática, representadas por anastomoses vasculares internas (porto-hepáticas) e externas (porto-sistêmicas), além de hipertrofia da artéria hepática e capilarização sinusoidal (POPPER, 1977). Juntamente com essas alterações clássicas, a ocorrência ocasional de obstrução nos ramos de pequeno e médio calibre das veias porta e hepática tem sido descrita (PARKER, 1959). Estudos recentes têm focado a importância da fibrose obliterativa de veias centrais, porém seu completo entendimento ainda não foi estabelecido e muitos de seus aspectos fisiopatológicos permanecem obscuros (WANLESS et al., 1995; KISHI et al. 1999), o que torna necessária a avaliação mais profunda do papel destas lesões nas doenças hepáticas.

Morfologicamente, estas lesões venosas obliterativas são caracterizadas por espessamento fibroso da íntima, associado a vários graus de oclusão do lúmen da veia e a sua ocorrência tem sido relatada em quadros de cirrose hepática ocasionada pelas mais diversas etiologias (NAKANUMA et al., 1985), assim como em pacientes com hepatite e cirrose relacionadas ao uso de álcool. Tais alterações vasculares podem ser determinantes no agravamento da função hepática destes pacientes, além estarem associadas com a ocorrência de hipertensão portal nos mesmos (WANLESS et al., 1995; GOODMAN & ISHAK, 1982; BURT & MACSWEEN, 1986).

Atualmente, estas lesões vasculares têm sido também observadas em pacientes em uso de quimioterápicos, em vigência de radioterapia e após o transplante hepático, observações estas que tem despertado crescente interesse no seu entendimento e em suas conseqüências (GRINER et al., 1976; SLOANE et al., 1980; FAJARDO & COLBY., 1980; NAKAZAWA et al., 2000). Elas merecem ainda destaque, pois têm sido associadas a isquemia do parênquima hepático, morfológicamente caracterizada pela atrofia de hepatócitos e pela extinção de áreas do parênquima (WANLESS et al., 1995), resultando em progressiva alteração nos vasos de maior calibre e consequente fibrose das regiões centrolobulares (NAKAZAWA et al., 2000). O estudo destas alterações no fígado de humanos é restrito por considerações éticas que limitam ou mesmo impedem procedimentos experimentais em seres humanos, o que reforça a necessidade de modelos experimentais animais que reproduzam o quadro patológico e permitam o seu melhor entendimento. Neste contexto, a eficácia e reprodutibilidade dos modelos animais são fundamentais e cruciais para o estudo destas alterações, permitindo o avanço científico na área (JEONG et al., 2001).

A Dimetilnitrosamina (DMN), droga amplamente utilizada para desenvolvimento de cirrose hepática em modelos experimentais, foi recentemente utilizada em ensaio realizado em nosso Laboratório (dados não publicados). Nós observamos lesões obliterativas nas veias centrais dos fígados de ratos tratados com esta droga. Estas lesões envolviam pequenos ramos das veias hepáticas e, morfológicamente, exibiam as mesmas características acima descritas. Tais aspectos nos levaram a questionar se esta droga pode ser utilizada na obtenção de um modelo experimental que nos

permita estudar as lesões vasculares hepáticas, bem como abordar alguns aspectos dessas alterações vasculares, relevantes para progressão da lesão hepática.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Neste tópico será feita uma revisão sobre alguns aspectos gerais e relevantes sobre o assunto abordado, permitindo embasamento e compreensão dos resultados e discussão apresentados.

2.1 ESTRUTURA ANATÔMICA E FUNCIONAL

O fígado é um órgão de dupla circulação, no qual 70% do sangue e 40% do oxigênio é suprido pela veia porta, enquanto que 30% do sangue e 60% do oxigênio é suprido pela artéria hepática (BURT & DAY, 2002). A qualquer instante, cerca de 25% do débito cardíaco encontra-se direcionado para fígado (BURT & DAY, 2002). O sangue das veias mesentérica, gástrica, esplênica e pancreática drena para veia porta, sendo que a mesma se ramifica para os lados direito e esquerdo do fígado pouco antes de sua entrada pelo hilo hepático. Tal peculiaridade anatômica possibilita a ocorrência de uma mistura incompleta do sangue advindo de diferentes compartimentos, o que leva a variações no suprimento dos vários nutrientes, toxinas e outros elementos para os lobos hepáticos (HAYWOOD, 1981; FAA et al., 1987, 1994, 1995; THEIN et al., 2003; DANIEL et al., 2004). Uma redistribuição generalizada ou localizada do fluxo sanguíneo também pode ser devida a estímulos neurais ou devido às células estreladas hepáticas (STUART & WHEATLEY, 1995; ROSKAMS et al.,

2007). Juntas, estas duas características (anatômica e funcional) podem ser responsáveis pelas variações locais vistas na doença hepática.

O fígado humano é anatomicamente dividido em lobos, designados como esquerdo, direito, quadrado e caudato. Recentemente foi proposta sua subdivisão em 9 segmentos, baseado nos padrões de ramificação vascular e ductal (KOGURE et al., 1999; ROSKAMS et al., 2007). Este padrão compartimental é útil para entender as lesões/degenerações relacionadas com alterações no suprimento sanguíneo, além de facilitar as ressecções cirúrgicas. Este é um órgão heterogêneo cuja unidade funcional básica, o lóbulo hepático, continua a intrigar morfologistas há mais de 300 anos (MALARKEY et al., 2005). O lóbulo hexagonal clássico, como definido por Kiernan, em 1833, é tradicionalmente representado como um hexágono centrado por um ramo da veia hepática, exibindo de 4-6 espaços porta em seus vértices. Em 1954 Rappaport propôs o ácino hepático como a unidade funcional do fígado (RAPPAPORT et al., 1954). Sua divisão era baseada por zonas de hepatócitos entre veias centrais, o que se mostrou particularmente interessante pois tal divisão representava tanto uma unidade estrutural, como funcional, o que explicaria a variação local de lesões como a necrose e a fibrose em ponte.

O conceito de unidade funcional do fígado, proposta por Mastsumoto e colaboradores em 1979, vem ganhando crescente aceitação entre os especialistas da área. O lóbulo primário de Matsumoto é baseado na arquitetura vascular hepática e inclui o lóbulo clássico de Kiernan como um aspecto secundário (MATSUMOTO et al., 1979). Sua teoria se baseia na porção condutora e parenquimatosa da árvore venosa portal. A porção condutora deve levar sangue ao parênquima com uma pressão suficiente para

garantir que a circulação permaneça adaptável a qualquer alteração da demanda metabólica. Isso é possível pois a porção condutora permanece dentro de um mesmo calibre em todo seu percurso, oferecendo mínima resistência ao fluxo sanguíneo. A porção parenquimatosa da árvore portal segue um esquema de ramificações bem definido, em três níveis. No primeiro nível há ramificações das porções finais da árvore condutora que nutrem uma massa definida do parênquima hepático. No nível seguinte de ramificação, as ramificações primárias dão origem a cerca de seis ramos da veia porta centrados por um ramo da veia hepática, um aspecto morfológico similar ao do lóbulo clássico de Kiernan. No terceiro nível de ramificação, temos a formação de dois padrões de sinusóides hepáticos. O primeiro é formado por sinusóides que se originam da veia porta terminal e das porções proximais da vênula. Eles formam uma rede de sinusóides horizontais e paralelos, antes de formarem uma rede radial. O segundo padrão é constituído por sinusóides originados da porção mais distal da vênula, formando uma rede radial que se dirige à vênula central. Há diferenças metabólicas nos hepatócitos destas regiões.

O conceito mais recente foi proposto por Ekataksin e Wake em 1997 que estabeleceu o *Choleohepaton* baseado em injeções de material fluorescente e que definem um grupo de hepatócitos e de cerca de 19 sinusóides alimentados por um ramo terminal da vênula e que drena bile para um único canal de Hering. Esta unidade reúne todos os elementos necessários para o fígado realizar suas funções endócrinas-exócrinas.

2.2 LESÕES VASCULARES NA PATOLOGIA HEPÁTICA

Dada a grande quantidade de sangue que circula pelo fígado as alterações vasculares que ocorrem neste órgão tem considerável impacto clínico em todo organismo e no próprio órgão, em particular. Estas alterações podem ser agrupadas de acordo com a localização anatômica na qual se dá a lesão.

2.2.1 Alterações do influxo sanguíneo

2.2.1.1 Comprometimento da artéria Hepática

Infartos hepáticos extensos são raros graças a sua dupla circulação. O comprometimento de ramos da artéria hepática, seja por trombose/embolismo ou compressão, resulta em uma zona de necrose isquêmica focal, anêmica, cujo vértice aponta para o espaço porta contendo o ramo obstruído. A obstrução do ramo principal da artéria hepática nem sempre resulta em necrose isquêmica do órgão, particularmente se este é normal. O fluxo arterial retrógrado, advindo de ramos acessórios, juntamente com o fluxo portal, são suficientes para sustentar o parênquima hepático (CRAWFORD, 2010).

A exceção ocorre em fígado transplantados, cuja trombose da artéria hepática é uma complicação comum, ocorrendo em cerca de 2% a 5% de todos os receptores de transplante (PROPOSITO et al., 2001), e que pode levar a infarto dos ductos principais da árvore biliar e perda de todo órgão (KHALAF, 2010).

2.2.1.2 Obstrução e trombose da veia Porta

A trombose obliterativa da veia porta ou de seus principais ramos cursa clinicamente com dor abdominal e, na maioria dos casos, com ascite e outras

manifestações de hipertensão portal como varizes esofágicas (CRAWFORD, 2010).

Obstrução extra hepática da veia porta pode ser decorrente das seguintes condições:

- Flebite.
- Complicações cirúrgicas.
- Trauma.
- Colite ulcerativa.
- Alterações trombogênicas.
 - Distúrbios hereditários da coagulação.
 - Pancreatite.
 - Cirrose.
- Neoplasias.

A hipertensão portal secundária a trombose da veia porta geralmente tem um bom prognóstico, com sobrevida livre de doença pós-transplante de 94%, 84% e 69% em 1, 5 e 10 anos, respectivamente (EAPEN et al., 2010).

2.2.1.3 Hipertensão portal idiopática

Hipertensão portal idiopática é a designação clínica para o influxo venoso portal insuficiente e para hipertensão portal na ausência de cirrose. Varizes esofágicas e esplenomegalia são comuns nesta condição.

Estados de hipercoagulabilidade, doenças mieloproliferativas, peritonite, exposição a arsênicos e doenças auto-imunes, estão associados com quadros de hipertensão portal idiopática. A manifestação histológica da hipertensão portal idiopática é denominada esclerose hepato-portal, devido a densa fibrose

dos espaços porta e obliteração dos ramos venosos portais (Bioulac-Sage et al., 1995).

2.2.2 Alterações do fluxo intra-hepático

2.2.2.1 Cirrose

A cirrose é um estágio avançado de fibrose hepática que resulta em distorção arquitetural e do padrão vascular do fígado. É caracterizada pela formação de nódulos regenerativos de parênquima hepático circundados por septos fibrosos e por graves alterações angio-arquiteturais. Histologicamente, é determinada por septos fibro-vasculares que ligam os tratos portais uns com os outros e/ou com veias centrolobulares. Há formação de nódulos de hepatócitos regenerativos circundados por esses septos e desprovidos de veia central, o que confere um aspecto rígido ao órgão. A hiperplasia de ductos biliares também é frequentemente observada. A arterialização que ocorre em fígados cirróticos, com concomitante diminuição da resistência ao fluxo sanguíneo da artéria hepática e aumento da resistência ao fluxo sanguíneo portal, já está bem estabelecida (WANLESS & CRAWFORD, 2008). Razões para este fenômeno incluem a capilarização de sinusóides, que é a diminuição das frenestrações e deposição de matriz colagênica no espaço subendotelial, o que os torna canais vasculares semi-permeáveis, conduzindo o sangue portal diretamente às veias hepáticas terminais (LE BAIL et al., 1990). A aquisição de função contrátil pelas células estreladas do fígado aumenta o tônus vascular dos sinusóides, contribuindo ainda mais para o aumento da resistência vascular sinusoidal, bem como a fibrose que ocorre em regiões perivenulares

pode obstruir parcialmente o fluxo de saída venoso, criando resistência vascular pós-sinusoidal (CRAWFORD, 2010).

2.2.2.2 Oclusão física dos sinusóides

Esta condição é comumente vista em associação com um pequeno grupo de doenças que inclui:

- Anemia falciforme.
- Coagulação intra-vascular disseminada.
- Células tumorais metastáticas.
- Amiloidose.

