

RESSALVA

Alertamos para ausência de páginas iniciais, não enviadas pela autora no arquivo original.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Generalidades

Numerosos estudos da composição da matriz extracelular (MEC) de fígados normais e com doenças hepáticas crônicas de etiologias diversas têm sido realizados em humanos por ser a cirrose hepática uma causa de mortalidade importante em decorrência da insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular¹. Em animais domésticos os alcalóides pirrolizidínicos contidos em plantas são causas importantes de fibrose e insuficiência hepática^{2;3} mas diferentemente da espécie humana, estudos de MEC normal ou de suas alterações em doenças hepáticas crônicas de diversas etiologias são muito poucos.

Muitos progressos foram obtidos com relação ao entendimento da fibrose hepática ou a deposição de matriz extracelular (MEC) e a evolução para cirrose e insuficiência hepática; entretanto, ainda não há um tratamento eficiente que pode reduzir a fibrose nesta doença¹. As observações atuais apontam para fibrose como um evento dinâmico e reversível em muitos casos e que a sua progressão reflete uma perda do equilíbrio entre deposição e degradação da matriz; o momento exato em que a fibrose torna-se irreversível seria a questão chave que permanece aberta para novas pesquisas com finalidades terapêuticas⁴.

1.2- Alcalóides pirrolizidínicos (APs)

Os APs compreendem um grupo de cerca de 200 substâncias, muitas das quais são hepatotóxicas e com ampla distribuição botânica e geográfica. As principais plantas que contêm APs associadas a intoxicações são as das famílias Boraginaceae (todos os gêneros), Asteraceae (= Compositae), gêneros *Senecio* e *Eupatorium* e Fabaceae (= Leguminosae), gênero *Crotalaria*. Dentro dessas famílias alcalóides tóxicos são encontrados principalmente em *Senecio*, *Crotalaria* e *Heliotropium*⁵ e também espécies de *Symphytum* (Confrey)^{6;5}.

O desconhecimento da toxicidade dessas planta levou, por exemplo, a propagação das espécies de *Crotalaria* nos Estados Unidos por serem boas fixadoras de nitrogênio e utilizados como adubo verde. Assim, essas plantas foram disseminadas, tornando-se silvestres. Após a sua propagação, casos de intoxicações em animais que pastavam em áreas invadidas por estas plantas começaram a ser relatados^{7;8}. Os primeiros casos de

intoxicações foram descritos em bovinos no início de 1903 e desde então relatos de intoxicações em animais de fazendas foram descritos em muitas partes do mundo⁹.

Intoxicações em humanos têm ocorrido por ingestão de chás dessas plantas usadas como ervas medicinais ou em epidemias por contaminação de grãos⁶. São também descritos como fonte de contaminação o leite de animais intoxicados^{10;11} e o mel de abelhas que polinizam essas plantas. Os alcalóides senecionina, senecifilina, jacoline, jacozina, jacobina e jaconina foram verificados em mel de abelhas que polinizavam *Senecio jacobae*¹². A passagem transplacentária dos metabólitos tóxicos é descrita em humanos¹³, equinos¹⁴, suínos¹⁵ e camudongos¹⁶.

Essas plantas não são palatáveis aos animais domésticos, mas perdas econômicas consideráveis podem ocorrer quando há ingestão acidental como contaminante de alimentos ou quando há escassez de pastagem, especialmente em estações secas em países tropicais e subtropicais¹⁷. Intoxicações espontâneas por plantas do gênero *Senecio* descritas em bovinos no Rio Grande do Sul têm ocorrido por ingestão da planta no período de brotação, entre maio e agosto. Alguns autores sugerem que a ingestão dessas plantas está associada às deficiências de fósforo, cobalto ou cobre na dieta¹⁸. Animais jovens de todas as espécies têm se mostrado mais susceptíveis à ação tóxica desses alcalóides¹⁹.

1.2.1- Mecanismos de ação dos Alcalóides Pirrolizidínicos (APs)

Os APs contidos nas plantas não são quimicamente reativos e quando ingeridos, grande parte deles é excretado inalterado, mas uma pequena proporção é metabolizada no fígado. Esse processamento requer de-hidrogenação de APs com produção de pirróis que são eletrofílicos e reagem com componentes teciduais nucleofílicos, como ácidos nucléicos e proteínas²⁰. Como o fígado é o principal local de produção desses pirróis tóxicos, ele é um dos dois principais órgãos-alvo, seguido pelo pulmão⁶.

Nos hepatócitos os APs sofrem hidrólise através da atividade de esterases e oxidação pela ação das monoxigenases microssomais para formar N-óxidos ou dehidro-alcalóides ou pirróis. Hidrólise e formação de N-óxidos são reações de detoxificação, e não causam danos às células. As monoxigenases microssomais flavinas são as mais importantes nessa biotransformação e o citocromo P450 também pode ser responsável em menor grau por catalizar a N-oxidação de alguns APs. Dehidro-alcalóides são metabólitos tóxicos primários, produzidos pela ação de citocromo P450, e podem reagir com nucleófilos viáveis dentro da célula. Estes ésteres pirrólicos (EPYs) podem também sofrer hidrólise e

formar álcoois pirrólicos (APYs), que são metabólitos tóxicos secundários, menos reativos e mais persistentes. Os EPYs são considerados hepatotóxicos de efeitos imediatos devido a sua alta reatividade, enquanto os APYs são menos reativos, de vida mais duradoura e produzidos pela hidrólise dos EPYs, induzem efeitos antimitóticos e a lesões mutagênicas e carcinogênicas⁶. Os efeitos imediatos desses metabólitos são considerados responsáveis pela agressão de hepatócitos periacinares, onde há maior concentração de enzimas P450, e as células endoteliais dos sinusóides nesta região e paredes de pequenas veias hepáticas levando a doença veno-oclusiva (DVO). Os metabólitos liberados na circulação podem ir do fígado ao pulmão causando lesões vasculares características de hipertensão pulmonar primária⁹.

Experimentos com inibição da ação de citocromo P450 e monooxigenase flavina em ovinos e hamsters sugerem que as diferenças de susceptibilidade a toxicidade de APs entre as espécies parecem ser dependentes da capacidade catalítica de enzimas hepáticas microsossomais sobre estes compostos²¹. A resistência de espécies como gerbil, hamster, codorniz, cobaias e coelhos a esses compostos é o resultado de um balanço entre bioativação, detoxificação e excreção dos alcalóides²². Entre os ruminantes há uma diferença de susceptibilidade entre ovinos e bovinos; os ovinos são considerados mais resistentes, e essa resistência é atribuída a maior quantidade de microorganismos no rúmen capazes de biotransformar e detoxificar esses alcalóides em relação aos bovinos^{23;24}. Parâmetros não microbianos no rúmen, como pH e taxas de renovação do seu epitélio e alta atividade de P450, conjugação com glutathione (GSH) e ácido glucurônico nas papilas das paredes do rúmen de ovinos, são também referidas como fatores importantes. Alguns autores consideram que as diferenças no metabolismo hepático dos ovinos são mais importantes do que a flora microbiana do rúmen²².

Além dos fatores acima comentados, há também variações na concentração dos alcalóides em plantas colhidas de diferentes regiões, em épocas diferentes do ano^{25;26}, em diferentes estádios de crescimento³ e nas diferentes partes da mesma planta²⁶. Um esquema representativo dos mecanismos de toxicidade dos APs é mostrado na Figura 1.

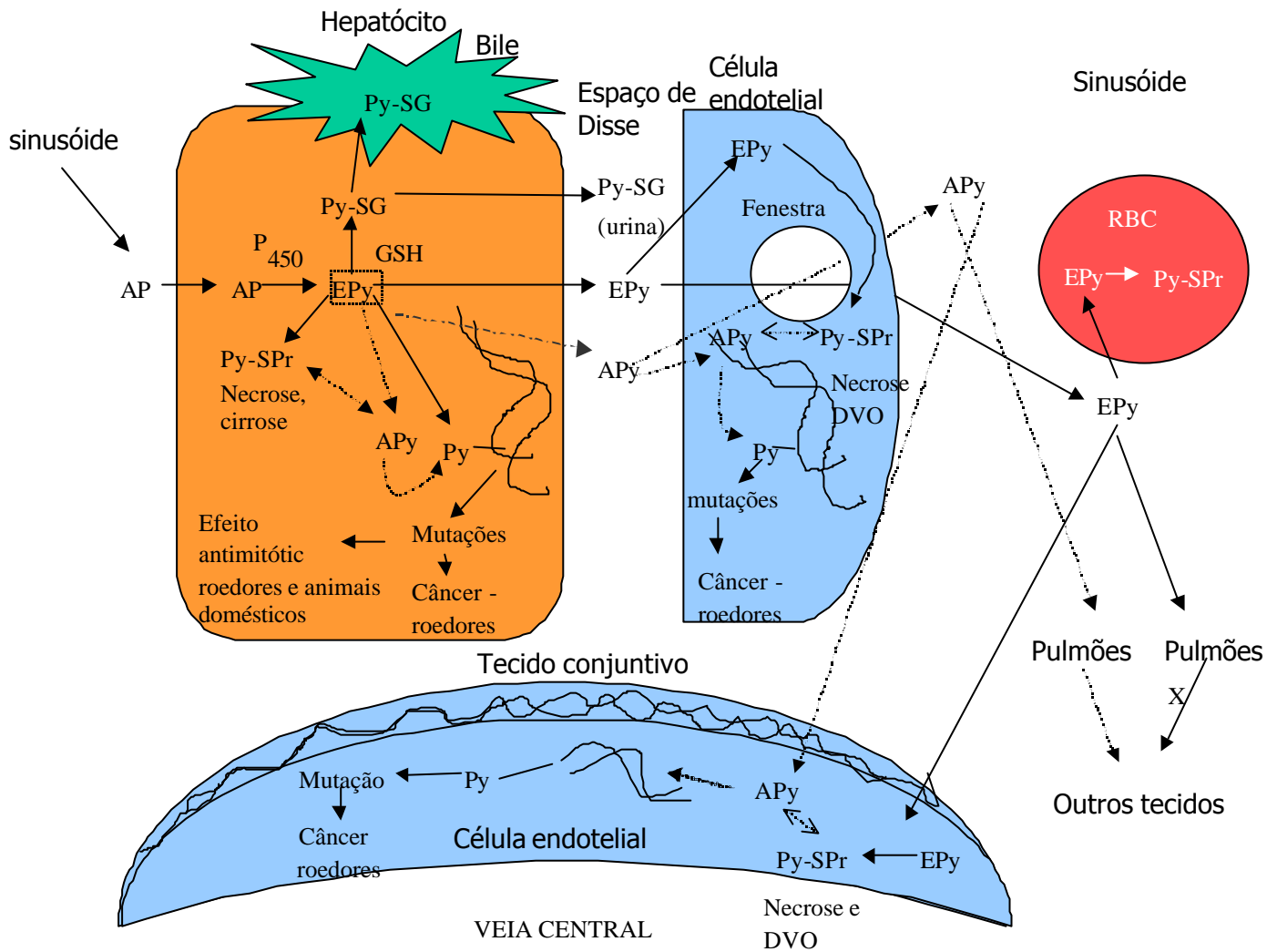


Figura 1 – Esquema representativo do mecanismo de toxicidade dos APs: AP(alcalóide pirrolizidínico); EPY(éster pirrólico); APY(álcool pirrólico); GSH (glutaciona); Py-SG(pirrol conjugado com glutaciona); Py-SPr(pirrol ligado a proteína tiol); RBC(eritrócitos); DVO(doença veno-oclusiva). Adaptado de Prakash et al⁶., 1999.

1.3 – Lesões decorrentes de intoxicações por APs

Plantas contendo APs são usadas como ervas medicinais tradicionais na América do Sul^{6;27}, em Sri-Lanka, na China⁶, na Ásia e na África²⁷. O confrey (*Symphytum officinale*) é uma das plantas mais estudadas, tendo sido demonstrada a presença desses alcalóides em folhas frescas⁶, raízes²⁸ e preparações comerciais com partes da planta dessecadas, sob forma de cápsulas e pílulas^{28;5}. Após um episódio de intoxicação associado a confrey²⁸, a venda de produtos da planta para uso interno foi banida nos EUA e no Canadá; entretanto, cataplasmas, cremes e unguentos para aplicação tópica produzidos com folhas e extratos continuam liberados⁵. Folhas de confrey são também consumidas em saladas, particularmente na Europa, América do Norte, Japão e Austrália e folhas de *Heliotropium digyum* na África Oriental⁶.

Em humanos o quadro mais importantes associado a essa intoxicação é a Doença Venó-Oclusiva (DVO), uma oclusão não-trombótica das veias centrais dos lóbulos hepáticos ou veias hepáticas sublobulares^{29;20}. A DVO tem sido descrita em ingestão acidental de grãos contaminados^{30;31;32} ou uso de plantas com esses alcalóides, como ervas medicinais^{19;28;5;20}. Intoxicação por APs é endêmica em muitas áreas como na Jamaica e em muitas regiões da África⁵ devido a casos de intoxicações por contaminação de grãos. As principais plantas envolvidas nestes casos são as espécies dos gêneros *Heliotropium*, *Senecio* e *Crotalaria*⁵.

A doença é mais freqüente em crianças e jovens, mas também ocorre em adultos^{19;13}. A forma aguda de DVO manifesta-se com hipertensão portal associada à obliteração de pequenas vênulas hepáticas^{5;31}, congestão e necrose hemorrágica centrolobular^{19;30;5;31}, que pode ser maciça compreendendo principalmente as zonas II e III do lóbulo hepático²⁰ e degeneração gordurosa¹⁹. As formas crônicas têm graus variados de fibrose ao redor da veia centrolobular com oclusão e recanalização de vasos, fibrose periportal e colapso e duplicação de fibras reticulares^{30;32}. A megalocitose que é bastante freqüente em animais intoxicados por APs, considerada característica das lesões por estes alcalóides⁹, não foi descrita em epidemias^{31;32}, nem em casos isoladas em humanos^{28;19;5;20}.

Intoxicações espontâneas em animais geralmente têm curso crônico, com manifestações clínicas e morte meses após a última ingestão da planta contendo APs; assim, algumas vezes, é difícil identificar a planta como causa da doença, pois nesse tempo a planta já pode ter desaparecido da pastagem^{2;3}. Lesões hepáticas agudas raramente são vistas em condições naturais³³.

Animais com intoxicações espontâneas são ruminantes^{33;34;35;18;36;3;37;38;39;40}, eqüinos^{41;42;14} e suínos^{43;44} com lesões hepáticas, renais e pulmonares. Os efeitos dessa intoxicação dependem também do tempo e da dose de exposição e variam também com a espécie animal⁹. Assim os suínos e as aves são as espécies consideradas mais susceptíveis, seguidas por eqüinos e bovinos; caprinos e ovinos são considerados relativamente resistentes²².

Apesar da ação hepatotóxica desses alcalóides ser a mais relatada, os animais com intoxicações espontâneas e experimentais podem apresentar, além do quadro de lesão hepática crônica, lesões mais importantes em outros sistemas. Os ovinos, considerados mais resistentes que os bovinos, podem apresentar também quadro de intoxicação crônica por cobre, secundária a intoxicação por APs^{35;37}; em suínos pode ocorrer lesões renais degenerativas^{45;46}; nas aves predominam lesões hepáticas agudas⁴⁷ e em eqüinos pode ocorrer pneumonia intersticial⁴⁸. Nos bovinos, espécie animal mais afetada, predominam sempre os casos de lesão hepática crônica^{36;33}, sendo esta espécie um bom modelo para estudo dessa lesão.

1.3.1 - Intoxicações espontâneas e experimentais em bovinos

Em bovinos têm sido descritos casos de intoxicações espontâneas por *Senecio brasiliensis*, no Brasil^{33;18}, *S. heterotrichius*, *S. cisplatinum*, *S. leptolobus* e *Senecio selloi* no Brasil¹⁸ e na Argentina³, *Senecio lautus* na Austrália^{36;38;40}, *Senecio subalpinus* na Albânia³⁹ e *Heliotropium europaeum* na Austrália³⁴.

Essas intoxicações podem ser agudas, subagudas ou crônicas⁴⁹, sendo a forma aguda mais raramente vista em condições naturais³³. Os animais mais jovens são, em geral, mais susceptíveis³⁶, mas em muitos surtos pode não ocorrer essa tendência¹⁸. As manifestações clínicas podem ser incaracterísticas apresentando emagrecimento^{34;36;40} como único sinal³³; outras manifestações são tenesmo^{33;18;36} ou diarreia³⁹ ou ambos¹⁸ e sintomatologia nervosa, principalmente com incoordenação motora e mudança de comportamento com agressividade; icterícia e fotossensibilização^{36;40} ocorrem com menor freqüência.

Derrames cavitários e edema de mesentério, abomaso, vesícula biliar e tecido subcutâneo^{33; 34;36} acompanham as lesões hepáticas crônicas; estas são representadas por desorganização arquitetural com graus variáveis de fibrose portal associada à proliferação ductal e megalocitose^{33;2;34;18;36;3}. A fibrose portal nesta espécie é bem mais acentuada do que em humanos²⁸. A megalocitose pode ser leve em alguns casos, predominando lesões

degenerativas e fibrose perivenular³⁸. Fibrose na região centrolobular com diminuição ou até obstrução da veia centro-lobular pode ser observada^{36;3;38}, evoluindo em alguns casos para DVO, semelhante à descrita em humanos³⁸ ou muito sutil em alguns casos³³. Megalocitose de células epiteliais dos túbulos e células mesangiais do glomérulo renal também pode ser observada^{33;3;40}. Na mucosa da vesícula biliar pode haver hiperplasia adenomatosa cística¹⁸.

*Senecio lautus*⁴⁰, *S. brasiliensis*^{50;49}, *S. heterotrichius*, *S. cisplatinum*, *S. selloi*, *S. leptolobus*⁵⁰, *S. jacobaea*¹⁰, *S. riddellii*⁵¹, *S. oxyphyllus*^{52D}, *Crotalaria mucronata*⁷ e *C. anagyroides*⁸ foram testadas experimentalmente em bovinos. Os sinais clínicos e achados de necropsia são semelhantes aos descritos nos casos espontâneos¹⁸. O aumento das enzimas hepáticas fosfatase alcalina e gama glutamil transferase é descrita em intoxicação experimental por *Senecio jacobaea*⁵³.

Lesões hepáticas agudas com necrose, hemorragia e congestão centrolobulares foram observadas em intoxicações com doses únicas de 17g, 5g e 35g/kg de *Senecio brasiliensis*⁴⁹. Experimentos com *S. brasiliensis* indicam que esta é uma das espécies mais tóxicas desse gênero⁴⁹.

Em experimentos com diferentes espécies de *Senecio* demonstrou-se que a seqüência de aparecimento das lesões hepáticas podem ser diferentes, sendo por exemplo a megalocitose um evento inicial em alguns casos⁴⁰ e evento final em outros casos⁵³. A relação dose X tempo para intoxicações por APs em bovinos é importante e há um nível limite além do qual a intoxicação ocorre; outras variáveis como os diferentes níveis de toxicidade das diferentes espécies de plantas que contem esses alcalóides e a resposta individual também devem ser considerados⁹.

Os trabalhos sobre intoxicações experimentais ou naturais por APs em bovinos descrevem a ocorrência de fibrose hepática acentuada, não incluindo estudos sobre os diferentes componentes da matriz extracelular (MEC). Estudos da dinâmica da MEC hepática indicam íntima correlação com as células dos sinusóides hepáticos, sendo esse balanço extremamente importante na manutenção da arquitetura normal do fígado. Assim, o desequilíbrio desses elementos é um gatilho para a instalação da fibrose e evolução para cirrose^{54;55;56}.