2.2.2.3 Congestão passiva e necrose centrolobular

Insuficiência cardíaca com descompensação da câmara direita leva a congestão passiva do fígado, que se torna aumentado de volume, cianótico e endurecido e, microscopicamente, exhibe congestão dos sinusóides centrolobulares. Com o tempo, os hepatócitos centrais tornam-se atróficos. Se ocorre a descompensação da câmara esquerda, há hipoperfusão e hipóxia, levando à necrose coagulativa dos hepatócitos da zona central.

2.2.2.4 Peliose hepática

A peliose hepática é uma condição rara decorrente de dilatação primária dos sinusóides hepáticos (DELEVE, 2007). O fígado apresenta espaços císticos hemorrágicos delimitados por células endoteliais sinusoidais. Clinicamente, a peliose está associada a muitas doenças dentre elas câncer,

Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e tuberculose, além do uso de esteróides anabólicos, contraceptivos orais e Danazol (CRAWFORD, 2010).

2.2.3 Alterações do efluxo sanguíneo

2.2.3.1 Trombose das veias Hepática e Cava inferior

A obstrução de dois ou mais ramos principais da veia hepática, uma condição conhecida como Síndrome de Budd-Chiari, produz hepatomegalia, ascite, dor abdominal e graus variados de disfunção hepática (WANLESS, 2007). Ela é consequência do aumento da pressão sanguínea intra-hepática devido à incapacidade de drenagem do fluxo sanguíneo hepático (CRAWFORD, 2010). Os fatores mais comumente associados a esta condição são os estados de hipercoagulabilidade sanguínea, como nas doenças mieloproliferativas, uso de contraceptivos orais, presença de anticorpos anticardiolipina, deficiência de proteína S, proteína C e antitrombina III, síndrome antifosfolípidos e carcinoma hepatocelular. (WANLESS, 2007).

Morfologicamente, observa-se uma acentuada congestão centro-lobular e necrose. Trombos agudos ou em organização podem ser observados dentro de pequenos ramos da veia porta e hepática (MITCHELL et al., 1982).

Em fases tardias os sinusóides apresentam-se colagenizados e dilatados e os hepatócitos apresentam-se atróficos. Os pequenos ramos da veia hepática são incorporados aos septos fibrosos que ligam veias hepáticas entre si, ocorrendo preservação da tríade portal (WANLESS, 2007).

A mortalidade para a fase aguda da trombose da veia hepática não tratada é alta e intervenção cirúrgica imediata, com a criação de shunt venoso porto-sistêmico, melhora o prognóstico destes pacientes (CRAWFORD, 2010).

2.2.3.2 Síndrome de obstrução sinusoidal

Os primeiros casos da chamada “Doença Venoso-Oclusiva do Fígado” foram descritos na Jamaica, em 1954 (BRAS et al., 1954) e tinham como aspecto morfológico marcante a fibrose obliterativa de pequenos ramos da veia hepática. Casos semelhantes foram relatados em outras partes do mundo, todos exibindo os mesmos aspectos morfológicos e todos eles associados com a ingestão de chás ou alimentos contendo ou contaminados por alcalóides pirrolizidínicos (*Crotalaria*, *Heliotropium*, *Senecio* e *Symphytum*) (SELZER & PARKER, 1950, BRAS et al., 1954, JELLIFFE et al., 1957, BRAS et al., 1957, STEIN & ISAACSON, 1962, ALLEN et al., 1967, DATTA et al., 1978).

Estas lesões têm sido também observadas em pacientes transplantados em uso de imunossupressores e em pacientes oncológicos, em vigência de tratamento rádio e quimioterápico (GRINER et al., 1976, SLOANE et al., 1980, FAJARDO & COLBY, 1980). Inúmeras drogas anti-neoplásicas como actinomicina D, dacarbazina, arabinosídeo de citosina, mitramicina, 6-tioguanina e uretano estão diretamente relacionadas ao aparecimento destas lesões vasculares (MCDONALD et al., 1993; DELEVE et al., 2002).

Trabalhos demonstraram que há uma agressão tóxica direta às células endoteliais do fígado, com conseqüente obstrução ao fluxo sanguíneo sinusoidal e obliteração fibrosa das veias centrais (SHULMAN et al., 1994; DELEVE et al., 2009).

Estudos *in vitro* mostraram que toxinas relacionadas com lesão obstrutiva da veia central são mais danosas para célula endotelial (CE) do que para os hepatócitos (DELEVE, 2007). Essa toxicidade seletiva para a CE hepática envolve metabolização pelo sistema citocromo P450 (CYP450) dos hepatócitos

e do endotélio vascular, com formação de metabólito eletrofílico (LAMÉ et al., 2000). Esses metabólitos são detoxificados pelo sistema glutatião (GSH) e acentuada depleção de GSH na CE tem sido observada antes do início da agressão (DELEVE, 1996a, DELEVE et al., 1996b). A maior capacidade de detoxificação dos hepatócitos, explica a relativa proteção desta célula às lesões causadas por estes metabólitos.

Os estudos *in vivo* (DELEVE et al., 2002) evidenciam ainda a participação de metaloproteinases (MMP) de matriz, ectoenzimas responsáveis pela quebra da matriz extracelular. As MMP-9 e MMP-2 se elevam 12 horas após a administração inicial da toxina e seus níveis sobem consideravelmente após 48 horas, continuando elevados por até 4 dias (DELEVE et al., 2003a). O aumento das metaloproteinases coincide com a progressiva desnudação do endotélio sinusoidal, sugerindo uma ação direta dessas proteínas sobre a membrana basal da CE.

O metabólito eletrofílico, gerado a partir do CYP450 de hepatócitos e da CE, se liga covalentemente a F-actina da célula endotelial. Esta ligação leva à despolimerização da F-actina, com arredondamento da CE e subsequente ativação de MMP (WERB et al., 1986; UNEMORI & WERB, 1986). A quebra da matriz extracelular do espaço de Disse pelas MMPs, juntamente com o arredondamento da CE, permite que agregados de células de Kupffer e células estreladas "embolizem" para o sinusóide hepático. Estes "êmbolos" celulares, contribuem ainda mais para o bloqueio da circulação sinusoidal, levando a redução do calibre e mesmo oclusão de ramos da veia central (DELEVE et al., 2003b).

2.3 OCLUSÃO OBLITERATIVA DAS VEIAS HEPÁTICAS

A lesão obliterativa da veia hepática é caracterizada por espessamento fibroso da íntima, associado a vários graus de oclusão do lúmen da veia, um quadro que em muitos aspectos se assemelha àquele observado na Doença veno-oclusiva. Sua ocorrência tem sido relatada em pacientes com cirrose hepática ocasionada por hepatites virais, autoimunes e outras (NAKANUMA et al., 1985), porém são mais frequentemente observadas em pacientes com hepatite e cirrose relacionadas ao uso de álcool (GOODMAN & ISHAK, 1982; BURT & MACSWEEN, 1986). Algumas hipóteses acerca da sua origem foram levantadas por estes autores:

- Diminuição do fluxo sanguíneo sinusal devido à fleboesclerose, com redução concomitante do fluxo venoso, estreitamento e oclusão luminal;
- Agressão tóxica direta ao endotélio venular.

Lesões obliterativas em pequenos ramos da veia hepática têm sido encontradas em até 74% dos fígados cirróticos examinados em autópsia (WANLESS et al., 2000; GOODMAN & ISHAK, 1982; BURT & MACSWEEN, 1986) e em 70% dos fígados removidos após transplante (WANLESS et al., 1995). Acredita-se que estas lesões estejam relacionadas com áreas de extinção de parênquima e com regiões de fibrose confluyente e podem representar uma via final comum para propagação da fibrose e o surgimento de cirrose (WANLESS et al., 1995; WANLESS & SHIOTA, 2004).

2.4 LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA PELA DIMETILNITROSAMINA.

O termo nitrosamina se refere a vários compostos de diferentes pesos moleculares, cuja característica comum é sua estrutura química N-NO. No

grupo das nitrosaminas são encontradas a dimetilnitrosamina (DNM) e a dietilnitrosamina. A DNM é uma hepatotoxina potente com potencial carcinogênico, mutagênico e comprovadamente fibrogênico. O primeiro relato de cirrose hepática induzida pela dimetilnitrosamina data de 1954, em três trabalhadores de um centro de pesquisa industrial, cuja DMN havia sido introduzida como solvente 10 meses antes do primeiro caso ser descoberto (BARNES & MAGEE, 1954). A DMN é ainda detectada em alguns alimentos defumados como carnes e peixes e na fumaça do cigarro, sendo metabolizado no fígado pelo citocromo CYP450IIE1 (YANG et al., 1985, YOO et al., 1988). Sua administração intraperitoneal em animais experimentais causa acentuada elevação nos níveis séricos de transaminases, bilirrubinas, γ -glutamilttransferase e fosfatase alcalina, além de diminuição nos níveis séricos de proteínas (JENKINS et al., 1985).

Morfologicamente há uma congestão centrolobular intensa e difusa, dilatação de veias e sinusóides hepáticos, além de infiltração inflamatória neutrofílica e proliferação de ductos biliares. Porém, a alteração morfológica mais marcante é a necrose hemorrágica difusa que ocorre nas zonas 2 e 3 do ácino hepático (JIN et al., 2003).

No fígado, uma das consequências da sua administração prolongada é a fibrose que se inicia ao redor de veias centrais (GEORGE et al., 2001), além do aumento progressivo do colágeno total hepático, seja por medidas diretas (morfologia) ou indiretas, como através da medição do conteúdo de hidroxiprolina (GEORGE & CHANDRAKASAN, 2000; ALA-KOKKO et al., 1987). Clinicamente, estas alterações se traduzem pela presença de ascite e

aumento nos níveis pressóricos em ramos da veia porta e hepática (JENKINS et al., 1985).

Após a DMN ser metabolizada pelo citocromo CYP450 dos hepatócitos e das células sinusoidais hepáticas, observa-se a produção de formaldeído e metanol, além de um intermediário alquilante que reage com ácidos nucleicos e proteínas para formar macromoléculas metiladoras (GEORGE et al., 2001). Algumas alterações bioquímicas que podem contribuir para a lesão hepática causada por este modelo já estão bem estabelecidas. Diminuição nos níveis séricos de sódio, potássio, magnésio e cálcio foi demonstrada em ratos tratados com dimetilnitrosamina, o que pode ser consequência da ascite observada nestes animais e da diminuição dos níveis séricos de proteínas carreadoras, como a albumina (GEORGE, 2006). Um detalhe merece destaque. Embora haja diminuição dos níveis séricos destes minerais, os níveis intrahepáticos de cálcio livre aumentam nos dias que se seguem à primeira dose de dimetilnitrosamina. Como resultado, tem-se um influxo transmembrana de cálcio para as células estreladas, mediado por TGF- β 1, o que parece ser um fator chave para ativação desta célula e consequente deposição de matriz colagênica (GEORGE, 2006). Por outro lado, há indícios que a necrose hepática que se segue a administração da DMN também é responsável pela ativação de células estreladas hepáticas (BURT, 1993), que passam a se comportar como miofibroblastos depositando ativamente matriz colagênica no fígado (TANAKA et al., 1991; ENZAN et al., 1995). Associado com a deposição de colágeno há uma diminuição na síntese de enzimas colagenolíticas pelos hepatócitos agredidos, o que contribui ainda mais para o acúmulo de matriz conjuntiva.

Um outro aspecto significativo da lesão hepática induzida pela DMN, é o aumento importante dos níveis séricos e hepáticos de malondialdeído. A dosagem do malondialdeído é uma medida indireta da atividade oxidativa de lipídios e, portanto, peroxidação lipídica das membranas celulares e das organelas desponha como um dos potenciais mecanismos pelo qual a dimetilnitrosamina causa lesão hepática (GEORGE & CHANDRAKASAN, 2000).

3. OBJETIVOS

3.1 PRIMÁRIO

Estabelecer um modelo experimental onde as alterações vasculares relacionadas com fibrogênese hepática possam ser adequadamente observadas e estudadas.

3.2 SECUNDÁRIOS

3.2.1 Correlacionar a presença de obstrução vascular com o desenvolvimento de fibrose hepática.

3.2.2 Correlacionar a ativação de células estreladas com a presença de lesões vasculares obstrutivas e com a progressão da fibrose.

3.2.3 Observar a influência do agente etiológico no aparecimento de lesões obstrutivas das veias hepáticas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O material e os procedimentos utilizados na realização deste trabalho seguem descritos abaixo.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados vinte e oito ratos Wistar machos, pesando entre 200 e 250 g, provenientes do Biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz-FIOCRUZ/Salvador. Estes animais permaneceram em gaiolas padrão, tampadas com grade metálica, em número de sete animais por gaiola, em ambiente controlado (condições de umidade e temperatura do biotério). A iluminação artificial foi mantida em ciclo claro-escuro de 12 horas, sendo fornecidos água e ração balanceada para ratos (Nuvital, Curitiba, PR), em regime *ad libitum*.

4.2 MODELO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em 4 grupos constituídos de 7 animais cada, designados como grupo A, B, C e D. Todos os animais foram submetidos a injeções intraperitoniais de Dimetilnitrosamina (DNM) (Wako, Japão), na dose de 2,5 µl (35mg/kg), diluída em solução salina a 1%, três vezes por semana, por um período total de 1 a 4 semanas, conforme esquema abaixo:

Grupo A: 7 animais, injeções de DNM por 1 semana

Grupo B: 7 animais, injeções de DNM por 2 semanas

Grupo C: 7 animais, injeções de DNM por 3 semanas

Grupo D: 7 animais, injeções de DNM por 4 semanas

4.3 GRUPO E

Com a finalidade exclusiva de se observar a ocorrência da lesão vascular obliterativa em veias centrais de animais com cirrose hepática bem desenvolvida, recuperamos o material de estudo prévio realizado no laboratório LAPEX, do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Fiocruz/Bahia, cuja metodologia detalhada encontra-se descrita em artigo previamente publicado (DIVINICIUS et al. 2005).

4.4 EUTANÁSIA

Ao término do período de tratamento previamente estabelecido (7 dias para o grupo A, 14 dias para o grupo B, 21 dias para o grupo C e 28 dias para o grupo D) os animais foram sacrificados em câmara de CO₂.

4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS OBTIDAS

Nos grupos A-D, o fígado de cada animal foi removido e fixado por 24 horas em solução de formalina tamponada a 10%.

Para análise histológica foram obtidos quatro fragmentos do fígado de cada animal e esses fragmentos foram incluídos em blocos de parafina. Realizamos 6 secções de cada bloco de parafina, com cortes de 5 µm de espessura, obtidos em micrótomo manual.

Seis secções dos blocos de parafina do grupo E foram submetidas aos mesmos procedimentos histoquímicos abaixo mencionados.

4.5.1 Histoquímica

Os cortes dos tecidos obtidos foram desparafinados em xilol e xilo/etanol (1:1), reidratadas em sequência decrescente de etanol, lavados em água e corados. Após coloração estes cortes passaram por desidratação, na sequência inversa, sendo retirados do xilol e montadas com bálsamo. Procedimentos comuns a todas as colorações. As colorações e reações realizadas foram:

Hematoxilina & Eosina (HE): Coloração padrão para análise histopatológica das amostras.

Ácido Periódico de Schiff (PAS): Coloração realizada para observação de glicogênio no tecido hepático e de macrófagos contendo material PAS/diastase resistente em seu citoplasma.

Ácido Periódico de Schiff com diástase (incubação em saliva 1 h em estufa 37°C): Coloração realizada para observação de mucopolissacarídeos neutros no interior de ductos biliares e de glicogênio.

Perls: Reação utilizada para revelar depósitos de ferro.

Verhoeff: Coloração utilizada para avaliação conjunta de matriz conjuntiva e fibras elásticas.

Picrossírius vermelho: Coloração utilizada para avaliação de matriz conjuntiva.

4.5.2 Imunohistoquímica

Para demonstração de células estreladas ativadas, os cortes dos tecidos obtidos do grupo experimental foram desparafinados em xilol e xilo/etanol (1:1), reidratados em sequência decrescente de etanol e lavados em água. Os cortes foram submetidos à recuperação antigênica com tampão citrato, por 40 minutos em panela de pressão Pascal®-S2800 (Dako-Carpinteria, Califórnia, EUA).

Após resfriamento, os cortes foram lavados em solução PBS/Tween20 (Merck 822184, Darmstadt, Alemanha) por 5 minutos e logo em seguida incubados por 2 horas com anticorpo anti-actina para músculo liso (1A4, Dako-M0851, Glostrup, Dinamarca), diluído a 1:100. Ao término deste período as lâminas foram lavadas com solução PBS/Tween e reveladas utilizando-se polimerase. Após contra-coloração com hematoxilina, estes cortes passaram por desidratação, na seqüência inversa, sendo retirados do xilol e montadas com bálsamo.

4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

4.6.1 Quantificação das lesões vasculares.

Para este passo foram utilizados os cortes corados por Verhoff. Nas lâminas histológicas procedemos a contagem do número total de veias hepáticas representadas. Estas foram subclassificadas de acordo com o seu diâmetro, medido por régua milimetrada, em: veias de pequeno calibre - se elas apresentavam menos que 0,2mm em diâmetro; veias de médio calibre - se elas apresentavam entre 0,2 mm e 3 mm em diâmetro; veias de grande calibre - se elas apresentavam mais que 3 mm em diâmetro. As veias que exibiam fibrose da íntima envolvendo ao menos dois terços da circunferência do vaso e/ou qualquer grau de estreitamento luminal foram consideradas como apresentando lesão obliterativa.

4.6.2 Quantificação da fibrose

4.6.2.1 Por análise semi-quantitativa

As lâminas coradas com picrossirius vermelho foram avaliadas em microscópico óptico em campo de pequeno aumento (40x), utilizando-se os seguintes parâmetros para graduação da fibrose. Grau 0 - sem fibrose; grau 1 - fibrose pericentral; grau 2 - fibrose pericentral e periportal; grau 3 - fibrose em ponte; grau 4 - cirrose.

4.6.2.2 Por análise morfométrica

Utilizando-se os cortes histológicos corados pelo picrossirius vermelho, fotografamos as lâminas com filtro de luz polarizada, no microscópio óptico Nikon E200 e o software ImageJ(NCI) executou a captura das imagens e mensuração do colágeno, seguindo técnica previamente estabelecida e disponível em http://cardprint.ucsd.edu/CV_Lab_Web_Page/HowToDocs/ImageJProtocol.pdf.

As imagens foram feitas em aumento de 40x, tomando-se quatro campos consecutivos do fígado dos animais dos grupos B, C e D, nas áreas mais largas do parênquima, de modo a preencher toda área de captura das imagens. Tal metodologia nos permitiu analisar mais de 80% da superfície dos fragmentos.

Os quatro campos foram postos lado a lado e a imagem total gerada foi digitalizada e tratada de forma a contrastar as fibras colágenas da coloração de fundo por limiar de cor. Após esta separação, foi medida a área ocupada pelas fibras colágenas nos campos. A porcentagem da área ocupada pelo colágeno no fígado de cada animal foi calculada pelo software acima descrito e, a partir destes dados, os animais de cada grupo foram comparados estatisticamente.

4.6.3 Avaliação de focos de extinção do parênquima

Áreas de extinção de parênquima foram definidas como áreas onde havia perda de hepatócitos contíguos e fibrose pericentral, com atrofia de hepatócitos periportais e aproximação das veias hepáticas aos espaços porta. Para tal finalidade utilizamos as colorações de Hematoxilina-eosina, Verhoeff e Orceína.

4.6.4 Avaliação da ativação de células estreladas

A ativação de células estreladas foi avaliada por técnica imunohistoquímica, utilizando anticorpo anti-músculo liso (clone 1A4, Dako, diluição de 1:100). Foi realizada uma avaliação semi-quantitativa da ativação de células estreladas, utilizando-se escores de 0 a 4, 0 indicando a ausência de coloração; 1 indicando a presença de coloração discreta; 2 indicando a presença de coloração moderada; 3 indicando a presença de coloração intensa e 4 indicando a presença de coloração muito intensa.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do programa BioEstat® 5.0, utilizando-se o coeficiente de correlação de Spearman. Variáveis estatisticamente correlacionadas foram consideradas quando se obteve um coeficiente de correlação diferente de 0 ($r_s \neq 0$) e um nível de decisão alpha igual ou inferior a 0,05 ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 GRUPO A

Dois animais morreram durante a primeira semana de tratamento com DMN. Eles apresentavam arquitetura acinar preservada, com presença de lesões necro-hemorrágicas envolvendo a zona 3 centro-acinar do fígado. Havia acentuada tumefação e desnudamento do endotélio venular, com edema e hemorragia subendotelial (fig1). Os demais animais eutanasiados após 7 dias de tratamento exibiam os mesmos aspectos de hemorragia centro-acinar e alterações reativas do endotélio vascular.

Neste período já se evidenciava discreta fibrose subendotelial nas veias centrais, associada a desnudamento endotelial, recrutamento e adesão de células mononucleadas à parede destes vasos e, em alguns focos, semi-oclusão da luz dos pequenos ramos por células mononucleadas monocitóides (fig2). A arquitetura acinar do fígado encontrava-se mantida, com tríade portal preservada. O endotélio dos ramos vasculares portais exibiam alterações reacionais, em menor intensidade quando morfológicamente comparadas às alterações observadas no endotélio de veias centrais.

Os hepatócitos destes animais dispunham-se em trabéculas desorganizadas e exibiam moderada a acentuada tumefação citoplasmática, além de alterações nucleares reativas e raras figuras de mitose. Na periferia das zonas de necrose viam-se frequentes corpúsculos apoptóticos. Estas alterações estavam presentes em todas as secções analisadas.

5.2 GRUPO B

Os animais eutanasiados 14 dias após o início do tratamento apresentavam os achados necro-hemorrágicos acima descritos, porém em menor intensidade. Era evidente a fibrose subendotelial mais acentuada e as alterações morfológicas persistentes nas células endoteliais (fig3). Os focos de hemorragia subendotelial já não eram tão extensos e macrófagos contendo pigmentos de hemossiderina no citoplasma se acumulavam no espaço subendotelial de veias centrais de pequeno e médio calibre, juntamente com linfócitos e número cada vez maior de neutrófilos. Finos septos fibrosos emanavam destes vasos, alguns deles delimitando nódulos incompletos no parênquima e contendo ramos venosos de pequeno a médio calibre completa ou parcialmente ocluídos (fig 4). Nenhum dos animais exibia cirrose.

Era de nota a mobilização de células mononucleares nos sinusóides hepáticos e em alguns espaços porta, além das persistentes alterações degenerativas dos hepatócitos. Dois animais exibiram extinção focal de hepatócitos em zona 3, com remodelamento e expansão do tecido conjuntivo pericentral. A veia central, nestas área, encontrava-se próxima aos espaços porta, porém separados por uma pequena faixa de hepatócitos peri-portais preservados, alguns destes atroficos. Os espaços porta imediatamente adjacentes às áreas de extinção de parênquima, exibiam veias portais com mínima esclerose subendotelial, vendo-se lúmens sempre patentes. Havia progressiva colonização das áreas pericentrais e necro-hemorrágicas, por células estreladas ativadas (positivas para actina de músculo liso). A tabela 1 lista os principais achados encontrados nos animais tratados por 2 semanas com DMN.

Tabela 1: Oclusão de ramos da veia hepática de pequeno e médio calibre, fibrose (escore semi-quantitativo e análise morfométrica), focos de extinção de parênquima e ativação de células estreladas nos animais tratados com DNM por duas semanas.

Animal	Oclusão Vascular		Fibrose	Fibrose (análise morfométrica- %da área analisada)	Focos de extinção de parênquima	Ativação de células estreladas
	(em números relativos)					
	Pequeno	Médio				
1	35%	47%	2	2,826	ausentes	moderada
2	75,4%	77,8%	3	3,420	presentes	intensa
3	61,4%	40%	3	6,142	ausentes	intensa
4	68,4%	14,3%	2	2,472	ausentes	moderada
5	56,8%	50,0%	2	2,767	ausentes	discreta
6	41,9%	83,3%	3	2,044	presentes	intensa
7	37,5%	14,3%	1	1,141	ausentes	discreta

5.3 GRUPOS C e D

Os animais destes dois grupos exibiam aspectos morfológicos similares, sendo que um animal de cada grupo apresentou cirrose, com septos fibrosos ligando veias centrais entre si e delimitando nódulos no parênquima hepático. Todos os outros animais exibiam graus variados de fibrose, representativos dos escores 2 e 3 previamente estabelecidos neste estudo, com presença de espessos septos fibrosos centro-centrais, áreas mais extensas de fibrose pericentral e discreta fibrose portal (fig 5). A presença de veias de pequeno e médio calibre dentro dos septos fibrosos, com lúmens parcial ou totalmente ocluídos por tecido conjuntivo frouxo, foi um achado freqüente em praticamente todos os animais que completaram o tratamento. Quando o lúmen ainda se achava patente, o tecido conjuntivo frouxo era parcialmente forrado por endotélio, notando-se frequentes quebras na limitante elástica. Algumas vezes viam-se septos fibrosos contendo um único vaso longo, retilíneo e parcialmente ocluído, na ausência de artérias e ductos biliares (Fig 6). Trombo verdadeiro ou mesmo trombo em organização e “webs” não foram encontrados.