1.4 - A matriz extracelular (MEC)

A matriz extracelular (MEC) não é mais considerada apenas como um tipo de cimento biológico que simplesmente propociona um suporte estrutural passivo. Ela participa dos processos de diferenciação, movimento, ligações e expressões fenotípicas celulares, e o seu acúmulo é um fator proeminente na manutenção da função normal, na reparação e cicatrização dos tecidos^{55;57}.

A MEC de vários órgãos é composta dos mesmos grupos de moléculas, e em muitos casos dos mesmos componentes individuais. Diferentes concentrações e associações destes componentes resultam em uma matriz especializada para as necessidades e funções específicas de cada órgão⁵⁸. As principais macromoléculas que compõe a matriz são principalmente produzidas localmente pelas células da matriz, sendo que na maioria dos tecidos conjuntivos os fibroblastos são considerados as principais células secretoras deste componentes⁵⁹.

As duas classes principais de macromoléculas extracelulares que formam a MEC dos tecidos são: cadeias de polissacarídeos chamadas glicosaminoglicanas (GAGs) geralmente ligadas a proteínas na forma de proteoglicanas e proteínas fibrosas estruturais como o colágeno, a elastina e proteínas fibrosas adesivas como a fibronectina e laminina⁵⁹.

As moléculas de GAGs e proteoglicanas no tecido conjuntivo formam uma substância gelatinosa, hidratada, onde as proteínas fibrosas estão embutidas. Esta matriz resiste a forças compressoras exercida sobre ela, permite difusão de nutrientes, metabólitos e hormônios entre o sangue e as células do tecido, preenchem a maior parte do espaço extracelular, fornecendo suporte mecânico aos tecidos e permitindo a rápida difusão de moléculas hidrossolúveis e a migração celular. As proteoglicanas regulam, estabilizam a arquitetura da MEC e desempenham papel importante no arranjo espacial dos seus componentes⁵⁷, sendo freqüentemente encontradas associadas com fibras de colágeno, superfícies celulares e outros componentes da matriz⁵⁸. São importantes também na sinalização química entre as células, ligando-se a fatores de crescimento, enzimas proteolíticas (proteases) e inibidores de proteases para controlar proteínas secretadas⁵⁹. Fatores de crescimento como TGF β 1, 2 e 3, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento dos queratinócitos (KGF), interferon γ , IL-3 entre outros que estão ligados ao núcleo protéico ou às cadeias de GAGs das proteoglicanas⁵⁷.

Os colágenos são proteínas fibrosas, que fornecem força tensora aos tecidos, mantêm a sua integridade estrutural e têm um número de outras funções biológicas importantes⁶⁰ e

são as mais abundantes nos mamíferos, constituindo cerca de 1/3 de sua massa protéica total⁶¹. A sua principal característica é a estrutura longa, rígida de sua fita tripla helicoidal, na qual três cadeias polipeptídicas de colágeno, chamadas cadeias α , são enroladas umas nas outras, formando um tipo de corda super torcida⁵⁹. Em alguns tipos de colágenos, as três cadeias α são idênticas, enquanto em outros tipos de moléculas contém 2 ou 3 tipos de cadeias α . Em cada uma das cadeias polipeptídicas o terceiro aminoácido é sempre a glicina, e portanto a sequência de uma cadeia α ou um domínio de um colágeno numa proteína pode ser expressado como (Gly-X-Y)_n, onde X e Y representam outros aminoácidos, além da glicina e n varia de acordo com o tipo e domínio do colágeno. Prolina é freqüentemente encontrada na posição X e 4-hidroxiprolina na posição Y, estes dois aminoácidos propocionam estabilidade para a tripla hélice, que adicionalmente é estabilizada por ligações de hidrogênio e pontes de água⁶⁰.

A superfamília dos colágenos atualmente inclui 19 proteínas formalmente definidas como colágeno, além de 4 cadeias polipeptídicas de colágeno que estão sendo atuamente caracterizadas e mais 15 proteínas que tem domínios comuns ou similares ao colágeno ^{apud}⁶⁰. Os colágenos podem ser agrupados em 2 principais classes moleculares: uma classe formadora de fibrilas (I, II, III, V e XI) e outra classe heterogênea de colágenos não-fibrilares que são os formadores de rede (IV, VIII e X), microfilamentos granulosos (VI), filamentos de ancoragem (VII), os colágenos associados a fibrilas com tripla hélice interrompida – FACITs (IX, XII, XIV, XVI, XIX e XX), colágenos transmembrana (XVII) e as multiplexinas (XIII, XV e XVIII)⁵⁷. Os fibroblastos, principalmente, miofibroblastos e osteoblastos produzem colágeno, embora células epiteliais, endoteliais, musculares e perineurais possam também contribuir em menor escala⁶¹.

A elastina se organiza sob a forma de fibras elásticas, elaunínicas e oxitalânicas. Ultrastruturalmente as fibras elásticas são compostas de um núcleo central de elastina circundado por microfibrilas; em alguns locais há somente feixes de microfibrilas sem material amorfo, que são as fibras oxitalânicas e em outras áreas há microfibrilas intercalados com material amorfo que são as fibras elaunínicas ^{apud}⁶². As propriedades elásticas destas fibras nos mamíferos dependem da quantidade de elastina ⁶², mas as glicoproteínas que compõem as microfibrilas são muito importantes para a sua integridade que associadas aos colágenos permitem a resistência a forças tensoras, conferindo elasticidade a MEC⁵⁹.

As proteínas adesivas são importantes tanto na organização da matriz como na ligação das células a ela⁵⁹. A fibronectina é uma proteína plasmática e estromal, de aspecto granular ou como filamentos finos, com sítios específicos de ligação para membranas celulares, colágeno e proteoglicanas, promovendo migração celular através da MEC, sendo bastante importante na reparação e cicatrização de lesões⁵⁵. Sua forma plasmática também está presente nos líquidos amniótico e cérebro-espinhal e urina⁵⁸. A laminina é uma das principais proteínas da matriz sintetizada pelo embrião, e em fases iniciais do seu desenvolvimento a lâmina basal contém muito pouco ou nenhum colágeno tipo IV, consistindo principalmente de uma rede de laminina⁵⁹.

As variações nas quantidades relativas dos diversos tipos de macromoléculas e o modo como são organizadas na matriz, gera uma diversidade espantosa de formas de acordo com a função. A matriz pode tornar-se mineralizada para formar os ossos ou dentes, ou pode tornar-se transparente como na córnea, ou adquirir estrutura em corda que dá aos tendões a sua enorme resistência à força tensora. Na interface entre epitélio e tecido conjuntivo, a matriz forma a lâmina basal que possui papel importante no controle do comportamento celular⁵⁹.

No fígado, estudos recentes indicam que a MEC modula o desenvolvimento, regeneração e manutenção da arquitetura normal, assim como está intimamente relacionada com a diferenciação celular⁵⁵.

1.4.1 - A matriz extracelular hepática

A distribuição dos componentes da MEC têm sido extensamente estudada em fígados humanos normais^{63;64;65;58;66;67} e com fibrose ou cirrose^{63;64;65;68} e menos freqüentemente em fígados normais de ratos^{69;70} e babuínos⁷¹ e fígados de ratos em regeneração^{56;55} e com cirrose⁵⁴. Estes estudos além de descrever os constituintes da matriz nesses diferentes estádios, ajudaram a estabelecer associações com as funções das células perisinusoidais na produção desses componentes.

Apesar da matriz hepática constituir somente uma porção mínima de aproximadamente 0,5% de peso do fígado normal em humanos⁶⁶, ela tem uma grande variação zonal⁵⁸; assim, como em outros órgãos os colágenos são os constituintes mais abundantes da matriz⁵⁸. O espaço de Disse contém uma matriz intersticial e componentes de membrana basal de baixa densidade composta de colágenos fibrilares tipos I, III e V, colágeno microfibrilar tipo VI, colágenos de membrana basal tipos IV e XVIII e traços de

colágenos FACIT XIV e da pequena proteoglicana decorina, fibronectina, tenascina-C, laminina, nidogen, proteoglicana sulfato de heparina e outros. Esta matriz de baixa densidade é crítica para manter as funções diferenciadas das células residentes; MEC mais densa é confinada principalmente aos espaços porta, veia central e cápsula hepática⁵⁷. Os colágenos tipo I, III, IV, V e VI estão presentes na cápsula hepática e nos espaços porta⁵⁸ e fibras e feixes de colágeno tipo I que partem dos espaços-porta continuam-se para o centro do lóbulo formando o arcabouço estrutural do lóbulo hepático⁷⁰.

Acima de 40% da superfície dos sinusóides hepáticos é ocupada por fenestração endotelial que, junto com as junções gap das células endoteliais, e a falta⁵⁸ ou uma baixa densidade⁷² desta membrana basal dão a estes sinusóides a propriedade de trocas bidirecionais de macromoléculas entre o plasma e os hepatócitos^{72:58}. Demonstrou-se que a presença de membrana basal sob células nos sinusóides hepáticos descrita em ruminantes era decorrente de artefato de fixação inadequada, confirmando que a sua ausência aplica-se a todos os mamíferos⁵⁵. Circundando as veias centrais há uma delicada membrana basal contendo laminina, colágeno IV e perlecano e fora da MB há fibras de colágeno tipos I, III, V e VI e fibronectina ^{apud}58.

Outros componentes da MEC hepática como as fibras elásticas, têm sido descritas na cápsula e nas paredes das veias e artérias nos tratos portais⁷³. Miofibroblastos peribiliares e fibroblastos portais em fetos são os mais importantes candidatos a produção destas fibras em fetos humanos⁷⁴.

Fibrose hepática é um processo complexo que envolve deposição acentuada de componentes da matriz, com ativação de células capazes de produzi-la, além de liberação de citocinas e remodelamento tecidual¹.

Mudanças qualitativas e quantitativas significativas ocorrem na matriz de um fígado fibrótico, predominantemente nos compartimentos periportais e perisinusoidais, podendo haver aumento acima de 10 vezes no total dos seus componentes ^{apud}57. Nesse processo o primeiro componente descrito nos sinusóides é a fibronectina, seguido por colágeno F^5 , e a matriz perisinusoidal de baixa densidade é transformada numa matriz de alta densidade caracterizada por acúmulos de feixes de fibrilas de colágeno e de membrana basal, processo denominado capilarização de sinusóides. Este processo é acompanhado por perda de microvilos dos hepatócitos e desaparecimento da fenestração endotelial; estas alterações comprometem a função dos hepatócitos e leva a ativação de células dos sinusóides responsáveis pela produção destes componentes da matriz⁵⁷. O colágeno no fígado humano normal que representa cerca de 4% do total de proteínas pode aumentar para 10%, com

predomínio do tipo I, em doenças como cirrose alcoólica⁶⁷ ou por hemocromatose, Doença de Wilson e pós hepatite viral⁶⁶. No fígado normal de rato o colágeno que representa apenas 0,55 % de proteína total ^{apud}⁷⁰ aumenta para 2% na cirrose induzida por CCl₄, por exemplo, sendo 60% do tipo I e 40% tipo III⁵⁴.

Diferentemente do que ocorre no processo de regeneração hepática, na fibrose e cirrose, as alterações na matriz são acompanhadas por necrose de hepatócitos e a reação inflamatória⁵⁵.

Na maioria dos estudos do papel da matriz na regeneração têm sido conduzidos após hepatectomia parcial em ratos. A laminina é o primeiro componente verificado em células de Ito 4 dias pós-hepatectomia, mas sem formar membrana basal, coincidindo com proliferação de células endoteliais separando as placas de hepatócitos e formando os espaços vasculares; em cerca de 10 dias a laminina torna-se rara e componentes como FN, tenascina e colágenos tipos I, III, IV, V e V são sintetizados e delimitam o espaço de Disse^{56;55}. Diferente da fibrose os componentes de MB que não estão presentes na regeneração são cadeias α 1 de laminina e entactina, que poderiam ser essenciais para organizar esta membrana⁵⁵.

Os hepatócitos têm centenas de funções e são alvos de distúrbios metabólicos, imunológicos, agentes tóxicos e infecciosos que afetam o fígado. Estes hepatócitos alterados podem produzir e liberar radicais livres, produtos de peroxidação lipídica, proteases, citocinas e fatores de crescimento que vão alterar as células sinusoidais que estão quiescentes⁷⁵. Via ativação de receptores da matriz e devido ao seu papel como armazenador de mediadores bioativos, a própria matriz desempenha um papel importante no controle da sua síntese e degradação pelas células sinusoidais residentes⁵⁷. As metaloproteinases (MMPs), são a principal família de enzimas envolvidas na degradação patológica e fisiológica de componentes da matriz extracelular. Na maioria dos tecidos normais há um turnover lento e remodelação constante da matriz, com um equilíbrio entre as taxas de síntese e de degradação da matriz, mantendo a quantidade e qualidade da matriz. A regulação da atividade de degradação das MMPs é realizada por uma família de moléculas denominadas inibidores das metaloproteinases (TIMPs). Em situações em que ocorre fibrose hepática as MMPs e as TIMPs são produzidas por células sinusoidais residentes ativadas e atuam para evitar degradação excessiva de matriz e danos teciduais^{76;77}.

1.4.2 - As células dos sinusóides hepáticos

A primeira referência a células sinusoidais hepáticas na literatura científica foi provavelmente a de Wedl que em 1854 descreveu células do tecido conectivo contendo pigmento no fígado de pacientes com Malária. Hoffmann e Von Recklinghausen depois reconheceram uma população de células não parenquimatosas com capacidade de fagocitose através da administração intravenosa de corantes ^{apud78}. Kupffer, em 1876, descreveu uma população de células sinusoidais estreladas usando um método histoquímico com cloreto de ouro e sugeriu que elas eram também células fagocitárias. Setenta e cinco anos após, Ito observou células perisinusoidais contendo lipídios em fígados humanos. Em 1971, Wake demonstrou que ambas as células, observadas por Kupffer e por Ito, eram idênticas e que eram locais importantes de armazenamento de vitamina A ^{apud79}, hoje denominadas de células hepáticas estreladas. Os macrófagos residentes dos sinusóides hepáticos são agora denominados de células de Kupffer ^{apud78}, apesar do equívoco inicial. A noção de que os sinusóides hepáticos eram revestidos por um único tipo de célula persistiu nos livros-textos de histologia até 1960. Com o advento da microscopia eletrônica associado a histoquímica e injeção intravenosa de substâncias particuladas em ratos houve um avanço no conhecimento das células sinusoidais, reconhecendo-se se quatro tipos de células sinusoidais: células de Kupfer (CK), células hepáticas estreladas (CHEs) ou células de Ito, células endoteliais sinusoidais (CES) e linfócitos associados ao fígado (LAF), cada uma delas com funções específicas ^{78;80}.

Tem sido verificado que os hepatócitos, células endoteliais sinusoidais e dos EPs e CHEs são capazes de sintetizar e secretar componentes da MEC hepática ^{86;69;79;55}. Células epiteliais dos ductos, em menor grau, parecem também ser responsáveis pela síntese e secreção dos próprios componentes da sua membrana basal ⁵⁸. Hepatócitos normais em humanos são capazes de produzir colágeno tipo I e fibronectina e em processos crônicos com fibrose hepática eles sintetizam também os colágenos III e IV. Estas observações sugerem que os hepatócitos podem produzir componentes da MEC *in vivo* em quantidades que dependem do seu estado funcional ⁶³. Dentre as células sinusoidais as CHEs são consideradas as principais produtoras de matriz hepática ^{81;75}, sendo capazes de produzir colágenos tipos I, III, IV ^{78;63;69}, fibronectina ^{78;63}, colágenos tipos V e VI e outras glicoproteínas estruturais como laminina e tenascina e várias proteoglicanas ^{apud78}.

As CHEs são descritas na literatura com uma nomenclatura variada, incluindo células de Ito, células armazenadoras de gordura, lipócitos e células perisinusoidais. São

células estreladas com núcleo comprimido e chanfrado por vesículas lipídicas do citoplasma e com nucléolos ocasionais⁷⁸, representando entre 5-8% das células do fígado normal; no homem há cerca de 10 células para cada 100 hepatócitos e no rato 13 para cada 100 hepatócitos ^{apud}⁷⁹. Na realidade elas representam uma população heterogênea de células residentes que variam quanto ao fenótipo do filamento do citoesqueleto, conteúdo de retinóide e estado de ativação⁴.

Estas células desempenham papel importante no metabolismo e armazenamento de ácido retinóico^{80;apud}⁷⁸, na manutenção da arquitetura normal do fígado por sintetizar os principais componentes da matriz e auxiliam na manutenção do fluxo sanguíneo dos sinusóides, que é controlado pela contração ou relaxamento destas células, através de suas projeções citoplasmáticas que repousam sobre células endoteliais sinusoidais ao lado do espaço de Disse^{75;82}. A contração ou relaxamento é principalmente induzida por dois fatores: citocinas como endotelina-I e óxido nítrico e neuropeptídeos como substâncias P e VIP de nervos terminais⁸².

As CHEs quiescentes são ativadas e transformam-se em células similares a miofibroblastos⁸¹ havendo alguns autores que consideram estas duas populações como células diferentes^{apud}⁵⁷. Ativação de células estreladas refere-se a transição de células quiescentes ricas em vitamina A de baixo potencial proliferativo a células com alta capacidade proliferativa, fibrogênicas e contráteis, com reduzido conteúdo de vitamina A. Estímulos parácrinos como fatores de crescimento e substâncias oxidantes derivadas de hepatócitos lesados, células epiteliais dos ductos, células endoteliais, células de Kupffer ou outras células inflamatórias iniciam ativação destas células. Os fatores de ativação de CHEs podem também ser atribuídos a citocinas autócrinas, incluindo TGF β 1, PDGF, FGF, HGF, PAF e endotelina-1 (ET-1)^{4,apud}⁵⁷. A ativação destas células é acompanhada por aumento da expressão da proteína α -actina de músculo liso no seu citoesqueleto o que está diretamente envolvida na contratilidade. Estas células podem também amplificar a resposta inflamatória através da liberação de substâncias quimiotáticas para neutrófilos e monócitos em fígados lesados; por outro lado elas também produzem citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10⁴. Adicionalmente elas sintetizam também metaloproteinases e seus inibidores para manter em equilíbrio a síntese e degradação de matriz⁷⁶.

Na resolução das lesões uma grande parte destas células ativadas entra em apoptose, o que pode ocorrer também durante a ativação^{81;4}. Se estas células ativadas poderiam regredir a seu estado de quiescência retomando as suas funções principais anteriores é uma questão ainda sem resposta definida⁴.

As CK são macrófagos hepáticos que residem no lúmen dos sinusóides, sob ou entre as células endoteliais, têm extensões citoplasmáticas no espaço de Disse e mantêm contato direto com CHEs e hepatócitos. Morfologicamente são distintas de outros macrófagos, por terem um padrão característico de coloração de peroxidase endógena do RER e do envelope nuclear⁸³. Elas possuem núcleo reniforme e citoplasma abundante com prolongamentos em forma de estrela⁷⁸; elas são originadas em parte do recrutamento de monócitos circulantes e a outra parte da proliferação de populações endógenas de macrófagos^{78;84}. As CK estão presentes nas áreas periportais, mediozonais e centrolobulares numa proporção de 4:3:2, respectivamente⁸⁰.

Possuem capacidade de fagocitose, apresentação de antígenos e secreção de substâncias ativas como fatores de crescimento⁷⁸ e metaloproteinases⁷⁷.

O aumento de células de Kupffer coincide com o aparecimento de marcadores de ativação das CHEs, como aumento da síntese da matriz, proliferação celular e liberação de retinóide^{4;85}. Lesões hepatocelulares de etiologias diversas podem ativar células de Kupffer que aumentam a sua atividade fagocítica e passam a produzir TNF, interferon $\alpha 1$ e $\beta 1$, IL-1, IL-6, prostaglandinas 2, D2 e F2, tromboxana B2A, leucotrienos, superóxido, proteases, óxido nítrico, TGF e muitos outros compostos pró-inflamatórios^{apud75}. Isto pode resultar em ativação de células T citotóxicas, aumento de resposta inflamatória e estimulação de fibrose⁷⁵ através da ativação e proliferação de CHEs^{apud84}. Em ratos intoxicados com CCl4 o número destas células aumenta significativamente no dia 2, seguido por um aumento significativo de células perisinusoidais quando a fibrose começa a se desenvolver⁸⁵.