Focos de extinção do parênquima e a presença de corpúsculos apoptóticos foram mais frequentemente observados nestes animais, particularmente naqueles com maior número de lesões obliterativas em ramos da veia hepática (Fig 7). A figura 8 mostra os variados graus de ativação de células estreladas observada nos animais destes dois grupos. O envolvimento dos ramos da veia porta foi visto menos frequentemente e era representado por tecido subendotelial frouxo, raramente ocluindo o lúmen vascular. As outras estruturas dos espaços porta (ductos biliares e ramos arteriais) não exibiam anormalidades evidentes. Persistiam as alterações degenerativas dos hepatócitos. As tabelas 2 e 3 detalham os principais achados observados nestes animais.

Tabela 2: Oclusão de ramos da veia hepática de pequeno e médio calibre, fibrose (escore semi-quantitativo e análise morfométrica), focos de extinção de parênquima e ativação de células estreladas nos animais tratados com DNM por três semanas.

Animal	Oclusão Vascular		Fibrose	Fibrose * (análise morfométrica- %da área analisada)	Focos de extinção de parênquima	Ativação de células estreladas §
	(em números relativos)					
	Pequeno	Médio *;§				
1	48,2%	40%	3	3,095	presentes	intensa
2	50,8%	53%	2	1,893	ausentes	moderada
3	67,7%	73,7%	3	5,685	presentes	intensa
4	59,7%	83,3%	4	6,887	presentes	muito intensa
5	28,3%	0	2	0,952	ausentes	discreta
6	63%	60%	3	3,465	ausentes	intensa
7	56,8%	66,7%	3	2,704	ausentes	muito intensa

*Coeficiente de Spearman $r_s=0,82$; §Coeficiente de Spearman $r_s=0,78$. $p<0,05$.

Tabela 3: Oclusão de ramos da veia hepática de pequeno e médio calibre, fibrose (escore semi-quantitativo e análise morfométrica), focos de extinção de parênquima e ativação de células estreladas nos animais tratados com DNM por quatro semanas.

Animal	Oclusão vascular		Fibrose	Fibrose* (análise morfométrica- %da área analisada)	Focos de extinção de parênquima	Ativação de células estreladas
	(em números relativos)					
	Pequeno	Médio*				
1	55,5%	22,2%	2	2,083	ausentes	moderada
2	56,3%	10%	2	2,546	ausentes	moderada
3	44,7%	43,7%	3	2,710	ausentes	moderada
4	61,4%	84,6%	3	12,894	presentes	intensa
5	60,6%	85,7%	3	12,343	presentes	intensa
6	65,3%	66,7%	4	11,619	presentes	muito intensa
7	62%	75%	3	4,973	presentes	intensa

*Coeficiente de Spearman $r_s=0,89$. $p<0,05$.

5.4 GRUPO E

Dezesseis dos vinte três animais tratados com tetracloreto de carbono desenvolveram um quadro clássico de cirrose com lobulação reversa. Os hepatócitos desses animais que desenvolveram cirrose exibiam alterações degenerativas como esteatose, apoptose e balonização (fig 9). Foi visto um moderado infiltrado inflamatório mononuclear e edema, em espaços porta e em focos isolados do parênquima. Alguns macrófagos contendo pigmentos acastanhados e PAS-díastase resistentes estavam presentes nos espaços porta. Cuidadosa análise destas lâminas foi realizada, porém nenhuma das alterações vasculares anteriormente descritas foi observada nestes animais.

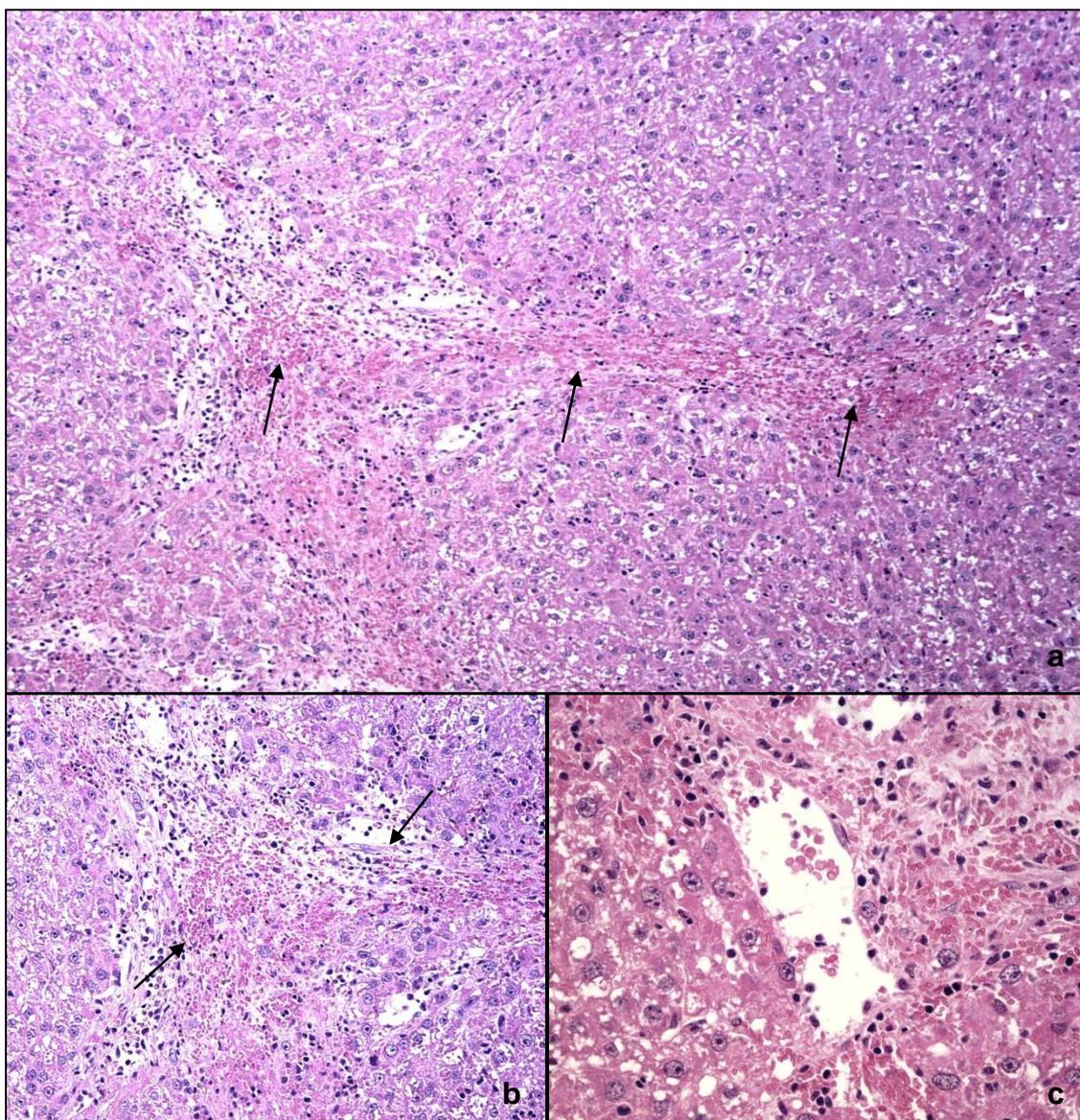


Figura 1 – Necrose hemorrágica em zona 3 acinar (setas), HE 100x (a) e 200x (b); Desnudamento e hemorragia subendotelial em ramo da veia central, HE 400x (c). Animais examinados 3 dias após o início do tratamento com DMN.

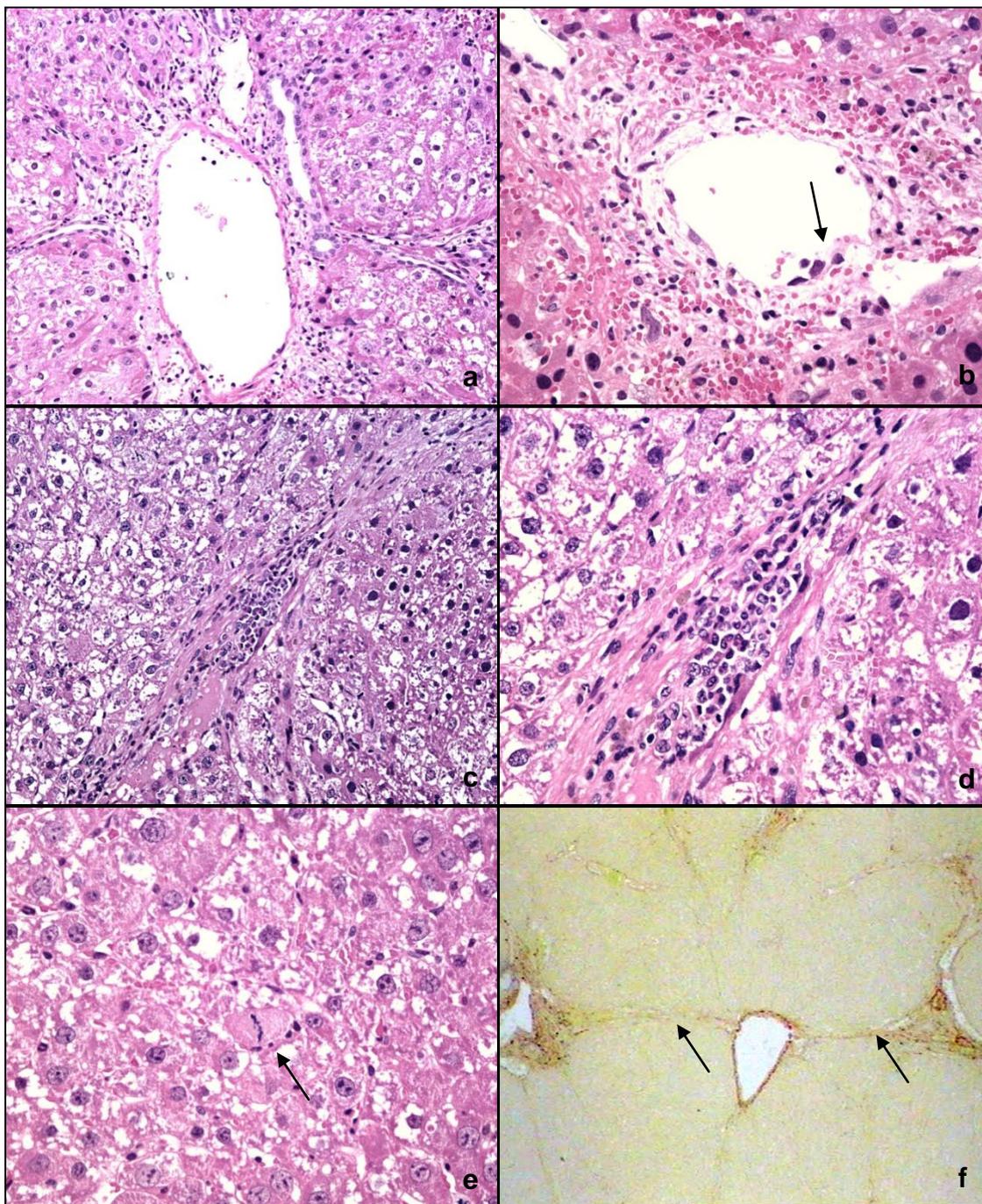


Figura 2 – Tríade portal preservada e mínimas alterações no endotélio vascular, HE 100x (a); fibrose subendotelial, hemorragia e tumefação endotelial (seta) em veia central, HE 200x (b); Ramo da veia central semiocluido por células mononucleares monocitóides, HE 200x (c) e HE 400x (d); Degeneração hidrópica e figura de mitose (seta) em hepatócitos com aspecto regenerativo, HE 400x (e); Finos septos fibrosos porto-centrais (setas), Picrosirius 100x (f). Animais examinados 7 dias após o início do tratamento com DMN.

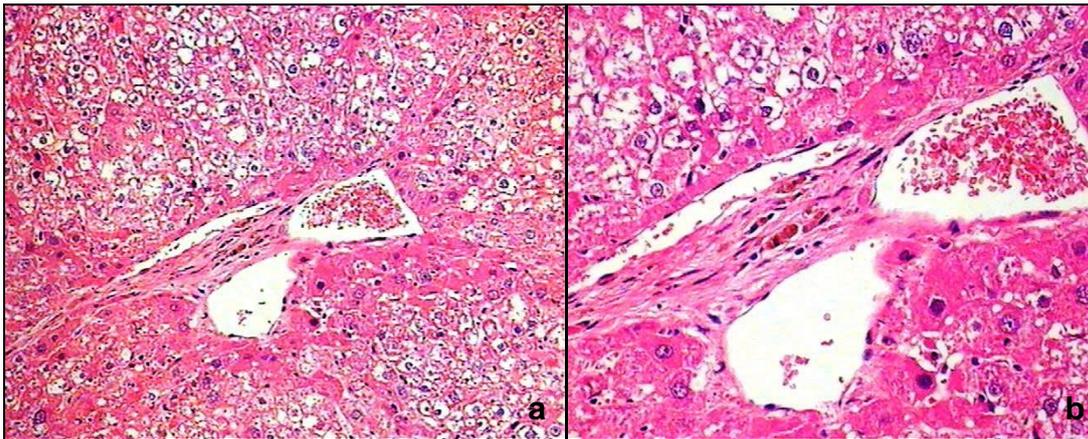


Figura 3 – Veia central com fibrose subentotelial evidente e com presença de macrófagos contendo pigmentos de hemossiderina no citoplasma, HE 100x (a) e HE 200x (b). Animais examinados 14 dias após o início do tratamento com DMN.

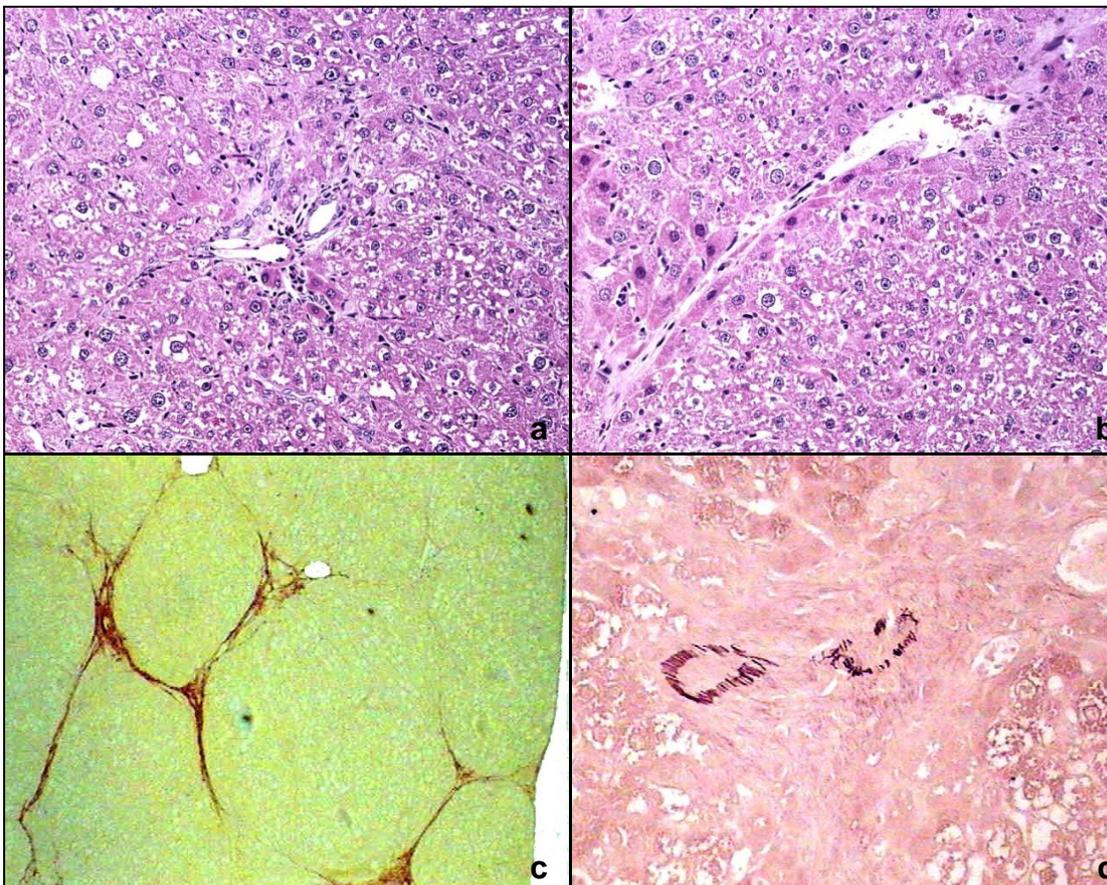


Figura 4 – Infiltrado linfóide portal discreto, HE 200x (a); Mobilização de células mononucleares dos sinusóides hepáticos, HE 200x (b); Fibrose septal e esboço nodular no parênquima, Picrosirius 100x (c); Oclusão de pequenos ramos da veia central, Orceína 400x (d). Animais examinados com 14 dias após o início do tratamento com DMN.

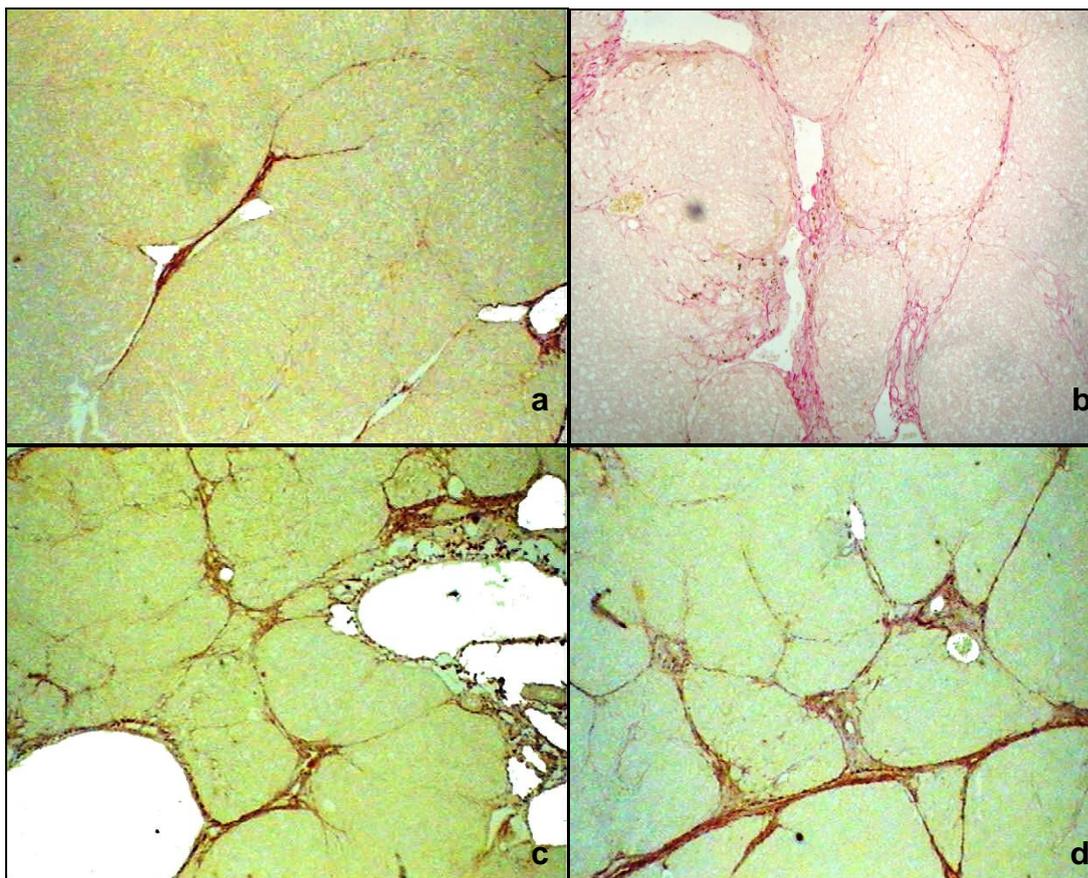


Figura 5 – Fibrose portal e presença de septos fibrosos centro-centrais, Picrossirius 100x (a); Fibrose septal com esboço nodular do parênquima, Picrossirius 100x (b); Cirrose hepática, Picrossirius 100x (c,d). Animais examinados após 28 dias do início do tratamento com DMN.

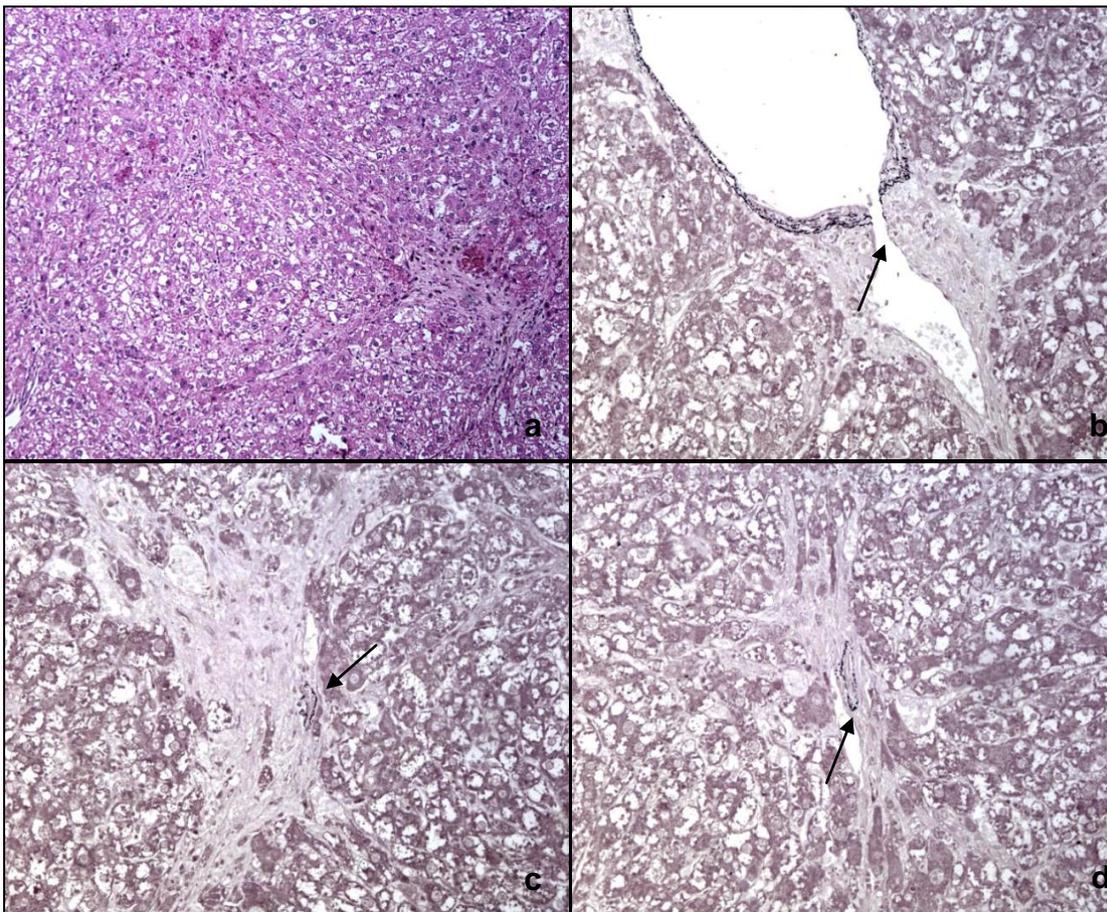


Figura 6 – Arquitetura acinar alterada por cirrose, HE 100x (a); Quebra da limitante elástica de veia central, Orceína 200x (b); Oclusão de pequenos ramos da veia central, Orceína 200x (c,d). Animais examinados 28 dias após o início do tratamento com DMN.

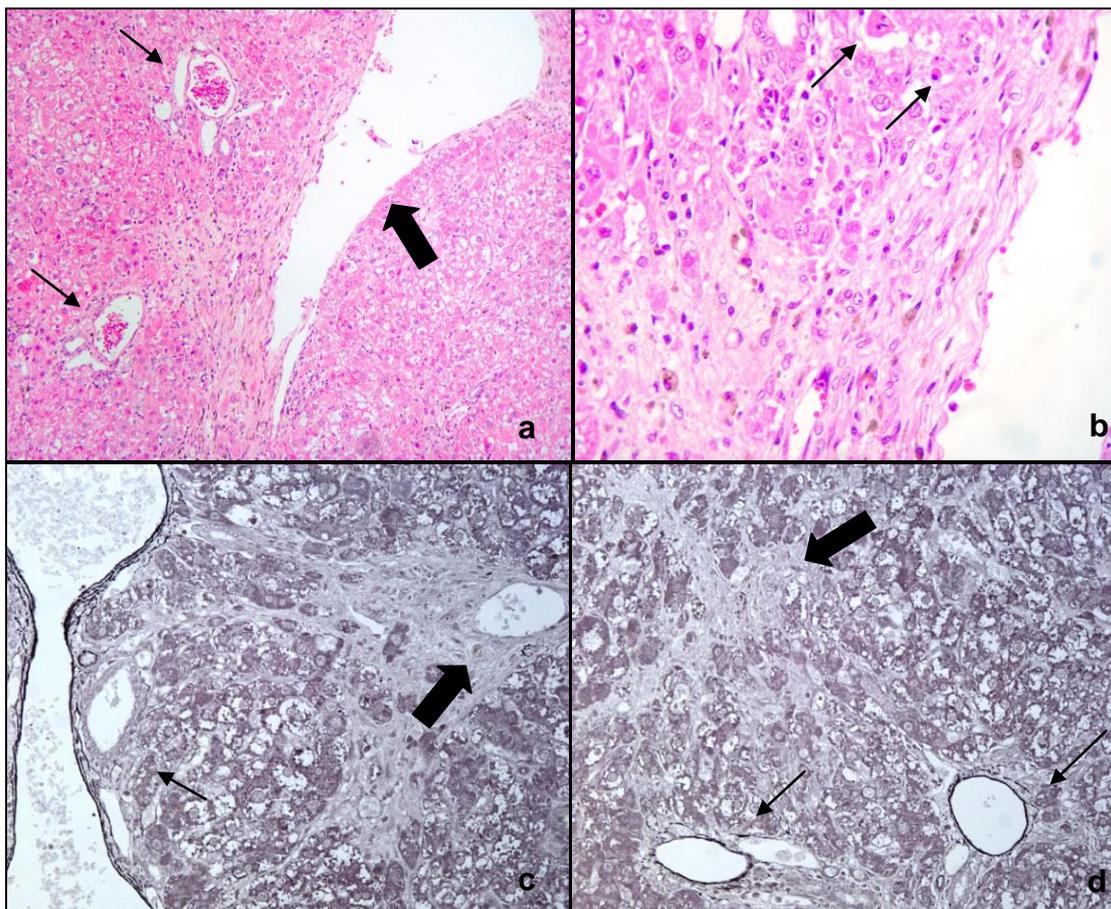


Figura 7 – Aproximação de veia central (setas maiores) e espaço porta (setas), HE 100x (a); Cospúsculos apoptóticos (setas) adjacentes à zona de extinção de parênquima HE 200x (b); Focos de extinção de parênquima. Veias centrais (setas maiores) e espaços porta (setas), Orceína 200x (c,d). Animais examinados 28 dias após o início do tratamento com DMN.