As células endoteliais sinusoidais (CES) de fígado normal revestem os sinusóides separando a sua luz do espaço de Disse e possuem corpo celular delgado com processos citoplasmáticos delicado e fenestrações que podem ser penetradas pelas microvilosidades dos hepatócitos⁷⁸; estas aberturas permitem o acesso de moléculas circulantes para os hepatócitos. Elas podem eliminar compostos solúveis, fagocitar pequenas partículas, sintetizar fatores de crescimento, endotelina e componentes da matriz⁷⁵ e participam também da regulação do metabolismo de lipoproteínas⁸⁰.

Quando elas são lesadas produzem fibronectina que participa na conversão de TGF β 1, através da ativação da plasmina, da forma latente para a pró-fibrogênica, que é um estímulo para ativação de CHEs. Expressão autócrina deste fator de crescimento é a principal fonte e estímulo fibrogênico destas células⁴. As CES de fígados de ratos e humanos normais e com fibrose são capazes de sintetizar colágenos dos tipos I, III e IV^{63;54}; em ratos com cirrose por CCl4 sintetizam laminina⁵⁴ e em fígados normais e com

fibrose em humanos sintetizam fibronectina⁶³. Em contraste com as CK e CHEs, existem poucos estudos sobre a cinética destas células, mas há vários estudos descrevendo alterações fenotípicas que ocorrem em resposta a injúrias⁷⁸. Em hepatites agudas, há um aumento da expressão da molécula de adesão intracelular, ICAM-1, e a interação entre este receptor e moléculas LFA-1 dos linfócitos promove recrutamento de células inflamatórias do compartimento intravascular para o espaço de Disse^{apud 78, apud 75}. Em algumas doenças crônicas que evoluem, com fibrose verifica-se, mudança do fenótipo destas células, com perda de suas características, especialmente quanto às fenestracões e à membrana basal descontínua, interferindo com as funções exercidas normalmente⁵⁷.

Os linfócitos associados ao fígado (LAF) também são componentes das células sinusoidais hepáticas que foram chamados inicialmente de “pit cell” por Wisse et al em 1976⁷⁸. Morfologicamente, são linfócitos granulares grandes que podem ser obtidos pela separação de populações de células mononucleares no fígado pela técnica do gradiente descontínuo de densidade com Percol. Esses linfócitos puros são difíceis de se obter, e a sua porcentagem obtida de frações de baixa densidade de células mononucleares de fígado de rato nunca excederam 50 a 70% devido a presença de linfócitos agranulares que não podem ser eliminados desta fração. Portanto é preferível usar o termo LAF que compreende a população de linfócitos granulares e agranulares⁸⁶.

Em menor número estão presentes os linfócitos B e $T\gamma^{\delta}$ e a maior parte está dividida numa população alternativa, composta de células T com receptores $\alpha\beta$ intermediários e células que expressam marcadores natural killer (NK)1.1 e uma população principal de linfócitos $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$ e um grande número de células $CD4^{-}CD8^{-}$ (duplo negativo – DN). A população alternativa de LAF compreende metade dos linfócitos do fígado e suas funções não são características de nenhum tipo de células T convencionais, incluindo elementos de citotoxicidade e de células B-auxiliares⁸⁷.

Linfócitos recrutados do sangue para os sinusóides hepáticos e a população pré-existente parecem sofrer estimulação induzindo à proliferação local⁸⁶; estas células aumentam em resposta a IL-12 e TNF- α e há evidências de que a sua maturação funcional depende das células de Kupffer⁸⁷. Essas células participam na defesa imunológica do fígado com função de células natural killer (NK)^{78;80} e há evidências consideráveis que suportam a hipótese de que estas células desempenham papel importante na defesa contra tumores^{88;86}. Em cirrose induzida por intoxicação com CCl₄ em ratos e lesões pre-neoplásicas observou-se aumento de células CD5, CD8 e CD18 positivas e aumento da

atividade citotóxica, confirmando que os LAFs são influenciados fenotipicamente e funcionalmente durante estadios iniciais da hepatocarcinogênese⁸⁸.

2. OBJETIVOS

- Estabelecer um modelo de intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* em bovinos e estudar o início e a progressão das lesões em 5 momentos.
- Verificar se nesta espécie as lesões progridem mesmo após a parada da administração da planta.
- Realizar um estudo semi-quantitativo e quantitativo por Microscopia Óptica, Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Imuno-histoquímica de alguns componentes da MEC hepática e das células sinusoidais hepáticas antes, durante e após a indução da lesão.
- Padronizar a distribuição de alguns componentes da MEC hepática na patologia da fibrose hepática em bovinos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram usados 5 bovinos, fêmeas, sem raça definida (SRD), com idade média de 8 meses ao início do experimento e peso médio de 140 kg, numerados de 1 a 5 ao acaso. Como parâmetros para a inclusão no experimento foram atendidos os seguintes requisitos: animais clinicamente sadios avaliados por exame físico, hemograma e com biópsia hepática normal, além de valores de enzimas hepáticas enquadrados nas principais tabelas de valores normais^{89;90}. Os bovinos foram mantidos na Fazenda Edigardia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, em uma baía coberta e cercada com comedouro coletivo de cimento e água a vontade. Tiveram um período de adaptação de 15 dias, durante o qual receberam vermífugo (Ivermectina 0,5 ml/100 kg). A alimentação usada durante o experimento foi a ração produzida na fábrica de ração da Fazenda Experimental Lageado da UNESP de Botucatu, feno de capim Tifto e capim Napier.

No decorrer do período experimental foram realizadas pesagens semanais dos animais para adequar a dose da planta às alterações de peso, além de controle de parasitas por exames parasitológicos de fezes realizados no Laboratório de Diagnóstico / Enfermidades Parasitárias da FMVZ - UNESP de Botucatu.

A avaliação clínica era diária durante todo o período experimental. Os principais parâmetros observados foram: alterações de apetite, alterações na consistência das fezes e dificuldade de defecação.

3.2. Planta

A planta *Senecio brasiliensis* foi colhida nos meses de Outubro e Novembro no município de Palotina, Oeste do Paraná, e identificada pelo Dr. Nelson Ivo Matzenbacher da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As folhas foram dessecadas à sombra. A dose da planta via oral foi de 0,38 g/kg de peso corporal vivo diariamente durante 24 dias. Esta dose e período de administração foram baseados em resultados obtidos de experimentos piloto.

3.3. Colheita de Material

O experimento foi dividido em 5 momentos diferentes para cada animal; antes da primeira administração da planta e a cada 15 dias até o 60^o dia : M₁= controle; M₂= 15 dias; M₃ = 30 dias; M₄= 45 dias e M₅ = 60 dias. Cada animal foi submetido a biópsias hepáticas e colheitas de sangue para exames bioquímicos da função hepática em cada momento. Ao final dos 60 dias foi realizada a eutanásia dos animais sob anestesia por Thiopental sódico a 5%, na dose de 5mg /Kg seguido por eletrochoque, no Serviço de Patologia da FMVZ da UNESP de Botucatu.

A biópsia foi realizada no penúltimo espaço intercostal, direito a aproximadamente 15cm da linha média do dorso, sob anestesia local infiltrativa nos planos subcutâneo e intramuscular com Lidocaína a 2% sem vasoconstrictor; a agulha usada para a biópsia foi confeccionada em metal, no Setor de Marcenaria da FMVZ da UNESP de Botucatu, medindo 3mm de diâmetro por 11 cm de comprimento, com mandril⁹¹. Para auxiliar a orientação da agulha para biópsia foi usado um aparelho de Ultrasonografia modelo Scanner 450 (Pie Medical), com transdutor retal de 5MHz, do Setor de Reprodução Animal da FMVZ da UNESP de Botucatu. As amostras de fígado obtidas tinham entre 2,5 e 3,5 cm de comprimento por 3 mm de diâmetro. O tecido era imediatamente lavado com solução fisiológica e um fragmento fixado em formaldeído tamponado a 10%, para análise histológica; outro foi fixado em Glutaraldeído a 2,5 % para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e o terceiro fragmento foi acondicionado em envelope de papel alumínio contendo Jung Tissue Freezing Medium (Leica) e congelado imediatamente em nitrogênio líquido e mantido em freezer a -70 °C para Imuno-histoquímica, até o momento do seu processamento.

O sangue foi colhido da veia jugular em tubo Vacutainer SST de 9,5ml siliconizado e centrifugado para separação do soro para realização de exames bioquímicos. Os exames bioquímicos foram processados no Laboratório Clínico da FMVZ da UNESP de Botucatu.

3.4. Microscopia Óptica

3.4.1. Histologia

O material colhido para análise histológica foi processado pela técnica habitual, no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), UNESP. Os cortes histológicos foram corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômico de Masson, Prata Metanamina para Retículo e Perls e foram submetidos a uma análise semi-quantitativa, com graduação das lesões em graus variando de 0 a 4 (0= ausente; 1= mínima; 2= discreta; 3= moderada; 4= intensa).

Baseados em achados dos experimentos piloto realizados foram definidos os parâmetros a serem graduados na análise semi-quantitativa nos cortes histológicos que são:

- a) Alterações hepatocelulares de necrose, esteatose macro e microgoticular, inclusões hialinas intracitoplasmáticas e transformação megalocítica
- b) Fibrose de espaços-porta, veias centrolobulares e pericelulares
- c) Infiltrado inflamatório portal e lobular
- d) Hiperplasia sinusoidal
- e) Hiperplasia de células ovais
- f) Hiperplasia ductal

Foi feita uma avaliação quantitativa de apoptose em 20 campos com aumento de 400x nos 5 momentos do experimento. Hepatócitos foram considerados apoptóticos quando exibiam as seguintes características morfológicas^{92;93} citadas na literatura:

- Retração do volume celular
- Eosinofilia citoplasmática
- Condensação e fragmentação da cromatina nuclear

3.4.2. Morfometria

As quantificações de fibras elásticas na coloração de Resorcina Fucsina de Weigert com oxidação prévia⁹⁴ e de colágeno total pela coloração de Picrossírius⁹⁵ foram feitas pela análise de imagem utilizando o *software KS-300^R* (Carl Zeiss Vision Inc.).

Cada lâmina foi vista em Microscópio Óptico *Nikon Microphot-FXA* acoplado ao equipamento de análise de imagem (microcomputador compatível com padrão IBM-PC). A análise foi realizada em campos visualizados ao microscópio com área total de 109.495 μm^2 em aumento de 200X. Foram analisados 10 campos de cada lâmina para fibras elásticas e 20 campos para colágeno total. Após a captura da imagem, eram geradas “máscaras”, através da ferramenta *Threshold RGB* que auxiliam o *software* a executar a análise considerando apenas a marcação dos elementos desejados nas imagens. Esta

seleção dos componentes era auxiliada manualmente e os totais de áreas ocupadas pelos mesmos eram medidas automaticamente, os valores eram listados, colados e totalizados em planilhas de cálculo do *software Excel*.

3.4.3. Imuno-Histoquímica

Amostras de tecidos congelados em nitrogênio líquido foram cortadas em criostato (Leica CM3050), na espessura de 5µm e submetidos a técnica Imuno-histoquímica nos Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia da FMB e no Laboratório de Morfologia do Instituto de Biociências (IB) da UNESP de Botucatu. Os cortes foram fixados com Paraformaldeído a 2% e tratados com Hialuronidase (Sigma) a 0,2% em PBS com 3% de BSA (Sigma).

A marcação para **colágeno tipo I** foi feita pelo método Avidina-Biotina Peroxidase⁹⁶ com anticorpo primário monoclonal *Rabbit anti bovine collagen type I* (BIODESIGN) na diluição de 1:40 e *Kit Elite ABC Peroxidase Vectastin # PK6100 Standard* com anticorpo secundário (Vector Laboratories, Burlingame, CA) na diluição de 1:100.

A marcação para **colágeno tipo III** foi feita por Imunofluorescência Indireta (IFI) com anticorpo primário monoclonal *Rabbit anti bovine collagen type III* (BIODESIGN) na diluição de 1:20, e anticorpo secundário *Goat anti-rabbit IgG* para colágenos I, II e III (SANTA CRUZ) na diluição de 1:100.

As avaliações dos colágenos I e III foram semi-quantitativas com graus variando de 1 a 4 cruzes (1= mínima, 2= discreta, 3= moderada, 4= intensa). A técnica de IFI usada foi a sugerida pelo fabricante dos anticorpos primários (BIODESIGN).

TÉCNICA DE IFI:

1. Fixar os cortes em congelação com paraformaldeído a 2% por 30 minutos em temperatura ambiente.
2. Lavar com PBS, rapidamente uma vez e por 15 minutos a seguir
3. Tratar com Hialuronidase diluída a 0,2% em PBS com 3% de BSA e incubar por 30 minutos a 37 °C em estufa. (tratamento enzimático)
4. Lavar com PBS rapidamente uma vez e por 15 minutos a seguir
5. Aplicar o Anticorpo. Primário e soro controle (na lâmina com diluente usada para controle) diluído em PBS contendo 3% de BSA

6. Incubar anticorpo primário *overnight* em temperatura ambiente
7. Pela manhã lavar com PBS 1 vez por 5 minutos e 2 vezes por 10 minutos
8. Incubar com Anticorpo. Secundário diluído em solução. 1,5% de soro normal de cabra, na diluição de 1: 100 para os colágenos I e III e em solução de 1,5% de soro normal de bovino (1:100) para o colágeno IV e incubar por 30 minutos.
9. Lavar com PBS por 5 minutos, mais uma vez por 10 minutos e outra por 10 minutos com 3 gotas de Azul de Evans.
10. Montar com Glicerina tamponada.

Foram feitas algumas modificações na Técnica de Avidina-Biotina Peroxidase acrescentando-se os quatro primeiros passos da técnica de IFI descritos acima; acrescentou-se ainda, bloqueio de peroxidase endógena com metanol ao invés de PBS por se tratar de corte de congelação.

3.4.4. MET

Os fragmentos das biópsias hepáticas fixados em Glutaraldeído a 2,5%, foram pós fixados em Tetróxido de Ósmio a 1% e a seguir processados pela técnica de rotina do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Patologia da FMB. Cada amostra da biópsia foi dividida e incluída em 6 blocos de resina, obtendo-se, cortes semi-finos (1 μ m) em ultramicrotomo Reichert-Jung / Supernova, corados com azul de metileno / azur II. De cada amostra foram selecionados 2 blocos para cortes ultrafinos onde predominava o lóbulo hepático, evitando-se espaços-porta. Os cortes ultrafinos (70nm) foram contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo a 0,2%. Para avaliação dos espécimes e obtenção de fotomicrografias foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss LEO900, operado a 80kV. A contagem de células sinusoidais foi feita através do programa KS100 em computador com Camera CCD , modelo XC-77 (Sonya) acoplado ao MET, analisando 20 campos nos dois cortes com aumento de 1100 vezes. As imagens foram salvas e as contagens feitas manualmente através da identificação morfológica dos 4 tipos de células sinusoidais: CHEs, CK, CE e LAF, além dos hepatócitos.

3.4.5. Análise estatística dos dados

Os dados obtidos para as variáveis de parâmetros bioquímicos, análise morfométrica pelas colorações de Picrossírius e Resorcina Fucsina de Weigert e contagem de células sinusoidais foram avaliados pela prova paramétrica de Análise de Variância de Medidas Repetidas para variáveis com distribuição normal.

Para os parâmetros que não passaram nos testes de normalidade utilizou-se Teste de Friedman para Medidas Repetidas. As comparações múltiplas para verificar diferenças entre estas variáveis foram feitas pelo método Student-Newman-Keuls (SNK).

Para análise de correlação entre as variáveis fibras elásticas, colágeno e células sinusoidais totais empregou-se o teste de Correlação de Spearman. Para análise de correlação entre número de células sinusoidais totais e hepatócitos foi usado o teste de correlação de Pearson. Todos os testes estatísticos foram realizados pelo programa SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation) com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação Clínica e Achados de Necropsia

Todos os animais permaneceram clinicamente normais até a terceira semana do experimento quando alguns deles começaram a apresentar anorexia e tenesmo com fezes ressecadas e endurecidas; algumas vezes foi necessária a retirada manual das fezes do reto de alguns animais. Assim a administração da planta foi interrompida no 24^o dia. Aos 45 dias o bovino número 3 parou de se alimentar, ficou em decúbito lateral e morreu. Ao final de 60 dias os 4 animais remanescentes foram submetidos a eutanásia, necropsia e colheita de material no Serviço de Patologia da FMVZ da UNESP de Botucatu. A necropsia todos os animais apresentavam edema do trato gastrointestinal e de subcutâneo e derrames cavitários.

O fígado apresentava coloração castanho-amarelada, com consistência endurecida, diminuição de tamanho e aos cortes demonstrava aspecto difusamente septado por traves esbranquiçadas de fibrose.

4.2. Exames Bioquímicos de Função Hepática

Os resultados dos exames bioquímicos nos 5 momentos estão demonstrados nas tabelas 1 e 2, onde se observa que, apenas FA e GGT tiveram aumentos estatisticamente significativos; entretanto não houve aumento significativo de bilirrubinas. A FA e GGT aumentaram significativamente no M₄ em relação aos valores nos M₁ e M₂. Outros parâmetros que se modificaram significativamente foram as proteínas totais a partir de M₃ e de forma irregular a albumina a partir de M₂.

Tabela 1 – Médias e Desvios Padrões dos parâmetros bioquímicos nos 5 momentos avaliados

Momento	AST	FA	Proteínas totais	Albumina	Globulina	Bilirrubina direta
M ₁	51.7 ^a ± 31.6	374.5 ^a ± 129.1	7.76 ^a ± 0.594	3.42 ^a ± 0.356	4.34 ± 0.594*	0.1000 ^a ± 0.00
M ₂	107.6 ^a ± 86.8	621.3 ^a ± 294.7	6.15 ^a ± 0.651	3.00 ^{bc} ± 0.197	3.16 ± 0.799	0.1060 ^a ± 0.06
M ₃	101.2 ^a ± 65.2	811.3 ^{ab} ± 485.6	6.00 ^b ± 0.890	2.79 ^c ± 0.394	3.20 ± 0.592	0.3400 ^a ± 0.54
M ₄	52.5 ^a ± 23.0	1539.9 ^b ± 972.4	5.49 ^b ± 0.347	2.09 ^d ± 0.154	3.40 ± 0.374	0.8560 ^a ± 0.78
M ₅	66.0 ^a ± 20.3	1219.8 ^{ab} ± 585.7	6.13 ^b ± 0.763	2.05 ^c ± 0.351	4.08 ± 0.991	0.3800 ^a ± 0.41
Estatística						
F	1.07	4.93	7.92	35.2	3.53	2.22
P	0,404	0.00969	0.00122	0.000000185	0.0321	0.116

Obs: médias seguidas de letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo teste SNK ($p > 0,05$). * As médias diferem, mas o método de comparações múltiplas não detectou essa diferença.

Tabela 2 – Medianas dos parâmetros bioquímicos nos 5 momentos avaliados

Momento	GGT	Bilirrubina total	Bilirrubina indireta
M ₁	10.30 ^a	0,500 ^a	0,4000 ^a
M ₂	8.30 ^a	0.200 ^a	0.1000 ^a
M ₃	51.90 ^{ab}	0.250 ^a	0.1000 ^a
M ₄	98.50 ^b	1.200 ^a	0.6700 ^a
M ₅	57.50 ^{ab}	1.020 ^a	0.9300 ^a

Obs: medianas seguidas de letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo teste SNK ($p > 0,05$).

4.3. Microscopia Óptica

4.3. 1. Avaliação Semi-Quantitativa e Quantificação de Apoptose

A avaliação quantitativa de hepatócitos em apoptose em 20 campos está demonstrada na tabela abaixo:

Tabela 3 – Quantificação de apoptose em 20 campos nos diferentes momentos da lesão

Momento	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5
M ₁	0	0	0	0	0
M ₂	1	1	0	2	2
M ₃	5	10	6	14	7
M ₄	1	3	2	4	4
M ₅	4	1	-----*	1	

* Morte aos 45 dias

Os cortes histológicos corados pelas técnicas de HE, Tricrômico de Masson, Prata Metanamina para Retículo e Perls foram submetidas a uma análise semi-quantitativa, cujos resultados estão apresentados na Tabela 4 .

Tabela 3 – Avaliação semi-quantitativa das lesões por Microscopia Óptica com graduação de 0 a 4 para a intensidade das lesões

Animal	M	Hepatócitos					Fibrose			Inflamação		↑células sinusoidais	↑células ovais	Hiperplasia ductal
		Necrose	Esteatose macrogoticular	Esteatose microgoticular	Inclusão hialina	Megalocitose	P	VC	Peri	portal	lobular			
1	M ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
2	M ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
3	M ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
4	M ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	M ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
1	M ₂	1	0	0	0	1	2	1	1	0	0	1	1	1
2	M ₂	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
3	M ₂	0	0	1	0	0	1	2	1	1	1	0	1	0
4	M ₂	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
5	M ₂	1	0	1	1	0	2	1	1	0	0	0	1	0
1	M ₃	3	2	1	2	3	3	2	1	3	2	3	3	3
2	M ₃	2	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1
3	M ₃	3	1	2	1	2	3	3	2	1	2	2	2	1
4	M ₃	3	1	1	1	2	1	1	1	1	2	3	2	2
5	M ₃	2	1	2	2	2	2	3	1	2	1	2	2	2
1	M ₄	2	2	1	1	3	4	3	2	1	2	2	2	2
2	M ₄	2	2	1	1	3	2	3	2	1	2	3	2	2
3*	M ₄	3	3	3	1	2	3	3	3	1	1	2	1	1
4	M ₄	3	3	3	1	4	2	2	1	1	2	3	3	3
5	M ₄	2	3	2	1	4	2	3	3	1	1	4	2	2
1	M ₅	2	1	2	1	3	4	4	3	1	2	4	2	3
2	M ₅	2	1	1	0	4	4	3	3	1	2	3	2	2
4	M ₅	2	1	1	1	4	2	2	1	1	2	3	2	2
5	M ₅	1	1	1	1	4	4	4	4	1	1	4	2	2

* Morte em M₄

M = momento, P= portal, VC= veia centrolobular, Peri= pericelular,

A tabela acima pertence a página 28

Todos os parâmetros graduados no M_1 foram considerados normais (Figura 2A) e pontos de referência para os demais momentos. Cada tipo de alteração hepatocelular foi analisada separadamente.

Houve um pico de apoptose (Figura 2C) em M_3 em relação a M_1 e em M_4 e M_5 esses valores diminuíram com resultados intermediários entre M_2 e M_3 .

A necrose foi sempre de células isoladas (Figura 2C), observada em grau 1 em dois animais do M_2 ; nos demais momentos todos demonstraram necrose que variou de graus 2 a 3, sem caráter progressivo. A esteatose (Figura 2B e 2C) microgoticular já foi observada em M_2 em grau 1; em M_3 a esteatose macrogoticular e microgoticular foram observadas em graus 1 e 2, em M_4 a esteatose macrogoticular foi de grau 3 em 3 animais e foi observada regressão em M_5 (grau 1). A presença de inclusões hialinas intracitoplasmáticas (Figura 2D) foram observadas em um animal em M_2 e em quase todos os animais nos demais momentos, variando de graus 1 a 2. A megalocitose (Figuras 2B e 2C) foi observada em apenas 1 animal de grau 1 no M_2 ; nos demais momentos todos os animais demonstraram graus que variaram de 2 a 4.

A fibrose foi uma lesão constante em todos os animais, em quase todos os momentos a partir de M_2 . A fibrose portal (Figuras 3A e 3B) foi graduada em 1 e 2 em M_2 , 1, 2 e 3 em M_3 , 2 e 3 em M_4 e 2 e 4 em M_5 . A fibrose centrolobular (Figura 3C) foi graduada em 1 e 2 em M_2 , 1, 2 e 3 em M_3 , 2 e 3 em M_4 e 2, 3 e 4 em M_5 ; nos animais que apresentavam graus 3 e 4 em M_4 e M_5 havia lesões veno-oclusivas. A fibrose pericelular (Figura 3B e 3C) foi graduada em 0 e 1 em M_2 , 1 e 2 em M_3 , 1, 2 e 3 em M_4 e 1, 3 e 4 em M_5 .

O infiltrado inflamatório portal e intralobular foi pouco significativo, havendo graduação de 0 a 1 em M_1 e M_2 e graduações de 1 a 2 nos demais momentos, com exceção de grau 3 para infiltrado portal em apenas 1 animal em M_3 .

A celularidade sinusoidal (Figuras 2B e 2C) aumentou a partir do M_3 graduada em 2, 3 e 4. As células ovais (Figura 3A) surgiram em três animais em grau 1 no M_2 ; nos demais momentos elas estavam presentes em graus 1 e 2. A hiperplasia ductal (Figura 3A) foi observada em todos os animais em graus 1 a 2 a partir de M_3 .

Através da coloração de Perls não foi observada deposição significativa de hemossiderina nas células de Kupffer ou nos hepatócitos nos 5 momentos.

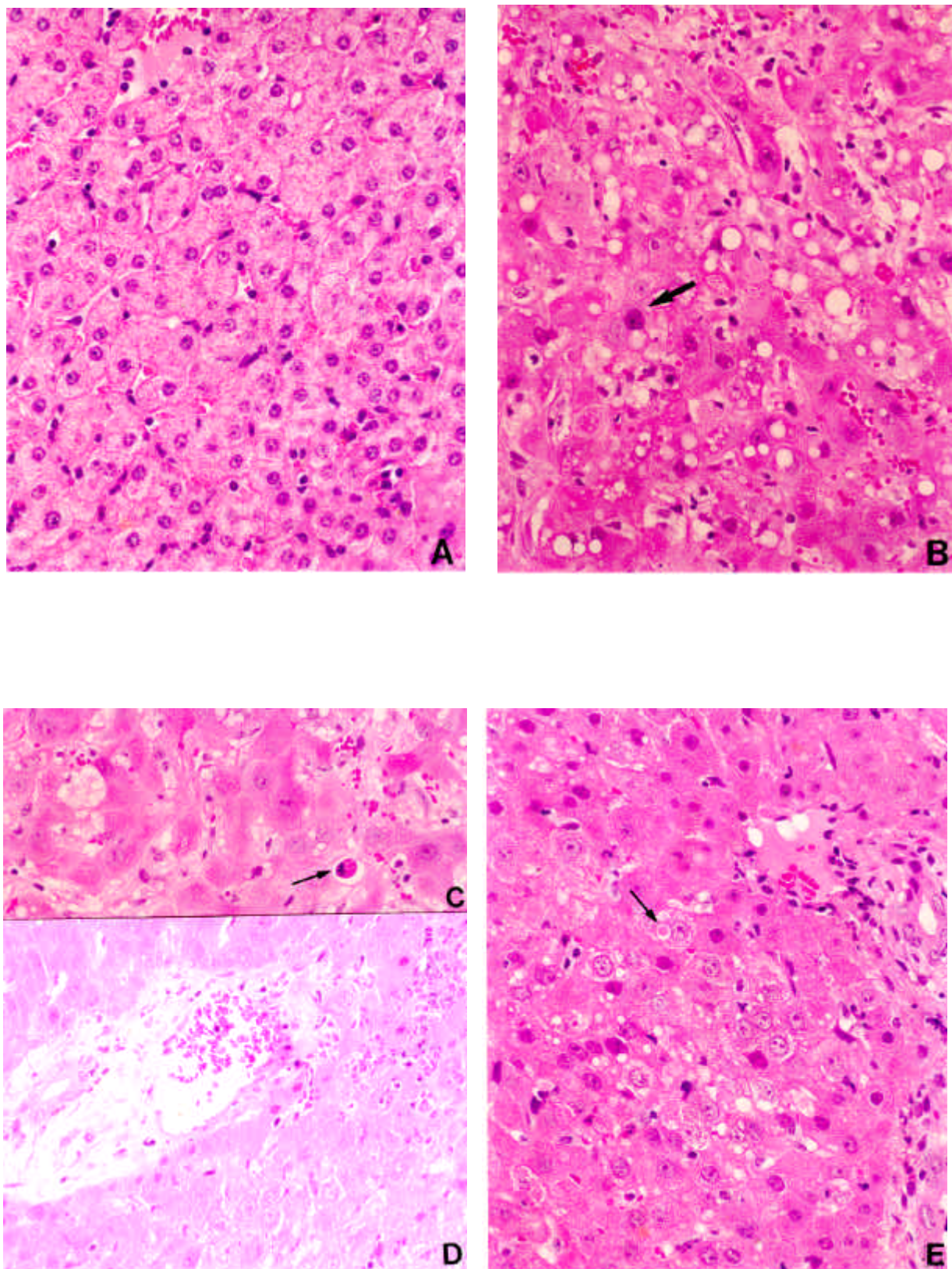


Figura 2: **A** – Fígado normal. $M_1(100x)$ **B** – Esteatose macro e microvacuolar, proeminência de células sinusoidais e megalocitose (seta). M_2 . (80x) **C** – Apoptose (seta), esteatose microvacuolar, proeminência de células sinusoidais e megalocitose. M_4 . (80x). **D** - Necrose periportal M_4 .(80x). **E** – Inclusão hialina intra-hepatocítica (seta). M_3 . (100x). HE.

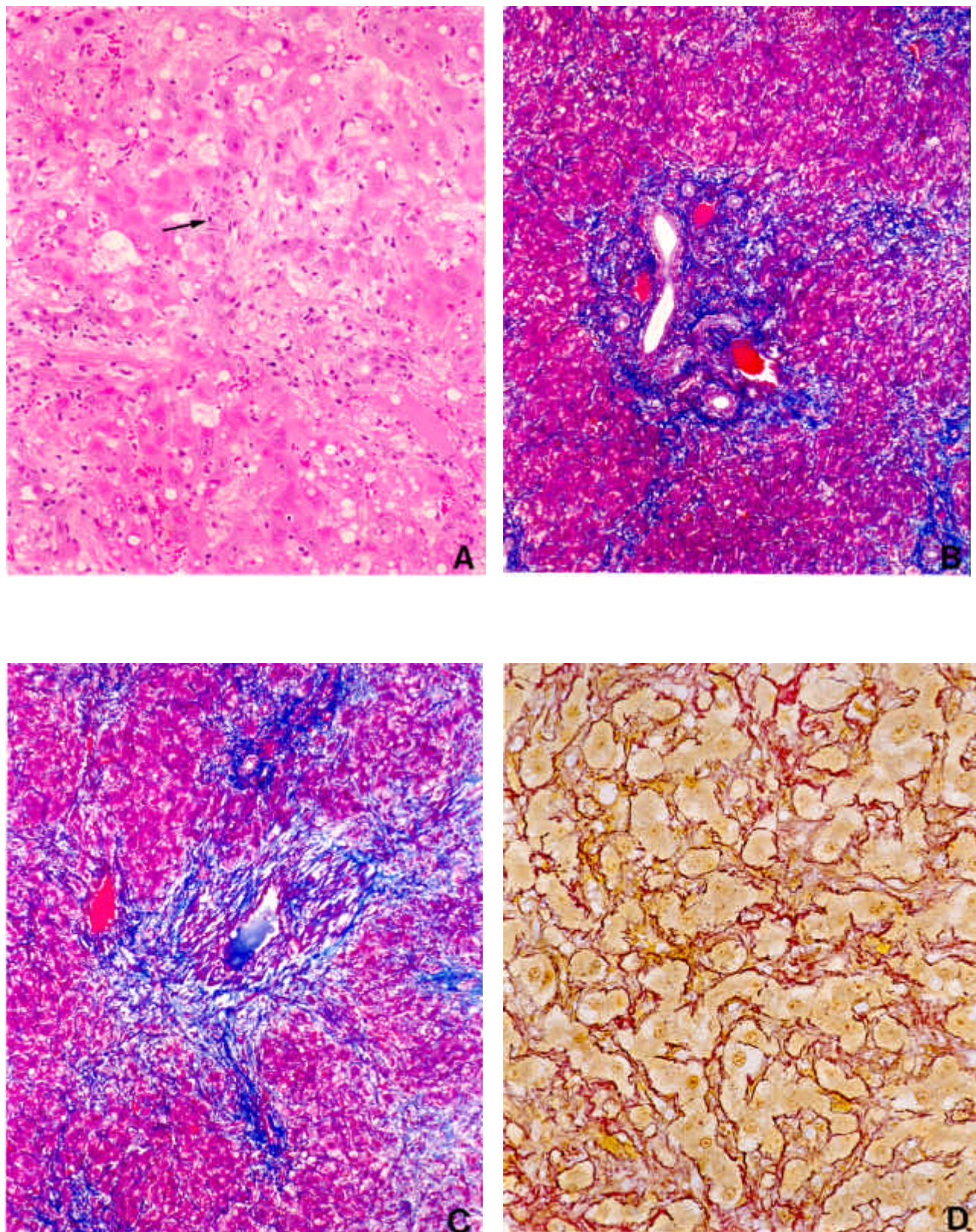


Figura 3: **A** – EP com alargamento fibroso moderado e proliferação de ductos biliares e de células ovais (seta). M₄. (50x) HE **B** – Intensa fibrose portal e moderada pericelular. M₅. (25x). Tricrômico de Masson. **C** – Lesão veno-oclusiva. M₅. (25x). Tricrômico de Masson. **D** – Trama reticular espessada com áreas de colapso. M₅. (80x). Prata Metanamina para Retículo.

4.3.2. Análise Descritiva e Morfometria do Colágeno Total e de Fibras Elásticas

Os cortes histológicos de fígados de M₁ corados com Picrossírius, analisados sob luz polarizada demonstraram intensa refringência amarela ou laranja de colágeno denso associado com colágeno fibrilar fracamente refringente em verde limitados aos espaços-porta inconspícuos e veia centrolobular muito delicado. Em localização pericelular foi observado apenas uma delicada trama fibrilar verde pouco refringente.

Nos demais momentos houve tendência à progressão da fibrose em todos os compartimentos e os cortes corados com Picrossírius sob luz polarizada demonstraram aparecimento de refringência amarela de localização pericelular ao lado da verde. Nos demais compartimentos houve progressivo alargamento da fibrose com predomínio de refringência de tonalidades que variaram de amarela a vermelha, avançando em direção aos compartimentos periportais e pericentrais (Figura 6A e B).

Os mesmos cortes corados com Picrossírius analisados sob luz normal, sem polarização, demonstraram colágenos denso ou fibrilar corados em salmão. Foram analisados 20 campos de cada biópsia e as medianas destes campos foram comparados nos diferentes momentos do experimento. O resultado está apresentado na Figura 4, demonstrando aumento progressivo com diferenças estatisticamente significativas de M₁ a M₅. Os cortes histológicos de fígado de M₁ corados com Resorcina Fucsina de Weigert com oxidação prévia para fibras elásticas demonstraram fibras elásticas bem organizadas, regularmente concêntricas nos vasos nos Eps, e como fina fibrilas entre o colágeno portal (Figura 6C), estando ausentes em localização pericelular e centrolobular.

Nas biópsias hepáticas a partir de M₃ foram observadas fibras elásticas mais grossas entre os feixes de colágeno dos espaços-porta fibrosados e as fibras elásticas nas paredes dos vasos dos EPs estavam com arranjo irregular (Figura 6D). Nas biópsias hepáticas a partir de M₄ foram observadas fibras elásticas irregulares nas paredes das veias centrolobulares que estavam espessadas.

A quantificação das fibras foi feita em 10 espaços-porta e as medianas destes campos foram comparadas nos 5 momentos do experimento. O resultado está apresentado na Figura 5, demonstrando aumento estatisticamente significativo em M₃, M₄ e M₅ em relação ao M₂, mas não há um aumento progressivo com diferença estatística entre estes 3 momentos.

Teste de correlação entre fibra elástica e colágeno usando Teste de Spearman ($p < 0,05$) indicou que há correlação positiva significativa entre colágeno e fibras elásticas ($r_s = 0,638, p < 0,001$).

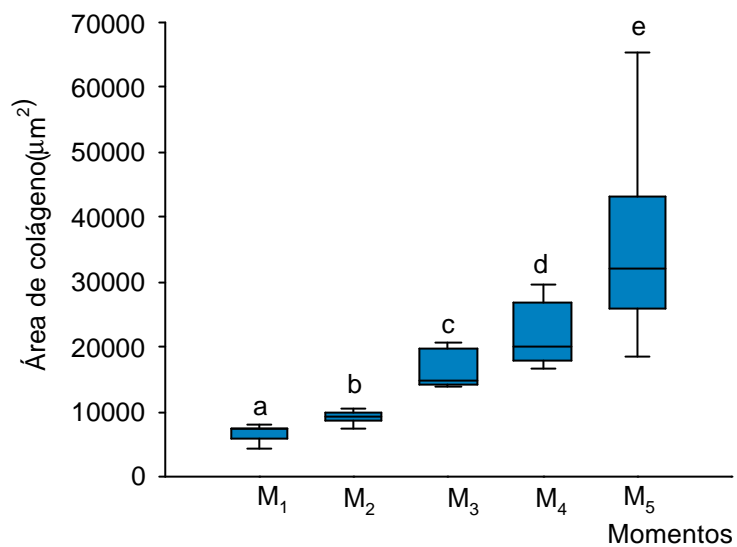


Figura 4: *Box plot* representando as medianas das áreas ocupadas pelo colágeno total (μm^2) em 20 campos em 5 biópsias em cada momento. No *box plot*, o quadrante superior representa 75 % dos dados; o inferior 25 %; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90. As comparações estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), são representadas por letras diferentes.

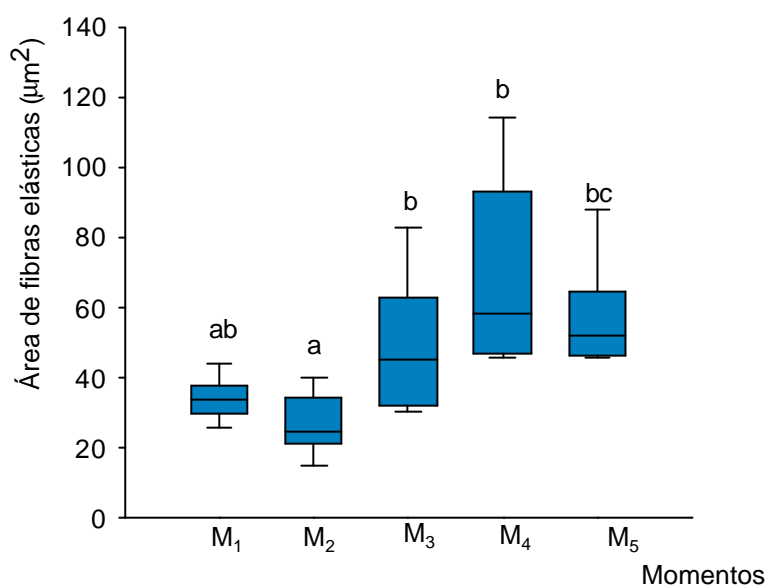


Figura 5: *Box plot* representando as medianas das áreas ocupadas pelas fibras elásticas (μm^2) em 10 campos em 5 biópsias de cada momento. No *box plot*, o quadrante superior representa 75 % dos dados; o inferior 25 %; o traço horizontal a mediana em cada grupo; as barras de erro, os percentis 10 e 90. As comparações estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), são representadas por letras diferentes.