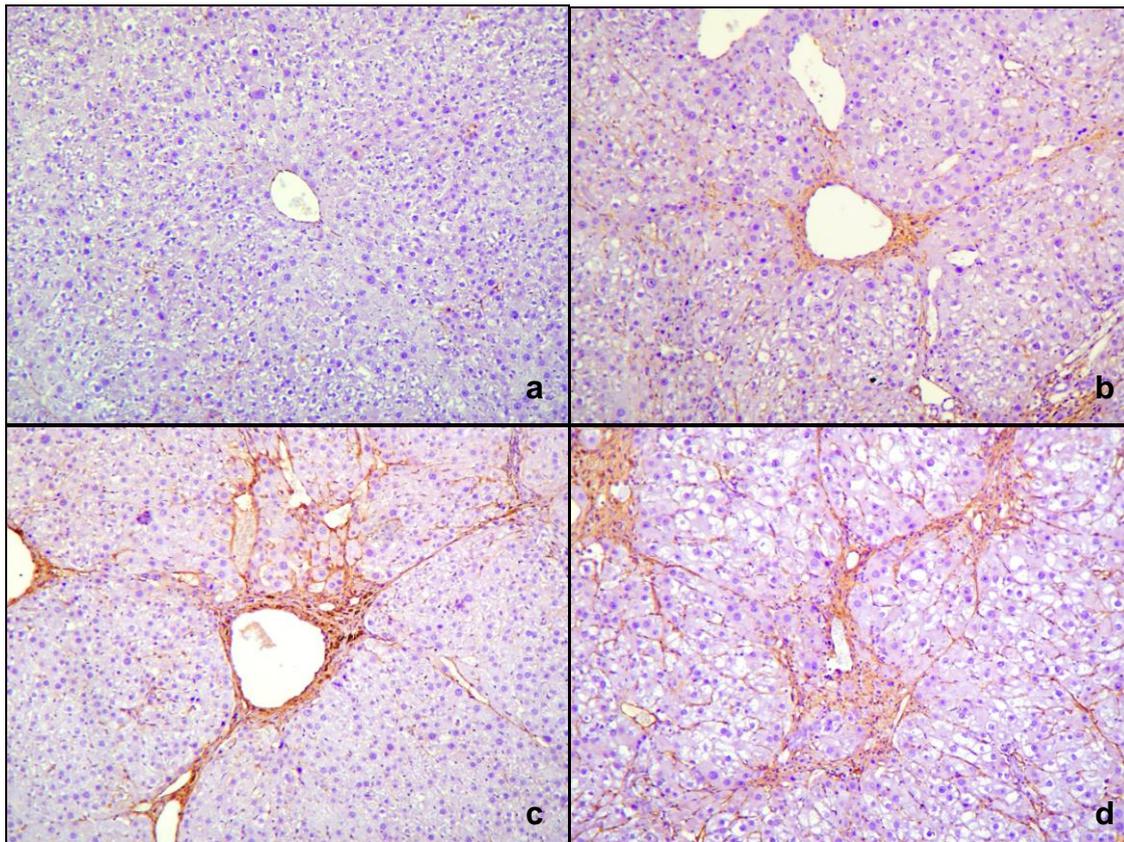


Figura 8 – Ativação de células estreladas. Ativação discreta (a), ativação moderada (b), ativação intensa (c) e ativação muito intensa (d). Marcação imunohistoquímica para actina anti-músculo liso (clone 1A4-Dako), 100x.

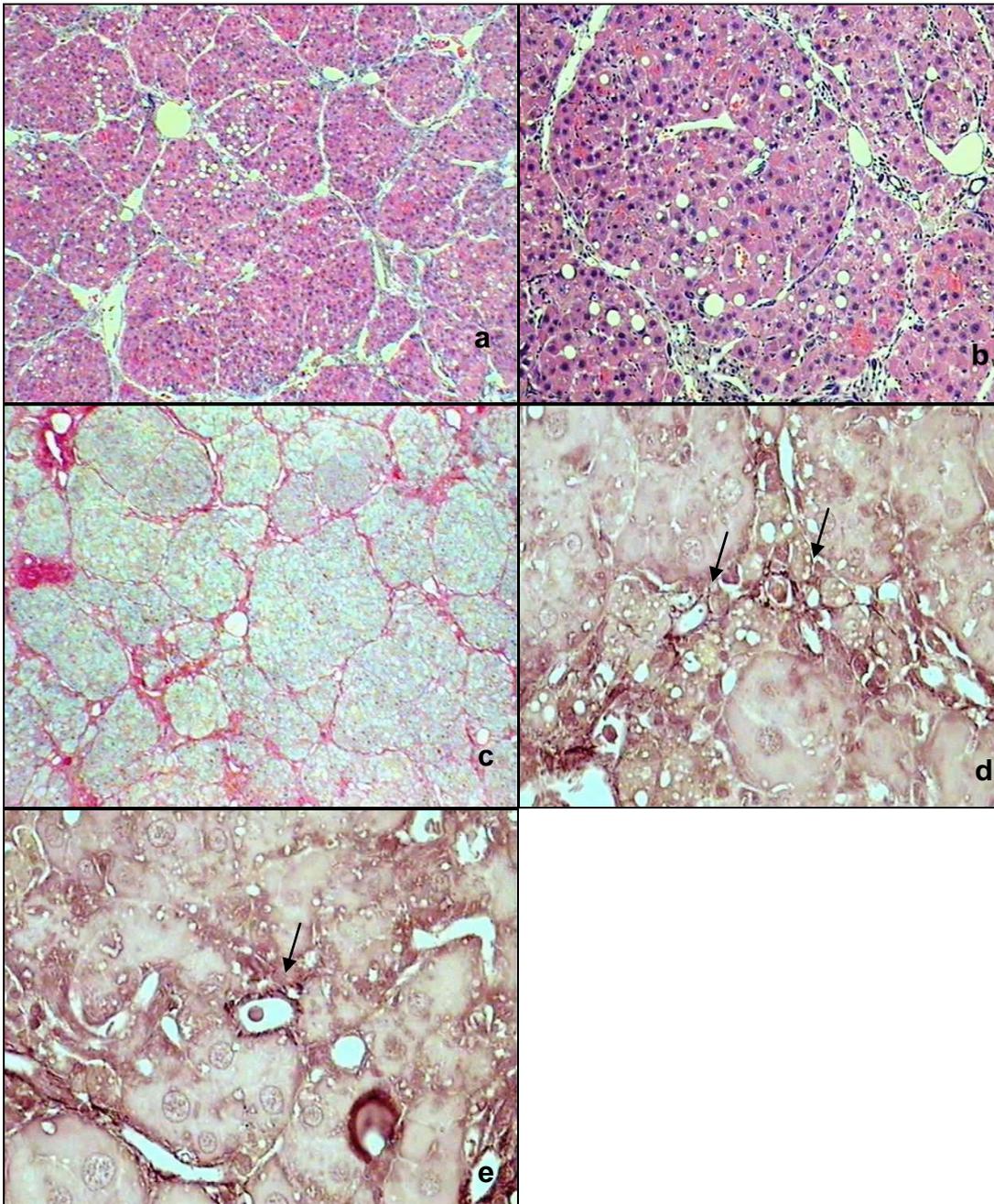


Figura 9 - Cirrose hepática com lobulação reversa, HE 100x (a); Focos de esteatose macrovacuolar e discreta tumefação de hepatócitos, HE 200x (b); Nódulos completos delimitados por septos fibrosos, Picrossirius 100x (c); Septos fibrosos exibindo pequenos ramos venosos (setas) com lúmens patentes, Orceína 40x (d,e). Animais examinados após 9 meses de tratamento com tetracloreto de carbono.

6 DISCUSSÃO

A toxicidade hepática causada pela DMN, primeiramente descrita em 1954 por Barnes e Magee, tem sido explorada em modelos experimentais devido à sua rápida capacidade de induzir fibrose hepática (GEORGE et al., 2001) e pelos aspectos morfológicos resultantes que se assemelham àqueles vistos na cirrose hepática humana (MADDEN et al., 1970). As alterações morfológicas observadas nos animais do presente estudo se comparam àquelas previamente descritas em outros estudos, sendo que ao término das 4 semanas de tratamento, todos os animais analisados desenvolveram algum grau de fibrose hepática (GEORGE et al., 2001; JENKINS et al., 1985). Porém, um aspecto morfológico pouco explorado nos estudos anteriores com DMN chamou atenção: a presença de lesões obstrutivas nos ramos da veia central foi observada em todos os animais sacrificados a partir da segunda semana após o início da administração de DMN.

Estes achados morfológicos são de potencial interesse, pois a presença de necrose centro-lobular, vista nos animais sacrificados com 1 semana de tratamento, juntamente com a ocorrência de obstrução vascular por esclerose subendotelial, leva-nos a crer que este tipo de lesão é um padrão de resposta vascular à agressão tóxica aguda pelos metabólitos da DMN (GEORGE et al., 2001).

Necrose centrolobular semelhante a vista em nosso estudo, é característica de lesões tóxicas do fígado como naquelas descritas na lesão hepática induzida pelo álcool e pelo tetracloreto de carbono (CAULET et al., 1989, KAWASAKI et al., 1994; GOODMAN & ISHAK, 1982). Há muito, sabemos que as alterações vasculares são importantes na patogênese de

muitas das doenças agudas e crônicas do fígado e estão relacionadas às principais doenças hepáticas no nosso meio, como esquistossomose, hepatites e cirrose. Embora sejam frequentes os estudos experimentais que exploram a DMN para o entendimento da fibrose hepática, ainda são raros os trabalhos que exploram este modelo para o melhor entendimento das alterações vasculares que ocorrem no contexto da fibrogênese hepática.

Tendo-se em vista a importância funcional destas lesões vasculares, como descrito por Wanless (1995), é ainda fraco o entendimento a respeito da sua patogênese (GOODMAN & ISHAK, 1982, BURT et al., 1986) e suas repercussões no órgão. Talvez isto se deva a ausência de um bom modelo experimental, no qual estas alterações vasculares possam ser observadas em seu espectro morfológico e, principalmente, suas repercussões possam ser devidamente exploradas.

No presente estudo, nós apresentamos um modelo experimental de lesão obliterativa vascular, de rápida execução, onde pudemos explorar alguns aspectos relacionados a estas lesões.

Como mencionado previamente, os animais sacrificados na primeira semana após o início do tratamento com DMN exibiram necrose hemorrágica extensa da zona 3 acinar, porém nenhum deles apresentou lesão vascular obliterativa, motivo pelo qual não foram submetidos à análise estatística.

Todos os animais sacrificados a partir da segunda semana após o início do tratamento com DMN exibiram lesões obliterativas em ramos de pequeno e/ou médio calibre da veia central. Segundo Nakanuma (NAKANUMA et al., 1985) estas lesões vasculares veno-obliterativas são decorrentes das profundas alterações anatômicas secundárias a cirrose hepática. Ainda de

acordo com este autor, a diminuição ou mesmo ausência de fluxo sanguíneo em algumas veias tributárias, devido à obstrução fibrosa e compressão dos sinusóides por nódulos regenerativos, levariam à proliferação da íntima numa tentativa de reduzir o calibre da veia para acomodar os níveis decrescentes do fluxo sanguíneo. Outros autores, por sua vez, acreditam que estas lesões não são consequência direta da cirrose e, segundo eles, a diminuição do fluxo sanguíneo venoso por fleboesclerose ou agressão tóxica direta ao endotélio venular poderiam explicar a ocorrência das mesmas (GOODMAN & ISHAK, 1982; BURT et al., 1986).

Wanless e cols. (2004) creditam a ocorrência destas lesões vasculares obliterativas à agressão inflamatória aos vasos, observada em pacientes com esteato-hepatite não alcoólica. Para os autores este é um dos mecanismos possíveis pelos quais as doenças inflamatórias do fígado, agudas ou crônicas, poderiam levar a oclusão destes ramos vasculares, com consequente progressão fibrosa e mesmo o desenvolvimento de cirrose (WANLESS & SHIOTA, 2004).

Nosso estudo aponta que a ocorrência destas alterações vasculares não depende de cirrose previamente estabelecida. Não observamos correlação entre a presença destas alterações vasculares e o grau da fibrose analisada por métodos semi-quantitativos, incluindo fibrose grau 4 (cirrose), nos animais dos grupos C e D. Juntamente com este achado e contrariando a hipótese idealizada por Nakanuma, também não observamos alterações vasculares obliterativas ao analisarmos as lâminas de animais com cirrose bem desenvolvida, induzida pelo CCL4 (grupo E). Considerando-se ainda estes achados, a presença de lesões oclusivas em veias hepáticas de ratos tratados

pela dimetilnitrosamina indica que o agente etiológico é mais importante na sua gênese, que a cirrose *per se*.

Em seu trabalho original, Wanless (WANLESS et al., 1995) sugere que a oclusão concomitante da veia porta e dos ramos de médio calibre da veia hepática (2 “hit” hypothesis), pertencentes a uma mesma zona de drenagem, está associada com piora da função e progressão da fibrose hepática devido a extinção de hepatócitos, colapso do parênquima hepático e ausência de atividade regenerativa nas áreas que exibem comprometimento vascular.

Ao compararmos as ocorrência de lesões vasculares obliterativas nos animais dos grupos C e D, com fibrose hepática medida tanto por método semi-quantitativo e quantitativo (morfometria), observamos correlação entre a oclusão de ramos de médio calibre da veia hepática e a presença de fibrose avaliada pela morfometria. Creditamos tal achado ao fato de que os métodos semi-quantitativos para graduação da fibrose não avaliam a extensão das áreas de remodelamento fibroso, bem como a espessura dos septos que atravessam o parênquima hepático. Portanto, nos parece que os métodos quantitativos de avaliação da fibrose são mais adequados e mostram com maior clareza a repercussão das alterações vasculares no órgão.

Observamos ainda que a obliteração isolada dos ramos da veia hepática, particularmente os de médio calibre, estavam associados com maior área de fibrose. Tanaka (1998) observou em seu estudo que a oclusão isolada de ramos da veia hepática ocasiona algum grau de extinção de parênquima da zona 3, além de fibrose pericentral. Os hepatócitos periportais, no entanto, permanecem viáveis e regeneram devido ao suprimento sanguíneo arterial e drenagem portal retrógrada (TANAKA & WANLESS, 1998). Tal peculiaridade

resulta em um padrão cirrótico “veno-cêntrico” ou, como anteriormente denominado, lobulação reversa, tal como o visto em nosso estudo.

Embora não tenhamos quantificado os focos de extinção de parênquima hepático, o que não nos permitiu realizar a correlação estatística, a simples observação das tabelas 2 e 3 nos mostra uma maior proporção de lesão vascular obliterativa nos ramos de médio calibre da veia central, naqueles animais cujos focos de extinção de parênquima estavam presentes.

Em estudo recente, onde foi analisado o papel destas lesões obliterativas venosas em casos de rejeição pós transplante hepático, foi observado que a lesão de vasos de médio e grande calibre estava associada à fibrose dos pequenos ramos da veia hepática, sendo particularmente comum quando mais de 40% dos ramos de pequeno calibre encontravam-se obliterados. Para estes autores, a obliteração dos pequenos vasos causaria estase sanguínea e consequente obliteração trombótica dos ramos de maior calibre da veia hepática (NAKAZAWA et al., 2000). Além de não termos visto tal correlação, não observamos nenhum sinal (trombos recentes, recanalizados ou a presença de “webs”) que nos sugerisse que a oclusão vascular tivesse sido resultante de trombose, o que nos leva a crer que as mesmas tenham ocorrido de forma simultânea nestes vasos e, possivelmente, tenham sido decorrentes de agressão endotelial tóxica causada pela droga utilizada (JIN et al., 2006).

Já está bem estabelecido o aumento progressivo de células estreladas ativadas (actina de músculo liso positivas) no modelo de fibrose experimental pela DMN (OHARA et al., 2008). Porém, até o momento, nenhum outro estudo correlacionou a ativação de células estreladas com a presença de lesão

vascular obliterativa da veia central. Nosso estudo mostrou que nos animais sacrificados após 3 semanas do início do tratamento com DMN, houve correlação entre a oclusão dos ramos de médio calibre da veia hepática e a ativação de células estreladas. Embora nossos dados não nos permitam analisar causa e consequência, acreditamos que os animais que apresentaram uma maior proporção de lesão vascular obliterativa nos ramos de médio calibre da veia hepática, cursaram, como anteriormente discutido, com alterações isquêmicas mais acentuadas, com consenquente apoptose de hepatócitos e colapso da região imediatamente adjacente a veia central. Canbay (2003) mostrou que a fagocitose de corpos apoptóticos pelas células estreladas resulta em aumento de expressão do fator de transformação do crescimento β (TGF- β), com aumento da expressão do mRNA do colágeno I α e inibição dos mecanismos de morte das células estreladas ativadas, sendo este um possível mecanismo para explicar a maior ativação destas células nestes animais (CANBAY et al. 2003).

7 COMENTÁRIOS FINAIS

Os achados do presente estudo sugerem que as alterações vasculares observadas em ramos da veia central, presentes nas mais diversas enfermidades do fígado, podem estar envolvidas no agravamento da fibrose no órgão. Deve-se considerar ainda que é de suma importância para o melhor entendimento destas alterações vasculares, o estabelecimento de um modelo experimental reprodutível e de fácil execução, tal como o proposto em nosso estudo, onde novas informações possam ser obtidas e somadas aos conhecimentos atuais, permitindo assim a possibilidade de intervenções com a finalidade de reverter tal processo, responsável ainda hoje por grande morbidade observada em pacientes com doenças hepáticas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALA-KOKKO, L.; PIHLAJANIEMI, T.; MYERS, J.C.; et al. Gene expression of type I, III and IV collagens in hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine in the rat. **Biochem. J.**, v. 244, p. 75-79, 1987.

ALLEN, J.R.; CARSTENS, L.A.; OLSON, B.E. Veno-occlusive disease in *Macaca speciosa* monkeys. **Am. J. Pathol.**, v. 50, n. 4, p. 653-667, 1967.

BARNES, J.M.; MAGEE, P.N. Some toxic properties of dimethylnitrosamine. **Brit. J. Industr. Med.**, v. 11, p. 167-174, 1954.

BIOULAC-SAGE, P.; LE BAIL, B.; BERNARD, P.H.; BALABAUD, C. Hepatoportal sclerosis. **Semin. Liver Dis.**, v. 15, p. 329-339, 1995.

BRAS, G.; BERRY, D.M.; GYORGY, P. Plants as aetiological factor in veno-occlusive disease of the liver. **Lancet**, v. 11, p. 960-962, 1957.

BRAS, G.; JELIFFE, D.B.; STUART, K.L. Veno-occlusive disease of the liver with non-portal type of cirrhosis occurring in Jamaica. **Arch. Pathol.**, v. 57, p. 285-300, 1954.

BURT, A.D. Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. **J. Pathol.**, v. 170, p. 105-114, 1993.

BURT, A.D.; DAY, C.P. Pathophysiology of the liver. In *Pathology of the Liver* (R. N. M. MacSween, A. D. Burt, B. C. Portmann, K. G. Ishak, P. J. Scheuer and P. P. Anthony, eds.), p. 67–105, 2002. Churchill Livingstone, New York.

BURT, A.D.; MACSWEEN, R.N.M. Hepatic vein lesions in alcoholic liver disease: retrospective biopsy and necropsy study. **J. Clin. Pathol.**, v. 39, p. 63-67, 1986.

Canbay, A.; Taimr, P.; Torok, N.; Higuchi, H.; Friedman S.; Gores, G.J. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. **Lab. Invest.**, v. 83, p. 655–663, 2003.

CAULET, S.; FABRE, M.; SCHOEVAERT, D.; LESTY, C.; MEDURI, G.; MARTIN, E. Quantitative study of centrilobular hepatic fibrosis in alcoholic disease before cirrhosis. **Virch. Arch.**, v. 416, p. 11-17, 1989.

CRAWFORD, J.M. Vascular disorders of the liver. **Clin. Liver Dis.**, v. 14, p. 635-650, 2010.

DANIEL, G. B.; DENOVO, R. C.; SHARP, D. S.; TOBIAS, K.; BERRY, C. Portal streamlining as a cause of nonuniform hepatic distribution of sodium pertechnetate during per-rectal portal scintigraphy in the dog. **Vet. Radiol. Ultrasound.**, v. 45, p. 78–84, 2004.

DATTA, D.V.; KUROO, M.S.; MATTOCKS, A.R.; AIKAT, B.K.; CHHUTTANI, P.N. Herbal medicines and veno-occlusive disease in India. **Postgrad. Med. J.**, v. 54, p. 511-515, 1978.

DELEVE, L.D. Cellular target of cyclophosphamide toxicity in the murine liver: role of glutathione and site of metabolic activation. **Hepatology**, v. 24, p. 830-837, 1996a.

DELEVE, L.D. Hepatic Microvasculature in Liver Injury. **Semin. Liver Dis.**, v. 27, n. 4, p. 390-400, 2007.

DELEVE, L.D.; SHULMAN, H.M.; MCDONALD, G.B. Toxic injury to hepatic sinusoids: Sinusoidal Obstruction Syndrome (veno-occlusive disease). **Semin. Liver Dis.**, v. 22, p. 27-41, 2002.

DELEVE, L.D.; ITO, Y.; BETHEA, N.W.; MCCUSKEY, M.K.; WANG, X.; MCCUSKEY, R.S. Embolization by sinusoidal lining cells obstructs the microcirculation in rat sinusoidal obstruction syndrome. **Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol.**, v. 284, p. G1045-G1052, 2003b.

DELEVE, L.D.; WANG, X.; KUHLENKAMP, J.F.; KAPLOWITZ, N. Toxicity of azathioprine and monocrotaline in murine sinusoidal endothelial cells and hepatocytes: the role of glutathione and relevance to hepatic veno-occlusive disease. **Hepatology**, v. 23, p. 589-599, 1996b.

DELEVE, L.D.; WANG, X.; TSAI, J.; KANEL, G.; STRASBERG, S.; TOKES, Z.A. Prevention of sinusoidal obstruction syndrome (hepatic veno-occlusive disease) in the rat by matrix metalloproteinase inhibitors. **Gastroenterology**, v. 275, p 882-890, 2003a.

DI VINICIUS, I.; BAPTISTA, A.P.; BARBOSA JUNIOR, A.A.; ANDRADE, Z.A. Morphological signs of cirrhosis regression. Experimental observations on carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis of rats. **Pathol. Res. Pract.**, v. 201, n. 6, p. 449-456, 2005.

EAPEN, C.E.; NIGHTINGALE, P.; HUBSCHER, S.G.; LANE, P.J.; PLANT, T.; VELISSARIS, D.; ELIAS, E. Non-cirrhotic intrahepatic portal hypertension: associated gut diseases and prognostic factors. **Dig. Dis. Sci.**, v. 56, n. 1, p. 227-235, 2011.

EKATAKSIN, W.; WAKE, K. The anatomy and physiology of the liver. In *Progress in Liver Diseases* (J. L. Boyer and R. K. Ockner, eds.), p.1–30, 1997. W. B. Saunders, Philadelphia.

ENZAN, H.; HIMENO, H.; IWAMURA, S.; SAIBARA, T.; ONISHI, S.; YAMAMOTO, Y.; MIYAZAKI, E.; HARA, H. Sequential changes in human Ito cells and their relation to postnecrotic liver fibrosis in massive and submassive hepatic necrosis. **Virch. Arch.**, v. 426, p. 95-101, 1995.