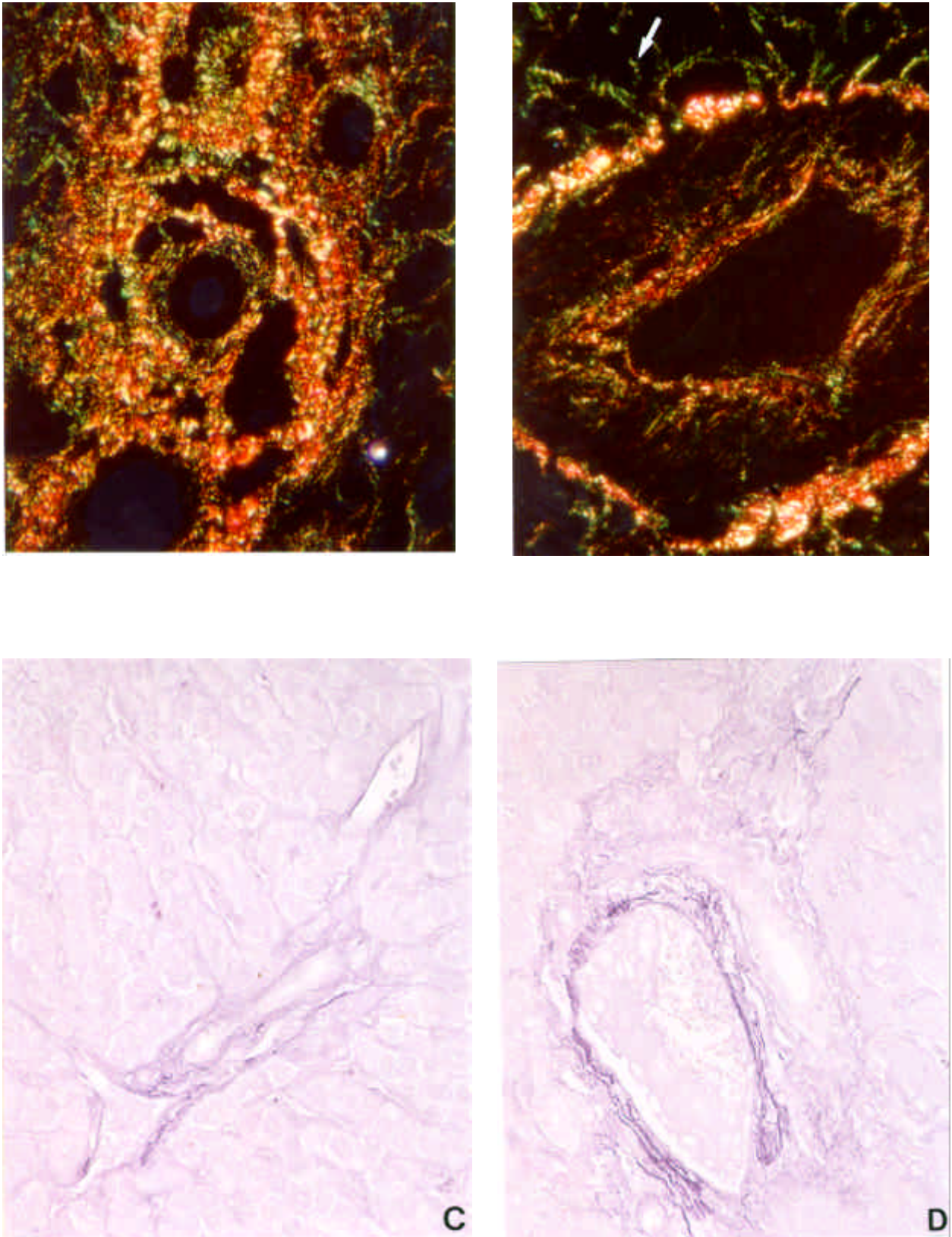


Figura 6: A e B - EP e VC com intensa fibrose e predomínio de colágeno alaranjado associado com colágeno fibrilar verde que predomina em localização pericelular (seta). Picrossírius sob luz polarizada. (40X). C - Fibras elásticas normais no EP. M₂. D - Fibras elásticas com arranjo irregular por entre os feixes de colágeno. M₄. (80x). Resorcina Fucsina de Weigert.

4.4. Imuno-Histoquímica – Análise Semi-Quantitativa de Colágenos I e III

Imunomarcações de colágenos tipos I e III foram obtidas por IFI. Marcação de colágeno tipo I também foi obtida por Imunoperoxidase. Nas biópsias em M₁ o colágeno tipo I foi localizado nos espaços-porta principalmente, e em menor quantidade em região centrolobular e na região pericelular; este colágeno foi o principal constituinte da fibrose portal e aumentou com a progressão da lesão em todos os compartimentos do fígado (Figura 7A). Distribuição similar foi observada para o colágeno III, que se apresentou sob forma de feixes mais espessos nos tratos portais e como finos filamentos de marcação descontínua nos espaços de Disse em M₁. Com a progressão da fibrose houve aumento da marcação dos colágenos nos mesmos locais observados no M₁; os colágeno tipo I e III aumentaram principalmente nos EPs, seguido de pericelular e finalmente ao redor da VC no tipo I e no tipo III (Figura 7B). Nas tabelas 5 e 6 abaixo segue a graduação dos colágenos nos diferentes momentos da lesão.

Tabela 5 – Avaliação semi-quantitativa do colágeno I por Imunoperoxidase nos 5 momentos do experimento

Momento	Animal 1			Animal 2			Animal 3*			Animal 4			Animal 5		
	EP	VC	PC	EP	VC	PC	EP	VC	PC	EP	VC	PC	EP	VC	PC
M ₁	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M ₂	+++	++	++	++	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
M ₃	++	+	++	++	+	+	+++	++	++	++	+	+	++	++	++
M ₄	+++	+++	+++	++	++	++	+++	++	+++	++	++	++	++++	++++	+++
M ₅	++++	++++	++++	+++	+++	+++	-----	-----	-----	+++	++	+++	+++	++	+++

*Morte em M₄ EP= espaço-porta VC= veia centrolobular PS= pericelular

Tabela 6 – Avaliação semi-quantitativa do colágeno III por IFI nos 5 momentos do experimento

Momento	Animal 1			Animal 2			Animal 3*			Animal 4			Animal 5		
	EP	VC	PC	EP	VC	PC	EP	VC	PC	EP	VC	PC	EP	VC	PC
M ₁	++	++	++	++	++	+	+	+	+	++	+	+	++	++	++
M ₂	++	++	++	+	+	++	++	+	+	++	++	++	++	+	+
M ₃	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	++	++
M ₄	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++	+++	+++	+++
M ₅	++++	++	+++	++++	+++	++++	----	----	----	++++	++	+++	++++	++++	+++

* Morte em M₄

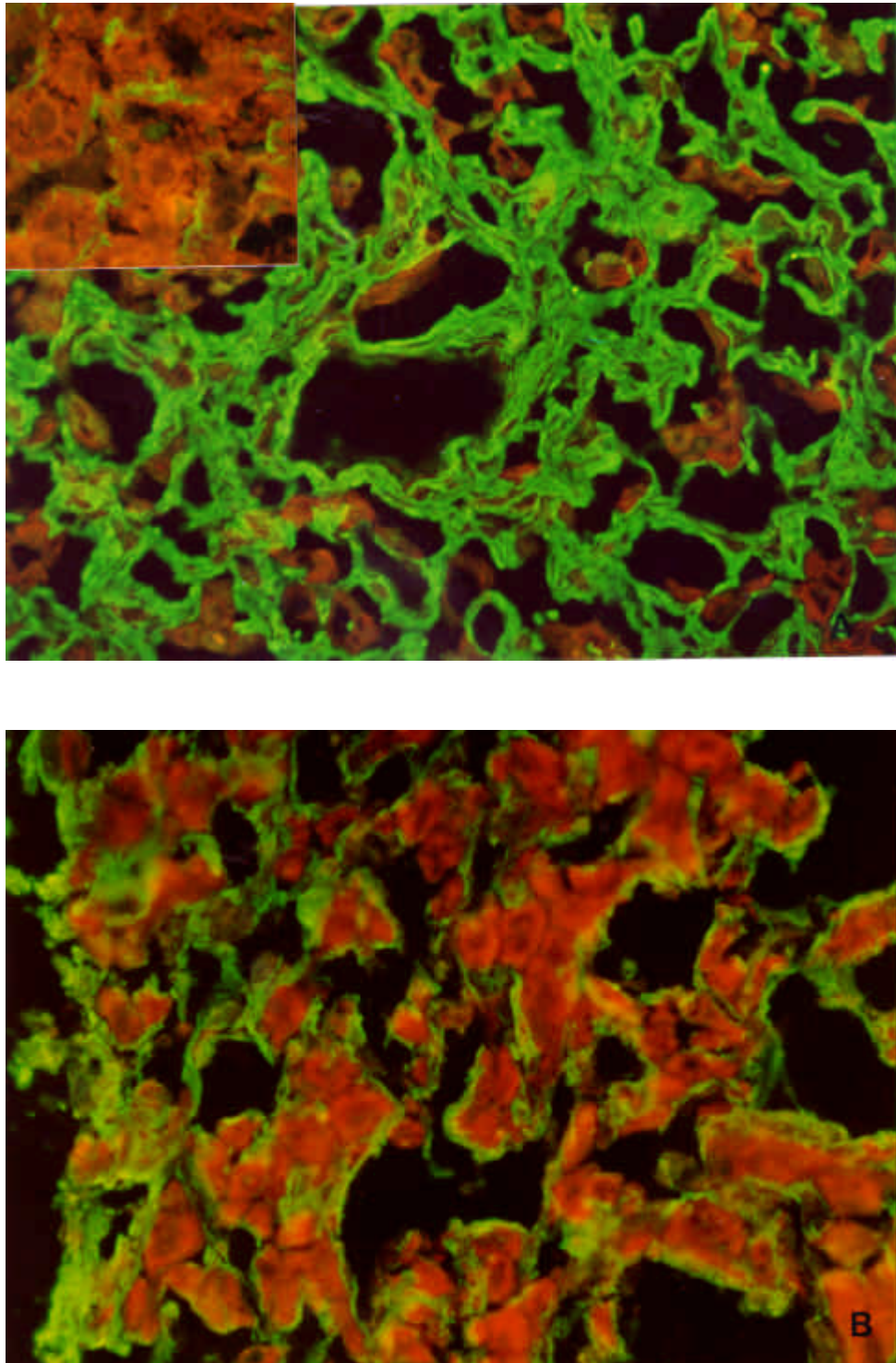


Figura 7 – A- Intenso aumento de colágeno de tipo I distribuídos no EP e pericelular. M₅.(20x). IFI. No “inset”fígado do animal em M₁ demonstrando delicado colágeno de tipo I pericelular. (40x). IFI. B- Aumento de colágeno de tipo III pericelular. M₅. (40x). IFI.

4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

4.5.1. Avaliação Descritiva da Lesão em Hepatócitos

As biópsias em M₁ apresentavam padrões ultraestruturais normais semelhantes aos descritos para outras espécies. Alterações nos hepatócitos foram examinadas em aumentos a partir de 4400x.. A partir de M₂ alguns hepatócitos apresentavam membrana nuclear irregular com aspecto de projeções digitiformes, mitocôndrias dilatadas e corpos mielínicos (Figura 8A). Hepatócitos em necrose e apoptose (Figura 8B) vistos na microscopia óptica foram verificados em M₃ e muitas células de Kupffer apresentavam-se fagocitando restos destas células (Figura 8C). Inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas observadas na coloração de HE provavelmente representam fragmentos de corpos apoptóticos fagocitados por hepatócitos vizinhos (Figura 8D).

4.5.2. Avaliação Morfológica e Quantificação das Células Sinusoidais

A contagem das células sinusoidais foi feita através da morfologia de cada tipo celular que se mostrou bem distinta até M₃ do experimento. Uma observação importante é que a maioria das CHEs apresentavam apenas uma gota de gordura (Figura 9A). Assim, foi feita uma contagem por população de célula sinusoidal apenas nos 3 primeiros momentos (Figuras 10 e 11). Houve aumento significativo de CK em M₃ em relação as de M₁ e M₂; os LAF também estavam aumentados significativamente em M₃. Simultaneamente as células endoteliais diminuíram significativamente em M₂ e M₃ e as CHEs estavam diminuídas em M₃.

Nas biópsia em M₄ e M₅ não foi mais possível fazer distinção entre as células sinusoidais, pois as gotas que eram a principal identificação das CHEs, não foram mais observadas ; paralelamente houve aumento de células alongadas com núcleos ovais ou com proeminente RER (Figura 9B) associadas à intensa proliferação de fibrilas de colágeno ao redor e no citoplasma destas células (Figura 9C e D). Assim, o comportamento das células sinusoidais foi estudado pela contagem de células hepáticas sinusoidais totais em relação ao número de hepatócitos nos 5 momentos (Figura 12). Em relação a contagem de células sinusoidais totais houve aumento significativo nas biópsias de M₄ e M₅; enquanto isso, a quantidade de hepatócitos diminuiu a partir da biópsia de M₃, diminuindo mais em M₄ e mantendo-se sem diferença significativa na última biópsia.

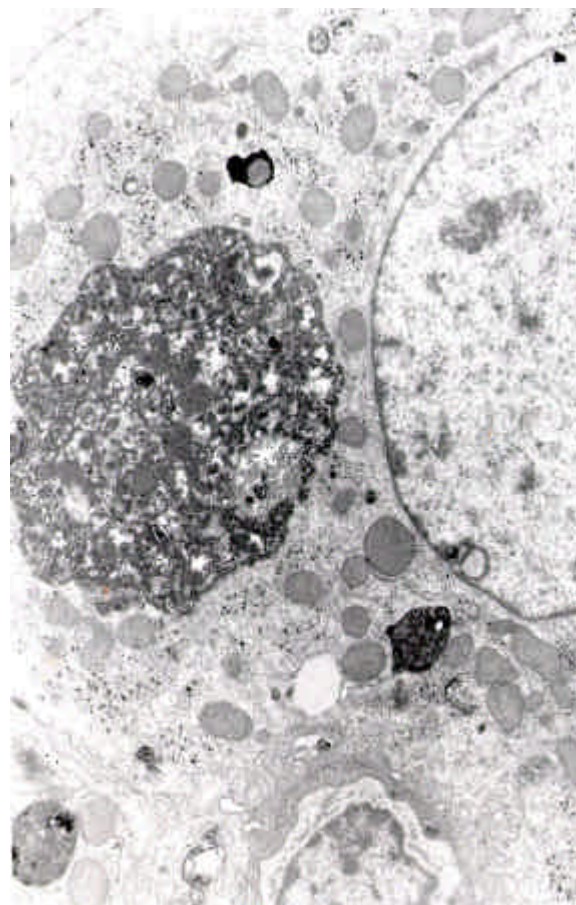
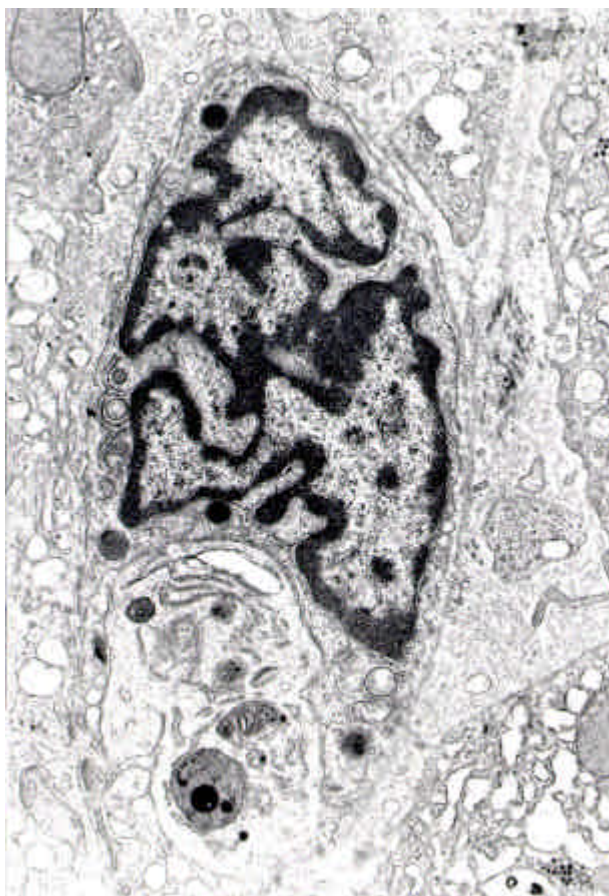
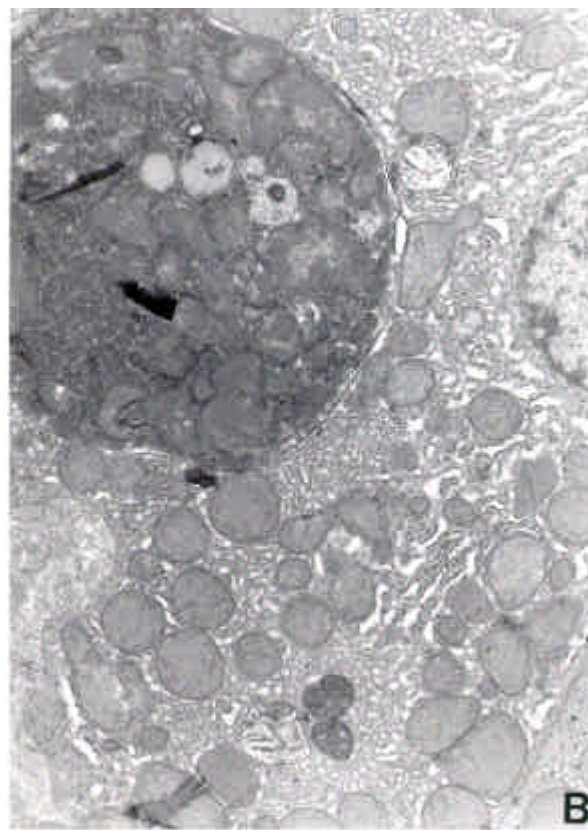
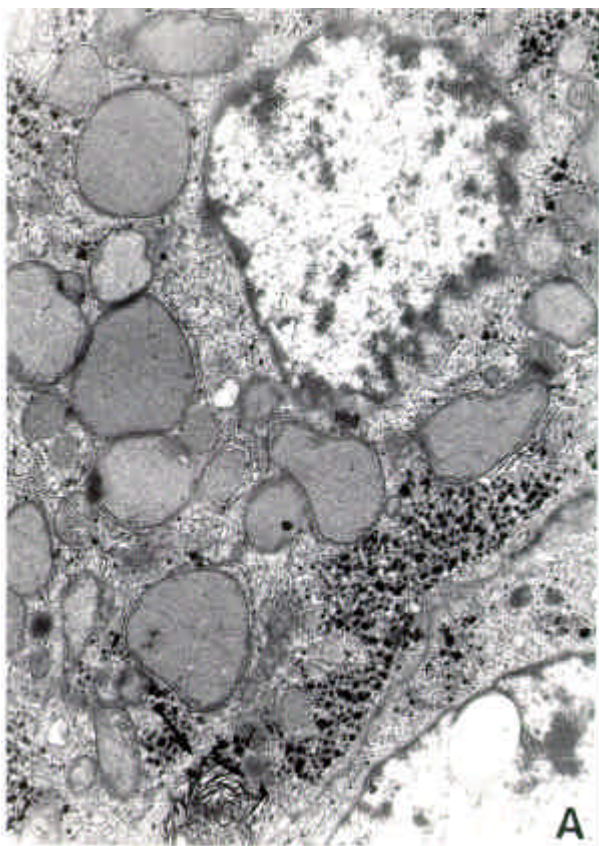
A correlação entre células sinusoidais e colágeno usando Teste de Spearman ($p < 0,05$) indicou que há correlação positiva significativa ($r_s = 0,602$, $p = 0,00150$). Teste de correlação entre células sinusoidais totais e hepatócitos usando Teste de Pearson indicou que há correlação negativa estatisticamente significativa entre esses dois parâmetros ($r = -0,753$, $p < 0,001$).