FAA, G.; LIGUORI, C.; COLUMBANO, A.; DIAZ, G. Uneven copper distribution in the human newborn liver. **Hepatology**, v. 7, p. 838–42, 1987.

FAA,G.; NURCHI,V.; DEMELIA, L.; AMBU,R.; PARODO,G.; CONGIU, T.; SCIOT,R.; VAN EYKEN, P.; SILVAGNI, R.; CRISPONI, G. Uneven hepatic copper distribution in Wilson's disease. **J. Hepatol.**, v. 22, p. 303–8, 1995.

FAA, G.; SCIOT, R.; FARCI, A.M.; CALLEA, F.; AMBU, R.; CONGIU, T.; VAN EYKEN, P.; CAPPAL, G.; MARRAS, A.; COSTA, V.; et al. Iron concentration and distribution in the newborn liver. **Liver**, v. 14, p. 193–9, 1994.

FAJARDO, L.F.; COLBY, T.V. Pathogenesis of veno-occlusive liver disease after radiation. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 104, n. 11, p. 584-588, 1980.

GEORGE, J. Mineral metabolism in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis. **Clinical Biochemistry**, v. 39, p. 984-991, 2006.

GEORGE, J.; RAO, K.R.; STERN, R.; Chandrakasan, G. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. **Toxicology**, v. 156, p. 129–138, 2001.

GEORGE, J.; CHADRAKASAN, G. Biochemical abnormalities during the progression of hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine. **Clinical Biochemistry**, v. 33, n. 7, p. 563-570, 2000.

GOODMAN, Z.D.; ISHAK, K.G. Occlusive Venous Lesions in Alcoholic Liver Disease. A study of 200 cases. **Gastroenterology**, v. 83, n. 4, p. 786-796, 1982.

GRINER, P.F.; ELBADAWI, A.; PACKMAN, C.H. Veno-occlusive disease of the liver after chemotherapy of acute leukemia. Report of two cases. **Ann. Intern. Med.**, v. 85, n. 5, p. 578-582, 1976.

HAYWOOD, S. The non-random distribution of copper within the liver of rats. **Br. J. Nutr.**, v. 45, p. 295–300, 1981.

JELLIFFE, D.B.; BRAS, G.; MUKHERJEE, K.L. Veno-occlusive disease of the liver and Indian childhood cirrhosis. **Arch. Dis. Child.**, v. 32, n. 165, p. 369-385, 1957.

JENKINS, S.A.; GRANDINSON, A.; BAXTER, J.N.; DAY, D.W.; TAYLOR, I.; SHIELDS, R. A dimethylnitrosamine-induced model of cirrhosis and portal hypertension in the rat. **Journal of Hepatology**, v. 1, p. 489-499, 1985.

JEONG, D.H.; JANG, J.J.; LEE, S.J.; LEE, J.H.; LIM, I.K.; LEE, M.J.; LEE, Y.S. Expression patterns of cell cycle-related proteins in a rat cirrhotic model induced by CCl₄ or thioacetamide. **J. Gastroenterol.**, v. 36, n. 1, p. 24-32, 2001.

JIN, Y-L.; ENZAN, H.; KURODA, N.; HAYASHI, Y.; TOI, M.; MIYAZAKI, E.; HAMAUZU, T.; HIROI, M.; GUO L-M.; SHEN, Z-S.; SAIBARA, T.

Vascularization in tissue remodeling after rat hepatic necrosis induced by dimethylnitrosamine. **Med. Mol. Morphol.**, v. 39, p. 33–43, 2006.

JIN, Y-L.; ENZAN, H.; KURODA, N.; HAYASHI, Y.; NAKAYAMA, H.; ZHANG, Y-H.; TOI, M.; MIYAZAKI, E.; HIROI, M.; GUO, L-M.; SAIBARA, T. Tissue remodeling following submassive hemorrhagic necrosis in rat livers induced by an intraperitoneal injection of dimethylnitrosamine. **Virch. Arch.**, v 442, p. 39-47, 2003.

KAWASAKI, H.; MURAWAKI, Y.; YAMADA, S.; YAMAMOTO, T. Toxic cirrhosis. **Nippon Rinsho.**, v. 52, p. 33-39, 1994 (abstract).

KHALAF H. Vascular complications after deceased and living donor liver transplantation: a single-center experience. **Transplant Proc.**, v. 42, p. 865-870, 2010.

KISHI, M.; MAEYAMA, S.; OGATA, S.; KOIKE, J.; UCHIKOSHI, T. Hepatic veno-occlusive lesions in severe alcoholic hepatitis and alcoholic liver cirrhosis: a comparative histopathological study in autopsy cases. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 23, n. 4, p. 47S-51S, 1999.

KOGURE, K.; ISHIZAKI, M.; NEMOTO, M.; KUWANO, H.; MAKUUCHI, M. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. **J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.**, v. 6, p. 171–5, 1999.

LAMÉ, M.W.; DANIEL JONES, A.; WILSON, D.W.; DUNSTON, S.K.; SEGALL, H.J. Protein targets of monocrotaline pyrrole in pulmonary artery endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 37, p. 29091-29099, 2000.

LE BAIL, B.; BIOULAC-SAGE, P.; SENUITA, R.; QUINTON, A.; SARIC, J.; BALABAUD, C. Fine structure of hepatic sinusoids and sinusoidal cells in disease. **J. Electron. Microsc. Tech.**, v. 14, p. 257-282, 1990.

MADEN, J.W.; GERTMAN, P.M.; PEACOCK Jr, E.E. Dimethylnitrosamine-induced hepatic cirrhosis – A new canine model of an ancient human disease. **Surgery**, v. 68, p. 260-268, 1970.

MALARKEY, D.E.; JOHNSON, K.; RYAN, L.; BOORMAN, G.; MARONPOT, R.R. New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology. **Toxicologic Pathology**, v. 33, p. 27-34, 2005.

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

MCDONALD, G.; HINDS, M.S.; FISCHER, L.D.; SCHOCH, H.G.; WOLFORD, J.L.; BANAJI, M.; HARDIN, B.J.; SHULMAN, H.M.; CLIFT, R.A. Veno-occlusive disease of the liver and multiorgan failure after bone marrow transplantation: a cohort study of 355 patients. **Ann. Intern. Med.**, v. 118, p. 255-267, 1993.

MITCHELL, M.C.; BOITNOTT, J.K.; S, K.; CAMERON, J.L.; MADDREY, W.C. Budd-Chiari syndrome: Etiology, diagnosis and management. **Medicine**, v. 61, p. 199-218, 1982.

NAKANUMA, Y.; OHTA, G.; KENJI, D. Quantification and serial section observations of focal venoocclusive lesions of hepatic veins in liver cirrhosis. **Virch. Arch. A**, v. 405, p. 429-438, 1985.

NAKAZAWA, Y.; JONSSON, J.R.; WALKER, N.I.; KERLIN, P.; STEADMAN, C.; LYNCH, S.V.; STRONG, R.W.; CLOUSTON, A.D. Fibrous Obliterative Lesions of Veins Contribute to Progressive Fibrosis in Chronic Liver Allograft Rejection. **Hepatology**, v. 32, p. 1240-1247, 2000.

OHARA, F.; NII, A.; SAKIYAMA, Y.; TSUCHIYA, M.; OGAWA, S. Pathophysiological Characteristics of Dimethylnitrosamine-Induced Liver Fibrosis in Acute and Chronic Injury Models: A Possible Contribution of KLF5 to Fibrogenic Responses. **Dig. Dis. Sci.**, v. 53, p. 2222–2232, 2008.

PARKER, R.G.F. Occlusion of hepatic veins in man. **Medicine**, v. 38, p. 369-402, 1959.

POPPER, H. Pathologic Aspects of Cirrhosis. A Review. **Am. J. Pathol.**, v. 87, n. 1, p. 228-264, 1977.

PROPOSITO, D.; LOINAZ SEGUROLA, C.; GARCIA GARCIA, I.; et al. Assessment of risk factors in the incidence of hepatic artery thrombosis in a consecutive series of 687 liver transplantation. **Ann. Ital. Chir.**, v. 72, p. 187-205, 2001.

RAPPAPORT, A.M.; BOROWY, Z.J.; LOUGHEED, W.M.; LOTTO, W.N. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. **Anat. Rec.**, v. 119, p. 11–34, 1954.

ROSKAMS, T.; DESMET, V.J.; VERSLYPE, C. Development, structure and function of the liver. In: MacSween's Pathology of the Liver (A.D.Burt, B.C. Portmann and L.D. Ferrell, eds.), p. 1–73, 2007. Churchill Livingstone, Philadelphia.

SELZER, G.; PARKER, R.G.F. Senecio poisoning exhibiting as Chiari's syndrome. A report on twelve cases. **Am. J. Pathol.**, v. 27, p. 885-907, 1950.

SLOANE, J.P.; FARTHING, M.J.; POWLES, R.L. Histopathological changes in the liver after allogeneic bone marrow transplantation. **J. Clin. Pathol.**, v. 33, n. 4, p. 344-350, 1980.

STEIN, H.; ISAACSON, C. Veno-occlusive disease of the liver. **Br. Med. J.**, v. 10, p. 372-374, 1962.

STUART, E.T.; WHEATLEY, A.M. Redistribution of portal venous but not hepatic arterial flow is induced by hepatic nerve stimulation in the perfused rat liver. **Arch. Physiol. Biochem.**, v. 103, p. 99–108, 1995.

TANAKA, Y.; NOUCHI, T.; YAMANE, M.; IRIE, T.; MIYAKAWA, H.; SATO, C.; MARUMO, F. Phenotypic modulation in lipocytes in experimental liver fibrosis. **J. Pathol.**, v. 164, p. 273-278, 1991.

TANAKA, M.; WANLESS, I.R. Pathology of the Liver in Budd-Chiari Syndrome: Portal Vein Thrombosis and the Histogenesis of Veno-Centric Cirrhosis, Veno-Portal Cirrhosis, and Large Regenerative Nodules. **Hepatology**, v. 27, p. 488-496, 1998.

THEIN, E.; BECKER, M.; ANETZBERGER, H.; HAMMER, C.; MESSMER, K. Direct assessment and distribution of regional portal blood flow in the pig by means of fluorescent microspheres. **J. Appl. Physiol.**, v. 95, p. 1808–16, 2003.

UNEMORI, E.M.; WERB, Z. Reorganization of polymerized actin: a possible trigger for induction of procollagenase in fibroblasts cultured in and on collagen gells. **J. Cell Biol.**, v. 103, n. 3, p. 1021-1031, 1986.

WANLESS, I.R. Vascular disorders. In: MacSween's Pathology of the Liver (A.D.Burt, B.C. Portmann and L.D. Ferrell, eds.), p. 613–648, 2007. Churchill Livingstone, Philadelphia.

WANLESS, I.R.; CRAWFORD, J.M. Cirrhosis. In: Pathology of the gastrointestinal tract, pancreas, liver and biliary tree (R.D. Odze, J.R Goldblum, eds.), p. 1147-1168, 2008. WB Saunders, Philadelphia.

WANLESS, I.R.; NAKASHIMA, E.; SHERMAN, M. Regression of human cirrhosis: morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 124, p. 1599-1607, 2000.

WANLESS, I.R.; SHIOTA, K. The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis and other fatty liver diseases: a four-step model including the role of lipid release and hepatic venular obstruction in the progression to cirrhosis. **Semin. Liver Dis.**, v. 24, n. 1, p. 99-106, 2004.

WANLESS, I.R.; WONG, F.; BLENDIS, L.M.; GREIG, P.; HEATHCOTE, E.J.; LEVY, G. Hepatic and Portal Vein Trombosis in Cirrhosis: Possible Role in Development of Perenchymal Extinction and Portal Hypertension. **Hepatology**, v. 21, n. 5, p. 1239-1247, 1995.

WEBER, L.W.D.; BOLL, M.; STAMPFL, A. Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 33, n. 2, p. 105-136, 2003.

WERB, Z.; HEMBRY, R.M.; MURPHY, G.; AGGELER, J. Commitment to expression of the metalloendopeptidases, collagenase and stromelysin:

relationship of inducing events to changes in cytoskeletal architecture. **J. Cell Biol.**, v. 102, p. 697-702, 1986.

YANG, C.S.; TU, Y.Y.; KOOP, D.R.; COON, M.J. Metabolism of nitrosamines by purified liver cytochrome P-450. **Cancer Res.**, v. 45, p. 1140–1145, 1985.

YOO, J.S.H.; GUENGERICH, F.P.; YANG, C.S. Metabolism of N-nitrosodialkylamines by human liver microsomes. **Cancer Res.**, v. 48, p. 1499-1504, 1988.

ZHAN, S.S.; JIANG, J.X.; WU, J.; HALSTED, C.; FRIEDMAN, S.L.; ZERN, M.A.; TOROK, N.J. Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. **Hepatology**, v. 43, p. 435-443, 2006.