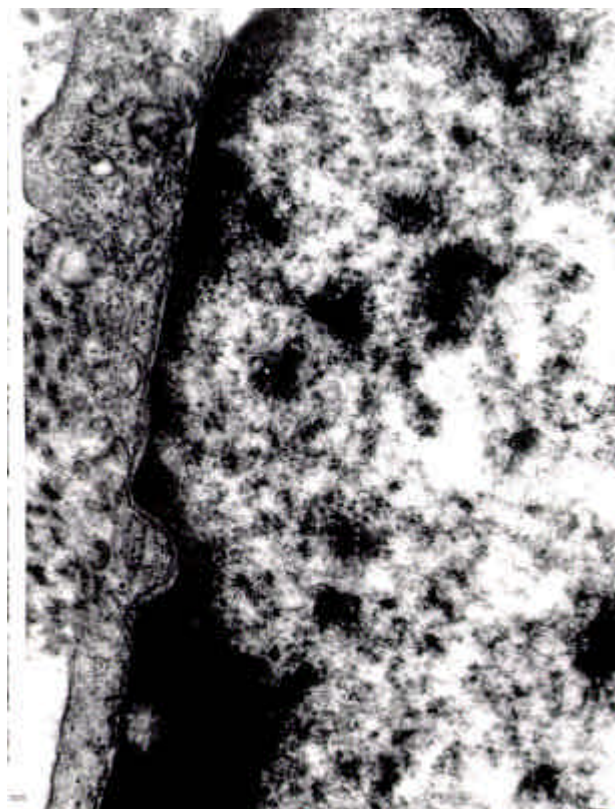
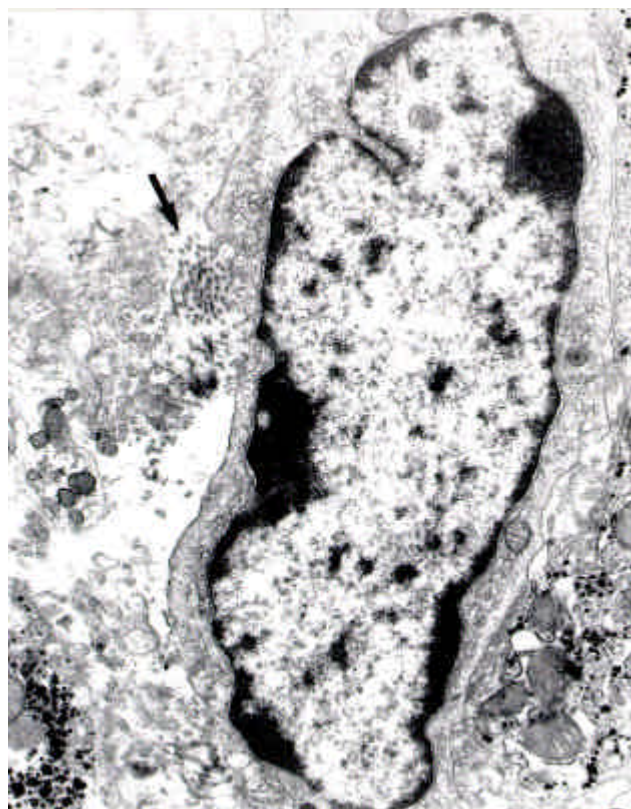
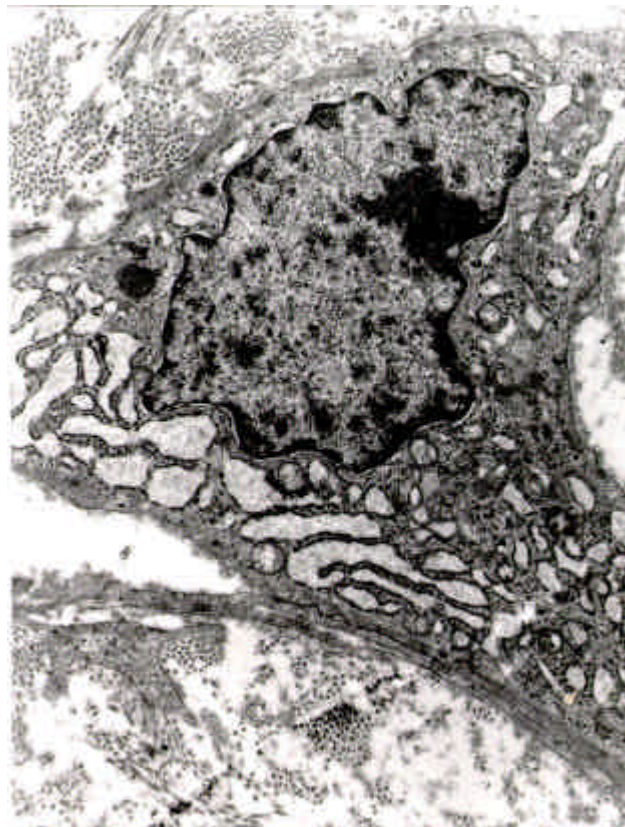
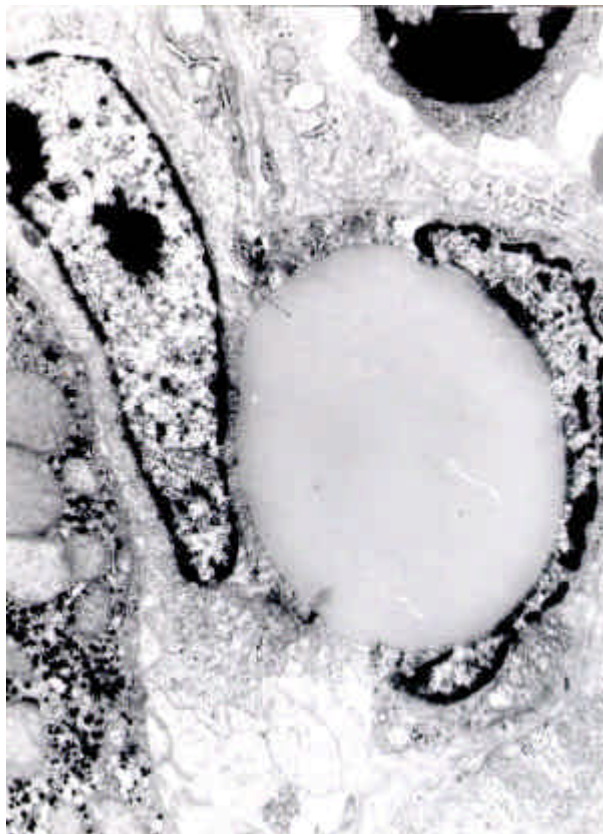
FIGURA 8 (página 41)

- A - Hepatócito com membrana nuclear irregular, com indentações, mitocôndrias dilatadas e corpos mielínicos (seta). M₂. (7000x).MET.
- B- Hepatócito em apoptose . M₃. (7000x). MET
- C – Células de Kupffer fagocitando restos de hepatócito necrótico. M₃. (7000x). MET.
- D – Restos de corpos apoptóticos no citoplasma de hepatócitos. M₃. (4400 x). MET.

FIGURA 9 (página 42)

- A – CHEs normal com núcleo rechaçado por uma única gota de gordura grande bem delimitada. M₁. (7000x). MET.
- B – Célula com núcleo semelhante ao da CHE em A, RER proeminente e com abundante colágeno próximo a membrana citoplasmática, sem conteúdo lipídico. M₄. (7000x). MET.
- C – Célula alongada com núcleo ovóide, raras organelas citoplasmáticas e fibrilas de colágeno em íntimo contato com a membrana citoplasmática (seta). M₅. (7000x). MET.
- D – Maior aumento da célula anterior. M₅. (20.000x). MET.





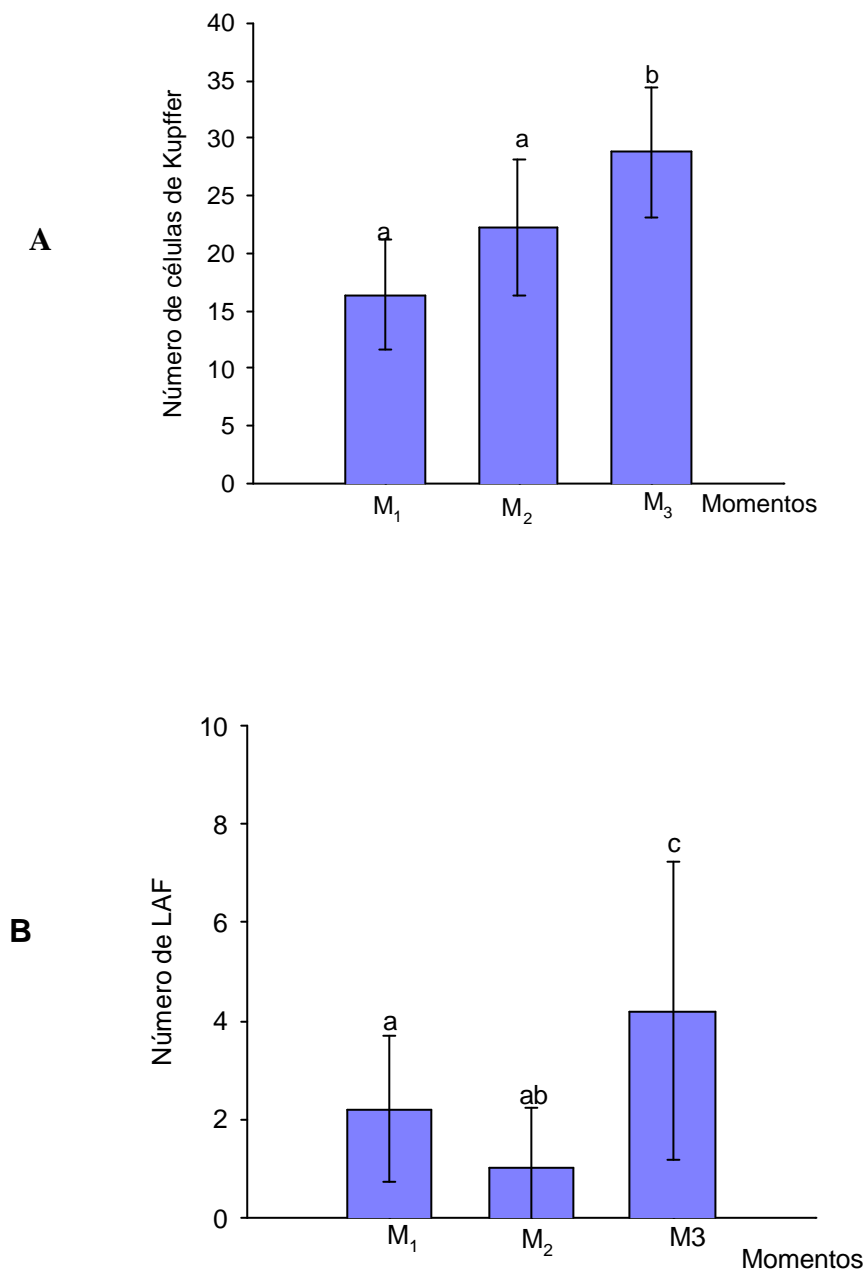


Figura 10: Contagem do número de células de Kupffer (A) e de LAF (B) nas biópsias hepáticas em 3 momentos da lesão; a contagem foi feita em 20 campos das biópsias à MET com aumento de 1100X. Cada barra no gráfico representa a média e o desvio padrão da média dos valores obtidos para essa variável. As comparações estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) são representadas por letras diferentes.

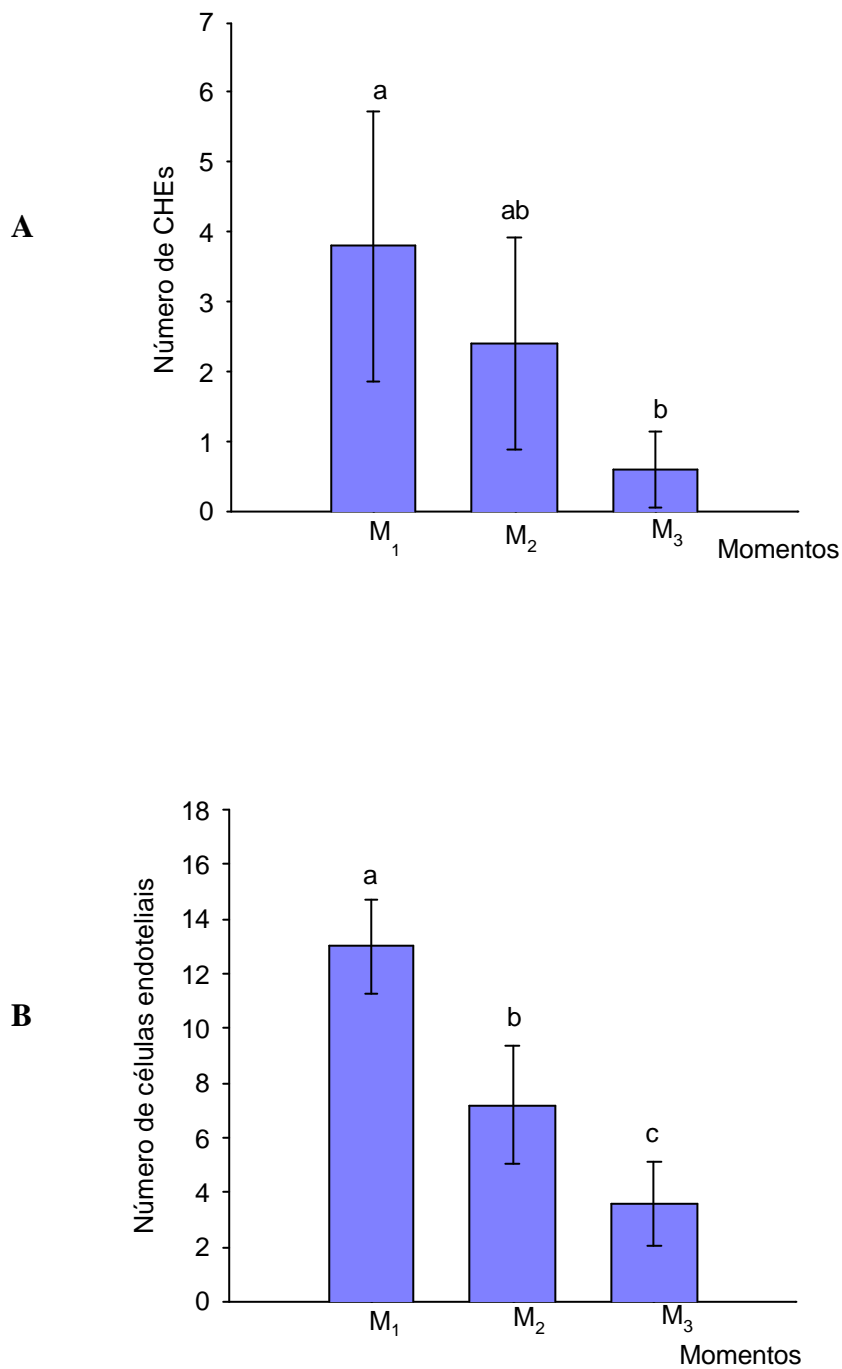


Figura 11: Contagem do número de CHEs (A) e de células endoteliais (B) nas biópsias hepáticas em 3 momentos da lesão; a contagem foi feita em 20 campos das biópsias à MET com aumento de 1100X. Cada barra no gráfico representa a média e o desvio padrão da média dos valores obtidos para essa variável. As comparações estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) são representadas por letras diferentes.

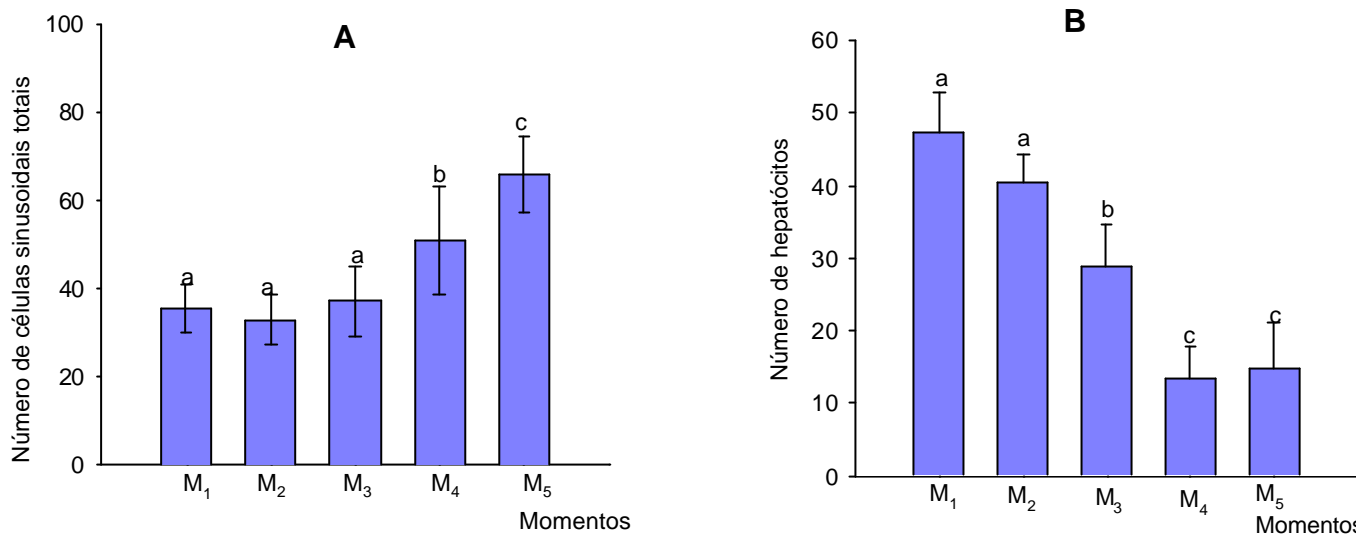


Figura 12: gráfico A representa o número total de células sinusoidais nas biópsias hepáticas nos 5 momentos da lesão. Gráfico B representa o número de hepatócitos nas biópsias hepáticas nos 5 momentos da lesão. A contagem foi feita em 20 campos das biópsias com aumento de 1100x à MET. Cada barra no gráfico representa a média e o desvio padrão da média dos valores obtidos para essa variável. As comparações estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) são representadas por letras diferentes.

5. DISCUSSÃO

Os sinais clínicos e achados de necropsia observados nos animais do presente experimento foram similares aos descritos em casos de intoxicações espontâneas e experimentais em bovinos por *Senecio brasiliensis* e por outras espécies de *Senecio*^{33;34;18;36}; entretanto esses sinais ocorreram mais precocemente no presente experimento quando comparado com os dados de literatura

Esses sinais clínicos começaram a surgir no início da quarta semana e são conhecidos como marcadores do início de queda do estado geral e eventual evolução para a morte. Assim, a administração da planta foi interrompida nesse momento o que evitou a morte dos animais por problemas digestivos como já havia ocorrido nos experimentos piloto. Isso possibilitou a avaliação dos animais até o 60º dia e verificação da evolução das lesões hepáticas mesmo após à suspensão da administração da planta, um dos nossos objetivos do presente trabalho.

Regressões das lesões causadas por APs, com a sua retirada e terapia de suporte, é descrita em humanos com DVO crônica²⁰ e em equinos com hepatopatia crônica por *Senecio vulgaris*⁹⁷. No nosso experimento a lesão foi progressiva de M₂ para M₃, mesmo com a interrupção da administração da planta, resultado semelhante ao que é descrito em bovinos em trabalhos com outras espécies de *Senecio*^{53;98} e em experimento com *Senecio brasiliensis* com dose única de 10g/kg de planta verde⁴⁹. Existem relatos de experimentos com doses de 1,98 mg/kg/dia durante 15 dias de *Senecio jacobae* que causaram apenas aumento temporário de enzimas hepáticas⁹⁹; este é um trabalho clínico laboratorial, não incluindo análise histopatológica, mas o resultado sugere regressão da lesão. A relação dose x tempo para intoxicações por APs em bovinos é importante, havendo um nível limite além do qual pode ocorrer intoxicação⁹.

Na avaliação do perfil bioquímico hepático os aumentos das enzimas FA e GGT neste experimento coincidiram com o aumento de intensidade da hiperplasia ductal verificada nas biópsias em M₄ e M₅. Essas enzimas localizam-se em membranas, sendo a FA associada a membrana canalicular e GGT associada a células epiteliais dos ductos biliares⁹⁰. Craig *et al*⁵³ (1991) em experimento com bovinos intoxicados por *Senecio Jacobae* demonstraram que estas 2 enzimas aumentaram no mesmo período, sendo que as colheitas de sangue nesse experimento foram semanais. Devido ao fato das nossas colheitas terem sido quinzenais, picos de aumento destas e de outras enzimas podem ter sido perdidas. A enzima Glutamato Desidrogenase é também considerada um bom

indicador de lesão hepática inicial, mas por causa do seu rápido retorno a valores basais, é de pouca utilidade para diagnosticar lesões crônicas, como as que ocorrem comumente pelos APs⁵³. Embora FA e GGT sejam consideradas bastante sensíveis para detecção de lesões hepáticas subclínicas por estes alcalóides em bovinos e permaneçam elevadas por mais tempo^{53;51}, é necessário ressaltar que nem sempre a magnitude de elevação destas enzimas no soro será proporcional ao grau de disfunção hepática¹⁰⁰, sendo necessário associar outros parâmetros.

Devido ao fato de muitas vezes não haver uma boa correlação dos sinais clínicos com o perfil de enzimas hepáticas nos casos de intoxicações por APs, a inclusão de biópsia hepática percutânea a esses exames é um bom método de avaliação da lesão^{53;98;40}, especialmente quando se tem como objetivo acompanhar a progressão da lesão desde o início. Outros trabalhos semelhantes realizados tiveram como objetivo principal acompanhar as lesões hepatocelulares^{98;40}, e não as alterações da MEC e das células sinusoidais.

As lesões hepáticas dos nossos 5 animais tiveram padrões similares em cada momento, embora houvessem diferenças quanto a intensidade. Estas diferenças são conhecidas e entendidas como variações individuais entre os animais⁹, mesmo com exclusão de algumas variáveis que pudessem alterar os resultados, como sexo⁶ e idade³⁶. A confirmação da importância desta resposta individual foi a morte de um dos animais aos 45 dias do experimento. Comparando diferentes espécies animais entre si estas diferenças de susceptibilidade aos APs podem ser melhor entendidas pelas diferenças no metabolismo hepático de bioativação, detoxificação e excreção destes alcalóides²²; dentro da mesma espécie a variabilidade genética afetando a capacidade de metabolismo de xenobióticos por enzimas do sistema microsomal hepático seria um fator importante para explicar estas diferenças¹⁰¹.

Para eliminar variações nas concentrações de alcalóides em plantas da mesma espécie colhidas em diferentes regiões, em diferentes épocas do ano^{25;26} e em diferentes estádios de crescimento³ toda a planta do experimento foi colhida da mesma região e na mesma época. A dose diária da planta e o tempo de duração do experimento foram baseados em experimentos piloto utilizando-se a planta da mesma colheita. O primeiro experimento piloto baseou-se em trabalho de intoxicação experimental com *Senecio oxyphyllus* com dose variando de 0,125g/kg a 1,0g/kg de peso do animal em períodos de administração variando de 5 a 120 dias⁹⁸. Quanto a espécie *Senecio brasiliensis* foi escolhida por ser a mais disponível na região e por ser considerada a mais tóxica, sendo

suficientes pequenas doses em tempo mais curto para causar lesões em comparação a outras espécies de *Senecio*⁴⁹.

Na avaliação histológica das biópsias as primeiras lesões observadas em hepatócitos foram a necrose e a apoptose demonstrando que os APs causam a morte celular por estes dois mecanismos, semelhante a dimetilnitrosamina, tioacetamida, cocaína e ciclohexamida^{apud102}. Em M₃ foram observadas em alguns hepatócitos inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas similares as descritas em intoxicações por outras espécies de *Senecio*⁹⁸. São consideradas diferentes naturezas dessas inclusões intracitoplasmáticas por diferentes autores como: fragmentos de hepatócitos que sofreram apoptose e foram fagocitados por hepatócitos vizinhos¹⁰², degradação citoplasmática focal com formação de citolisossomos ou aumento não específico de lisossomos, citosegregossomos ou ainda hemácias compactadas e fagocitadas⁵³.

A megalocitose hepatocelular é considerada como resultado de uma ação combinada do estímulo regenerativo pós destruição celular e ação antimitótica dos metabólitos pirrólicos destes alcalóides⁶. Esta é a lesão principal descrita no parênquima hepático em animais domésticos intoxicados por estes alcalóides^{18;36;3}, embora possa ser leve em alguns casos, onde predominam lesões degenerativas e fibrose perivenular³⁸. A megalocitose foi evidente em nosso experimento a partir de M₃ e foi progressiva até M₅.

Os demais achados do parênquima hepático também são similares aos achados descritos em casos de intoxicação por APs em animais domésticos^{18;36;3}. A sequência de aparecimento de lesões nos hepatócitos é similar a descrita em biópsias em casos de intoxicação experimental por *Senecio laetus* em bovinos⁴⁰, exceto apoptose que não é relatada neste trabalho.

Quanto às alterações de MEC hepática, no presente material o aumento de tecido conjuntivo já foi observado em M₂, principalmente em espaços-porta, seguido de veias centrolobulares e em menor grau pericelular. Nas biópsias em M₃ ficou mais evidente que a fibrose portal era a alteração de matriz mais importante que ocorria. Outros autores, estudando bovinos intoxicados por APs, descreveram a fibrose em EP como a mais grave, seguida pela pericelular^{33;98;40}. A fibrose centrolobular é descrita como importante por alguns autores^{18;3;38;49}, como sutil por outros³³ ou ainda como ausente por outros⁴⁰, sendo raramente descrita como a lesão mais importante^{3;38}.

Em humanos a DVO é o principal quadro associado a intoxicações crônicas por APs^{28;32}. Esta doença é atualmente chamada de síndrome de obstrução sinusoidal (SOS), visto que recentemente foi verificado que a injúria inicia-se por alterações nas células

endoteliais dos sinusóides hepáticos, não sendo o envolvimento de vênulas hepáticas essencial para o desenvolvimento dos sinais clínicos¹⁰³.

Estudos *in vitro* mostram que as CEs são mais susceptíveis a drogas que causam SOS do que os hepatócitos e isto é consistente com estudos *in vivo* em ratos com AP monocrotalina ^{apud}103. Neste modelo as células endoteliais se retraem permitindo que as hemácias penetrem no espaço de Disse; esse processo leva ao descolamento das células sinusoidais que protruem para a luz sinusoidal obstruindo-a e dificultando a circulação sanguínea e levando a necrose de hepatócitos.

Em resposta à essa necrose há um influxo de monócitos para estas áreas o que agrava mais a obstrução da microcirculação¹⁰³. Fibronectina produzida por células endoteliais lesadas, citocinas produzidas pelas células de Kupffer e produtos de peroxidação lipídica, radicais livres, proteases, citocinas e fatores de crescimento originados de hepatócitos lesados são responsáveis pela ativação das células estreladas que são consideradas as principais produtoras de colágeno^{4;75}; subseqüentemente se instala a colagenização dos sinusóides e vênulas¹⁰³. Neste modelo a extensão da fibrose para os espaços-porta ocorreria como evento mais final da lesão^{30;32}

Ao contrário de outras doenças hepáticas intrínsecas, os sinais e sintomas de hipertensão portal na SOS precedem evidência de lesão no parênquima, sendo o distúrbio da circulação hepática nesta doença a causa e não a consequência da doença do parênquima. O envolvimento das veias hepáticas não é essencial para o desenvolvimento de sinais clínicos e a oclusão das veias está associada com doença mais severa exacerbando o distúrbio circulatório que ocorre em nível sinusoidal; estas duas observações em pacientes fornecem a chave para a compreensão do mecanismo da doença¹⁰³.

Apesar da fibrose ser um evento comum a vários modelos experimentais de lesões^{70;104} e doenças hepáticas crônicas^{63;64;65;105;67} a localização e progressão da deposição de colágeno variam com a etiologia. Assim, a fibrose pode começar nos sinusóides, devido a lesão em células endoteliais, como no caso da SOS¹⁰³ ou no centro do lóbulo como nas intoxicações por CCL₄ e Dimetilnitrosamina em decorrência de necrose em hepatócitos centrolobulares^{54;10; 104}.

A necrose de hepatócitos com reação inflamatória é também considerada uma etapa importante no mecanismo de fibrose¹⁰⁶. No nosso trabalho, a localização da necrose não foi zonal no lóbulo hepático e a reação inflamatória foi discreta. Ao mesmo tempo o número de células em apoptose alcançou o pico em M₃, sem diferença significativa entre os outros momentos. Em modelos experimentais em ratos com o AP retrorsina associado com

hepatectomia parcial foi observado alto índice de apoptose de hepatócitos com megalocitose sugerindo esse padrão de morte celular como uma via importante para remoção de hepatócitos lesados¹⁰⁷.

No nosso experimento a fibrose portal foi mais evidente e mais precoce do que em outros compartimentos; entretanto a sua patogenia não é clara.

Na quantificação de colágeno total nas biópsias controle e durante a progressão da lesão os cortes histológicos foram corados pela técnica do Picrossírius, que é um método histoquímico específico para detecção de colágeno em diferentes tecidos⁶². Houve aumento progressivo de colágeno significativo em diferentes momentos da lesão. Optamos por esta coloração, pois métodos como Masson, Mallory e van Gieson apesar de bastante usados podem não corar seletivamente apenas estruturas que contêm colágeno como fibras reticulares e membranas basais⁶².

O método do Picrossírius com análise à luz polarizada foi extensamente usado por Junqueira et al¹⁰⁸ (1978) para o estudo comparativo de tecidos conjuntivos de vertebrados, que observaram uma forte correlação entre a localização de diferentes cores e intensidade de birrefringência e a distribuição dos colágenos tipos I, II e III. Essa observação levou estes autores a postular que diferentes tipos de colágenos podem ser diferenciados em secções histológicas pelo Método de Picrossírius analisado com Microscópio de Polarização. O colágeno tipo I apresentar-se-ia como bandas espessas (1-10 μ m) com intensa birrefringência e corado em tons variando do amarelo ao vermelho; o colágeno III apresentaria como fibrilas finas individuais (0,5-1,5 μ m) com fraca birrefringência e coloração esverdeada e o colágeno II como microfibrilas com arranjo irregular e frouxo, fraca birrefringência e multicolorido. Essa hipótese foi revista pelos próprios autores que relataram que as diferenças de coloração e intensidade de birrefringência são conferidas por diferenças de padrão físico de agregação e não devido a uma interação química entre o corante e os diferentes tipos de colágeno¹⁰⁹.

O Picrossírius tem sido considerado um método de escolha especialmente para estudo de colágeno em tecidos normais^{110;62}, embora a quantificação da fibrose hepática por esta técnica tenha apresentado uma boa correlação com a determinação bioquímica de colágeno por hidroxiprolina em fígados com lesões de esquistossomose, capilaríase, hepatites e cirrose¹¹¹. A sua aplicação deve ser feita com cautela em situações de rápido *turnover* de colágeno, como em cicatrização de feridas, material embrionário ou em condições patológicas nos quais a reparação envolve intensa produção de colágeno e/ ou degradação^{apud62}.

Considerando a técnica de Picrossírius sob luz polarizada, no M₁ havia predomínio de colágeno amarelo (tipo I), nos EPs e VC associado a pequena quantidade de colágeno verde fibrilar, pouco refringente (tipo III), que predominava em localização pericelular. Com a evolução da fibrose houve proliferação de colágeno amarelo (tipo I) em localização pericelular e embora o colágeno verde (tipo III) tenha aumentado nos EPs e em localização centrolobular, em M₅ havia predomínio de colágeno amarelo (tipo I) nestes locais.

O colágeno é o principal componente da MEC hepática e está bastante aumentado em várias doenças hepáticas agudas e crônicas independente da etiologia¹⁰⁴. Estudos bioquímicos têm demonstrado que no fígado humano normal 4% do total de proteínas é representado por colágeno; 53% do total de colágeno intersticial é do tipo I e 47% é do tipo III. Ocorrem mudanças destas taxas na cirrose alcoólica, com aumento do colágeno total para 10% da proteína total, com o tipo I representando 75% e o tipo III de 18 a 34%⁶⁷. Em trabalhos usando anticorpos purificados contra colágeno humano extraído de fígados normais e cirróticos foram identificadas quantias similares de colágenos I, III, IV e V em fígados normais, com uma leve predominância do tipo III; em fígados cirróticos, independente da etiologia, contendo mais de 20mg de colágeno/g de tecido, o colágeno tipo I foi predominante⁶⁶.

O fígado normal de rato contém menos colágeno do que o fígado humano, representando apenas 0,55 % da proteína total. Em cirrose induzida por CCl₄ essa quantidade aumenta para 2%. Do total do colágeno intersticial do fígado normal de rato, o tipo I corresponde a 60% e o tipo III 40%. Em cirrose induzida por CCl₄ embora haja aumento do total, as proporções são mantidas^{apud70}.

Na espécie bovina não há relatos com estudos qualitativos ou quantitativos dos colágenos em fígados normais. Nos cortes histológicos do presente experimento observamos que as áreas correspondentes aos colágenos de tipos I e III reveladas pela imunofluorescência indireta (IFI) foram também coradas pela técnica do Picrossírius, embora sem essa diferenciação. A pesquisa pela técnica de IFI no fígado em M₁ demonstrou predominância de colágeno tipo I em todos os compartimentos. Houve aumento significativo do colágeno tipo III nos momentos seguintes, mas sempre acompanhado pelo aumento também do tipo I, resultando em contínua predominância deste último. Assim, à semelhança dos resultados de estudos em outras espécies^{70;67}, o aumento do colágeno total não muda as proporções dos diferentes tipos em relação ao fígado normal.

O colágeno tipo I em biópsias de fígados normais de bovinos (M₁) foi encontrado nos EPs, ao redor da veia centrolobular e em localização perisinusoidal similar ao descrito em humanos e ratos^{63;64;70;104}. Em ratos fibras do colágeno tipo I dos espaços portais estão em continuidade com fibras similares no interstício lobular imediatamente adjacente, que por sua vez estão em continuidade com o espaço central; desta forma fibras e feixes de colágeno tipo I formam o arcabouço estrutural do lóbulo hepático⁷⁰. Este aspecto parece estar presente, de forma similar, em bovinos .

O colágeno III foi observado em localização similar ao colágeno I, mas com uma imunomarcagem menos intensa e com aspectos de feixes nos EPs e fibrilar descontínuo nos outros compartimentos. Esta distribuição é similar ao observado em humanos e ratos^{64;104}. No nosso experimento este colágeno não foi prevalente no espaço de Disse normal, onde a marcação do tipo I pareceu ser bem mais intensa.

Outros autores já demonstraram que o colágeno III não é prevalente no espaço de Disse normal estando frequentemente associado com bandas cruzadas de colágeno tipo I e com fibronectina e tendendo a ser mais proeminente nas proximidades das regiões portal e central⁵⁸. No entanto há trabalhos em humano que não descrevem a presença de colágeno I no lóbulo hepático em fígados normais e fibróticos, sendo encontrado apenas colágeno III¹¹².

Nas biópsias hepáticas com fibrose, de M₂ a M₅ do experimento, houve aumento progressivo dos colágenos I e III nos mesmos locais. Em humanos e ratos com fibrose hepática também ocorre manutenção da localização destes colágenos independente da etiologia^{64;54;104}.

Embora não tenhamos feito uma quantificação bioquímica ou análise morfométrica, dos colágenos individualmente o colágeno tipo I parece ser prevalente no fígado normal e com fibrose da espécie bovina semelhante ao observado em ratos e humanos^{72;63;66;67}. Os nossos resultados de imuno-histoquímica tiveram uma correlação positiva com os resultados de Picrosísíus sob luz polarizada, considerando a interpretação dada a coloração dos colágenos I e III .

Identificação de cada tipo de colágeno pela imuno-histoquímica teria sido a técnica de escolha para realizar estudo morfométrico, mas como os anticorpos para bovino só reagiram em cortes de congelação e a marcação só foi possível por IFI, no caso do colágeno III, não foi possível realizar a quantificação individualmente. Análise morfométrica usando métodos histoquímicos inespecíficos^{84;113;1}, para verificar progressão

de fibrose em biópsias hepáticas através de sistemas de análise de imagens é uma metodologia usada em humanos com hepatite crônica e cirrose¹¹³.

Não conseguimos imunomarcção para colágeno tipo IV nas biópsias hepáticas em bovinos normais ou com fibrose no experimento piloto. Este colágeno é descrito em fígados normais de ratos⁷⁰ e humanos nas membranas basais vasculares e ductais^{63;64} e intralobular ao longo do espaço de Disse em humanos^{112;63}. Nas fibroses hepáticas por alcoolismo ou esquistossomose e intoxicação por CCL4 estas localizações são mantidas observando-se aumento deste colágeno^{112;63;64;70}.

O colágeno IV em localização perisinusoidal é descrito como agregados descontínuos no Espaço de Disse, porém dissociados de outros componentes da membrana basal como a laminina⁵⁸. A falha em demonstrar tal estrutura em fígados normais não exclui a sua existência e pode ser decorrente de uma diferente organização molecular¹¹².

O estudo comparativo de fígados normais com outros fibróticos e cirróticos identifica o colágeno tipo IV como um bom marcador de anormalidades perisinusoidais e o espessamento de fibras reticulares é considerado um estágio crítico de dano lobular^{70;82}. É importante ressaltar que a extensa rede de reticulina demonstrada na microscopia óptica não corresponde apenas a um componente específico da MEC⁷⁰, mas sim a uma mistura dos colágenos I, III e IV no espaço de Disse e ainda o colágeno V aparece como depósitos descontínuos sobre esta rede de colágenos⁶⁴. A marcação no nosso experimento para ambos os colágenos tipos I e III, em localização pericelular está de acordo com esta observação. Diferentes de outros trabalhos em humanos⁶⁴, nossos anticorpos só funcionaram em cortes de congelação e não reagiram para colágeno tipos I e III em material fixado em formalina, o que impossibilita o uso de material do arquivo para avaliação retrospectiva de condições patológicas em bovinos.

Apenas o anticorpo para colágeno tipo I reagiu pela técnica de imunoperoxidase, além da IFI, o que permitiu avaliação e documentação da localização mais precisas. A análise morfométrica teria sido possível se outros tipos de colágeno tivessem sido marcados pela mesma técnica por se tratar de coloração que resiste à temperatura ambiente e ao tempo, ao contrário de IFI.

Uma característica da fibrose hepática é a alteração também no sistema de fibras elásticas¹⁰⁵. Em biópsias de nossos bovinos as fibras elásticas tiveram aumento significativo em M₃, M₄ e M₅, em relação a M₂, mas essas diferenças não foram significativas em relação ao controle. Não houve um aumento progressivo com a gravidade

da fibrose e embora tenha havido um aumento aparente de M_3 para M_4 não houve diferença estatisticamente significativa.

Nas biópsias hepáticas normais de bovinos em M_1 o sistema de fibras elásticas foi observado nas paredes de veias e artérias nos tratos portais, similar a descrição de humanos, babuínos e camundongos⁷³ e estava ausente nos espaços perisinusoidais e em veias hepáticas terminais. Em fígados normais de babuínos é descrita imunomarcagem para estas fibras em veias hepáticas terminais e em camundongos em veias sublobulares e marcação perisinusoidal inespecífica⁷³.

Nas biópsias hepáticas de bovinos com fibrose a partir de M_3 foram observadas finas fibras elásticas entre os feixes de colágeno dos EPs e as fibras das paredes dos vasos apresentavam arranjo irregular, tendo perdido o aspecto cocêntrico dos fígados normais. A partir de M_4 foram observadas fibras elásticas na parede das veias centrolobulares.

Houve correlação positiva significativa entre o aumento de colágeno total e fibra elástica no presente trabalho, embora este aumento de fibras não tenha sido progressivo e nem regular. As alterações de localização e de arranjo das fibras elásticas parecem fatores mais importantes e provavelmente estão associadas às alterações de pressão nas estruturas vasculares do fígado com a progressão da fibrose. Talvez seja por isso que em alguns trabalhos em homem, rato e babuíno o aumento de fibrose não tenha sido associado com aumento de elastina⁷³.

A organização do sistema de fibras elásticas está associada à resistência e às propriedades elásticas do tecido. Trabalhos com microscopia eletrônica demonstram que o polimorfismo estrutural da elastina, organizando-se em quantias relativas diferentes de material amorfo e microfibrilas é uma estratégia usada para atender as necessidades de elasticidade neste órgão em situações diferentes⁷³.

O nosso modelo experimental desenvolveu uma lesão hepática crônica, sem cirrose; por isso talvez não tenhamos observado alteração quantitativa significante do sistema de fibras elásticas quando comparamos M_1 em relação a M_3 , M_4 e M_5 .

O curso da elastogênese na fibrose hepática ao exame histológico compreende dois estádios: o primeiro é a proliferação de fibras finas e o segundo envolve a formação de um sistema de fibras elásticas grossas em casos de lesões mais crônicas. Portanto este segundo evento com aumento significativo do sistema de fibras elásticas ocorrem mais tardiamente em casos de cirrose¹⁰⁵.

Juntamente com o aumento de tecido conjuntivo nos espaços-porta a partir de M_2 observou-se proliferação de células ovais e ao seu lado, a partir de M_3 , houve também

proliferação ductal. Essas células ovais em continuidade com a formação de estruturas ductais são descritas em casos de intoxicações crônicas por espécies de *Senecio* em bovinos^{33;98;18;36;40}, embora elas sejam citadas como células epiteliais dos ductos e não como células ovais.

As células ovais foram primeiro descritas em ratos como sendo derivadas de células circulantes da medula óssea. Baseado em modelos de regeneração hepática após lesão com cancerígenos hoje sabe-se que, apesar da medula óssea poder contribuir com uma parcela dessa população de células, a principal fonte delas é o próprio fígado lesado¹¹⁴. Essas células originam-se dos ductos biliares interlobulares menores e dos canais de Hering que se estendem além do limite da placa limitante e formam ductos arborescentes por entre as células da placa e diferenciam-se em hepatócitos e células epiteliais biliares^{114;115}. Essas células apresentam citoplasma escasso e núcleo ovóide e se expandem das áreas portais para o parênquima hepático¹¹⁵.

Quando há necrose extensa que excede o potencial de reposição celular pelos hepatócitos, as células ovais são ativadas¹¹⁴. Portanto elas não são achados patognomônicos dessas intoxicações, mas sim uma resposta regenerativa do fígado independente da etiologia¹¹⁵.

Além das células ovais, especialmente em regiões peri-portais observamos, no presente estudo, hiperplasia das células dos sinusóides no lóbulo hepático, evidente na Microscopia Óptica a partir de M₃. Esse aumento foi progressivo com o agravamento da lesão e teve correlação positiva estatisticamente significativa com o aumento de colágeno. Essas células estão envolvidas na síntese e degradação da MEC⁸², sendo as CHes consideradas as principais produtoras de matriz em fígados normais e com fibrose^{69;75;104;82}.

Imuno-histoquímica usando anticorpos monoclonais para produtos ou proteínas expressas pelas células sinusoidais é o método de escolha para quantificação destas células em humanos e ratos^{104;78}. Os anticorpos contra desmina e α actina de músculo liso (α -SMA) são considerados bons marcadores para CHes em fígados normais de ratos e humanos, mas alguns autores não obtiveram marcação dessas células em fígados fibróticos do homem, sugerindo que dependendo do estado de ativação destas células pode haver variação na resposta a esses marcadores^{apud78}.

Não há anticorpos marcadores dessas células disponíveis comercialmente na espécie bovina e os testes realizados nos nossos pilotos com anticorpos humanos tiveram resultados negativos. Assim, a quantificação das células sinusoidais foi realizada pela

MET e para tanto foram escolhidas nos cortes semifinos, áreas do lóbulo hepático, evitando-se EP e VC.

As alterações ultra-estruturais iniciais descritas na membrana nuclear dos hepatócitos foram similares às observadas em intoxicação em bovinos por *Senecio oxyphyllus*⁹⁸ e em ovinos por *S. brasiliensis*³⁵. Mitocôndrias dilatadas e corpos mielínicos são achados que indicam agressão celular e podem ocorrer por outras etiologias. Necrose hepatocelular com diferentes estádios de destruição de membranas e de organelas foi também evidenciada, assim como corpos apoptóticos. Alguns hepatócitos demonstraram fagocitose de fragmentos de corpos apoptóticos, provavelmente correspondente a inclusões eosinofílicas vistas à MO e também descritas por outros autores^{102;53}.

No nosso experimento havia aumento de CK de M₂ para M₃, períodos em que a necrose de hepatócitos teve graus de 2 e 3. Esse aumento deve estar associado a fatores citosólicos liberados de hepatócitos necróticos⁷⁸, estando em concordância com a literatura que descreve o aumento coincidente de CK com o aparecimento de marcadores de ativação das CHEs ^{apud4;75}. Estes marcadores são caracterizados por aumento da síntese da matriz, proliferação celular e liberação de retinóide^{117;apud4;80}.

A distinção das células sinusoidais pela MET só foi possível nos 3 primeiros momentos do nosso trabalho. A partir de M₄ havia muitas células com núcleos alongados e hiperplasia de RER, e essa descrição coincide com a relatada para células transicionais originadas de CHEs em casos de lesões hepáticas crônicas de etiologias diversas^{72;71;68;80}. Em M₄ e M₅ essas células predominavam sobre as CK e esta observação está de acordo com Amorim¹¹⁶ (1999) que sugere que há uma diminuição das CK a medida em que a fibrose progride e ocorre a capilarização dos sinusóides.

Nas biópsias de M₁ a M₃, em nossos casos, houve uma diminuição do número de CHEs. Esse achado parece incoerente com a literatura^{71;68;80}, mas resultado semelhante já foi descrito por outros autores e parece ser decorrente da dificuldade em identificar essas células que estão morfológicamente alteradas⁷¹; as gotas lipídicas íntegras ou diminuídas que são sua principal característica de identificação nem sempre estão presentes⁸⁰.

O grande número de células com aspecto de CHEs transicionais, miofibroblastos e fibroblastos foi responsável pelo aumento das células sinusoidais em M₄ e M₅ e houve ainda uma correlação significativa positiva entre o aumento destas células e o aumento de colágeno; isso indica o papel importante das CHEs na produção dos colágenos I e III^{117;4;57;104}. A associação negativa com o número de hepatócitos foi decorrente da perda dos mesmos por necrose ou apoptose devido a ação dos APs.

Um achado que nos chamou a atenção foi que as CHEs das biópsias dos bovinos desde M₁ tinham apenas uma grande gota lipídica. Em momentos subseqüentes houve progressiva redução do número de células contendo gotas lipídicas, não se observando aspectos transicionais como redução dos seus volumes. Há trabalhos relatando o acompanhamento das alterações ultrastruturais das CHEs para células transicionais em fígados com cirrose alcóolica em macacos e humanos baseado em medidas dos volumes ocupados pelas gotas lipídicas no citoplasma dessas células^{71;68}; a redução do número de gotas lipídicas e de seu volume é paralela ao aumento do RER e da produção de colágeno⁸⁰.

Estudos com ultraestrutura de CHEs de fígados normais de diferentes espécies demonstram que, apesar de variações individuais entre essas células quanto ao conteúdo lipídico, a sua quantidade é maior em gatos e gradativamente menor em ratos, cães, porco e homem. Foi observado que porcos têm apenas 1 ou 2 gotas lipídicas gigantes intracitoplasmáticas¹¹⁸ semelhantes às CHEs dos bovinos do nosso experimento. Provavelmente por causa desse aspecto não foi possível avaliar a transformação dessas células através da diminuição do número de gotas como o observado nos experimentos de cirrose alcoólica em humanos e macacos^{71;68}.

Para a produção de componentes da matriz as CHEs são ativadas passando por um processo de transformações de células quiescentes, ricas em vitamina A, para células proliferativas, fibrogênicas e contráteis, com reduzido conteúdo de vitamina A^{4;75}; essas células modificadas fenotipicamente e funcionalmente produzem uma grande variedade de constituintes da matriz¹¹⁷. Após o processo de iniciação da ativação dessas células ocorre a fase de perpetuação, que consiste de proliferação, fibrogênese, contratilidade, degradação da matriz, perda de retinóide, quimioatração de células inflamatórias e liberação de citocinas anti-inflamatórias⁴.

Estudos sugerem que durante a fibrose hepática progressiva tanto a mitose como a apoptose de CHEs aumentam muito, embora predomine a proliferação com aumento numérico dessas células. Durante a recuperação, a apoptose torna-se o processo dominante com diminuição do número de CHEs no fígado^{117;apud79}. Se essas células ativadas mantém a capacidade de retornar ao seu estado de quiescência é uma questão ainda não elucidada⁴.

A diminuição de CEs foi observada em M₃ em relação ao controle. Durante a fibrose hepática o que caracteriza melhor essas células não são alterações em quantidade, mas sim alterações fenotípicas como perda de fenestrações com formação de membrana basal

verdadeira e expressão de substâncias importantes para resolução do processo de fibrose^{78;57}.

Os LAF estavam aumentados em M₂ no nosso trabalho. As alterações fenotípicas nas células sinusoidais em resposta a citocinas criam um micro ambiente que regula ativamente o recrutamento de linfócitos sobre condições patológicas ou fisiológicas⁸⁶. Em cirrose e lesões pré-neoplásicas por CCl₄ em ratos há aumento dessas células confirmando sua importância em lesões hepáticas crônicas e estádios iniciais de carcinogênese⁸⁸.

Está claro que as células dos sinusóides hepáticos, especialmente as CHes ativadas são células chave na produção de um ambiente fibrogênico dentro do fígado, através da combinação de superprodução de componentes da MEC, diminuição da ativação de metaloproteinases (MMPs) e inibição de MMPs ativas pelos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs). Portanto uma completa regressão de fibrose hepática envolveria remodelamento e decomposição desses múltiplos componentes da MEC, sendo particularmente importante para recuperação da histologia normal do fígado¹¹⁷. As fontes celulares das MMPs no fígado ainda não estão completamente elucidadas, mas as CHes, neutrófilos e CK expressam MMPs e TIMPs^{57;75}. Portanto, as variações nas quantidades de colágeno e fibra elástica observadas no nosso modelo de lesão hepática crônica são decorrentes destas capacidade de produção e degradação dos componentes da MEC pelas células sinusoidais hepáticas.

Graças a compreensão da dinâmica da matriz, hoje temos muitas respostas para os mecanismos de fibrose hepática, inclusive com vários modelos de fibrose hepática reversível em ratos. Entretanto a identificação das alterações qualitativas e quantitativas que ocorrem para que a fibrose seja irreversível é uma questão ainda não elucidada^{117;4}. Trabalhos como o nosso são importantes para fornecer parâmetros de normalidades ou em doenças hepáticas para a MEC na espécie bovina. A partir desses parâmetros experimentos com doses menores e avaliações por diferentes períodos de tempo seriam necessários para um melhor acompanhamento das alterações da MEC hepática na espécie bovina nas intoxicações pelos APs.

6. CONCLUSÕES

- O protocolo proposto neste trabalho representa um bom modelo experimental de intoxicação crônica por *S. brasiliensis* para estudar lesões hepáticas em bovinos.
- As lesões hepáticas pelos APs do *S. brasiliensis* seguindo esse protocolo são progressivas e irreversíveis mesmo após a interrupção da administração da planta.
- As lesões veno-oclusivas são similares a de humanos, mas não são o evento mais importante nesta espécie.
- A inflamação parece não ter participação importante no mecanismo de fibrose neste modelo de intoxicação experimental.
- A Imunomarcagem de colágenos em fígados de bovinos normais estabelece parâmetros de normalidade que poderão ser úteis em outros modelos de intoxicação experimental e doenças hepáticas crônicas na espécie.
- A localização dos colágenos pela coloração de Picrosúrio foram compatíveis com a imunolocalização dos colágenos I e III nas biópsias hepáticas normais e com fibrose.
- O fato das CHEs na espécie bovina apresentam apenas uma gota lipídica, dificultou o reconhecimento morfológico dos estádios intermediários de suas ativações.
- A diminuição de CHEs em M₃ foi sucedida por aumento de células sinusoidais totais em M₄ e M₅, sugerindo que muitos dos componentes destas últimas representam células ativadas que perderam a gota lipídica
- A correlação positiva entre o aumento de células sinusoidais totais, principalmente células com aspecto de CHEs ativadas, e o aumento de colágeno indica que na espécie bovina ela é a maior produtora de colágeno.
- A localização e proporções dos colágenos I e III em fígados normais e com fibrose na espécie bovina parece ser similar ao descrito na literatura em ratos e humanos.

7. RESUMO

A matriz extracelular hepática (MEC) é atualmente alvo de diversos estudos em modelos de intoxicação experimental e lesões hepáticas crônicas, devido ao seu papel relevante nesses processos. Na espécie bovina, não existem estudos sobre os componentes da MEC hepática normal e nas lesões crônicas os enfoques têm sido os hepatócitos, com apresentações descritivas das alterações da matriz. Por esse motivo propusemos um modelo iniciando com estudo de fígados normais (controle) obtidos dos animais antes do início da intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis*. Esta planta contém alcalóides pirrolizidínicos (APs), que são substâncias causadoras de lesão hepática crônica progressiva. Este trabalho tem como principais objetivos fazer uma avaliação semi-quantitativa e quantitativa de componentes da MEC de fígado normal e de suas alterações durante a progressão da lesão hepática por intoxicação crônica por APs na espécie bovina. Foram usados 5 animais, intoxicados com folhas dessecadas de *S. brasiliensis* na dose de 0,38g/kg de peso corporal diariamente durante 24 dias. O experimento teve duração de 60 dias e foi dividido em 5 momentos (M_1 = controle; M_2 =15 dias; M_3 = 30 dias; M_4 =45 dias e M_5 =60 dias), nos quais os animais foram submetidos a biópsias hepáticas e colheita de sangue para exames bioquímicos. As biópsias hepáticas foram processadas para MO, Imuno-histoquímica e MET. Como foram observados sinais clínicos digestivos no início da 3ª semana suspendeu-se a administração da planta aos 24 dias. Mesmo assim as lesões foram progressivas, com morte de um animal aos 45 dias. A partir de M_2 havia alterações degenerativas, necrose, apoptose e megalocitose de hepatócitos associadas à fibrose portal, centrolobular e pericelular. Foi feita morfometria por análise de imagem para colágeno total com coloração de Picrossírius e para sistema de fibras elásticas pela técnica de Resorcina Fucsina de Weigert. Observou-se aumento progressivo de colágeno de M_1 a M_5 , com marcação para colágenos dos tipos I e III em todos os compartimentos do fígado; havia alterações também na quantidade, localização e arranjo do sistema de fibras elásticas. À MET havia alterações de membrana nuclear, de organelas, necrose hepatocelular e corpos apoptóticos. As células sinusoidais foram contadas pela MET, verificando-se em M_3 aumento de CK e em M_4 e M_5 aumento de células sinusoidais; muitas destas células eram similares as CHes em transições. As lesões no nosso modelo experimental por *Senecio brasiliensis* em bovinos foram progressivas e irreversíveis, e a fibrose de localização portal foi mais precoce e mais acentuada, seguida de lesões veno-oclusivas e fibrose pericelular. Colágenos tipos I e III são encontrados em todos os compartimentos do

fígado de bovino normal com predomínio do tipo . O aumento progressivo dos colágenos em todos os compartimentos mantém a predominância do tipo I. O aumento do colágeno foi paralelo ao aumento do sistema de fibras elásticas e do número de células sinusoidais totais.

8. ABSTRACT

Extracellular matrix (ECM) has been studied on chronic hepatic lesions of experimental intoxication models due to its relevant role in this pathologic process. Nevertheless there are no specific studies on ECM in normal or chronically damaged bovine liver. Hepatocellular damage has been more important center of attention in chronic bovine liver damage and ECM has been simply described. Because of this fact we decided to present a bovine model starting with detailed study of normal (control) liver biopsy taken from animals before experimental intoxication by *Senecio brasiliensis*. This plant contains pyrrolizidine alkaloids (PA) that causes acute or chronic progressive liver damage. The main objective of this project is to do quantitative and / or semi-quantitative measurement of specific components of normal liver ECM and its change during progressive liver damage when bovines are submitted to chronic PA intoxication. Five animals received 0,38g of dry leaf of *S. brasiliensis* per Kg of body weight orally per day during 24 days. All but one animal were evaluated up to 60th day. Liver biopsy and blood samples were collected on 5 moments (M₁= controle; M₂= 15th day; M₃ = 30th day; M₄=45th day and M₅=60th day). Biopsy samples were processed for light microscopy, immuno-histochemistry and transmission electron microscopy (TEM) at the beginning of the 3rd week some clinical signs indicated digestive complications and we stopped giving toxic plant on 24th day of experiment. Liver lesions were progressive even after that day and one animal died on 45th day. From M₂ on light microscopy showed hepatocellular degenerative changes, necrosis, apoptosis and megalocytosis plus portal, centrilobular and pericellular fibrosis. Morphometric study by analysis of image for total collagen was done using Picrossirius staining and for elastic fiber system was done using Weigert Resorcin Fucsin staining methods. Progressive increase of total collagen from M₁ a M₅ and presence of collagen types I and III were observed in every liver compartment. Changing in location, amount and disposition of elastic fiber system was also observed. Under TEM some hepatocellular nuclear membrane and organelles damage, necrosis and apoptosis were observed. Sinusoidal cells were counted under TEM and significant increase of Kupffer cells in M₃ and total sinusoidal cells in M₄ and M₅ were observed. Many of these latter cells were similar to transitional hepatic stellate cells described by other authors. Liver damage in this experimental model was progressive and irreversible. Earlier and more severe fibrotic lesions were located on portal and peri-portal tract, followed by venoclusive and pericellular lesions. Collagens types I and III are present in every compartment of bovine

normal liver with predominance of type I. Progressive increase of collagen in every compartment does not change the predominance of type I. Increasing of collagen was parallel to the increasing of elastic fibers system and the number of total sinusoidal cells.

9. Referências bibliográficas*

1. Sato M, Kakubari M, Kawamura M, Sugimoto J, Matsumoto K, Ishii T. The decrease in total collagen fibers in the liver by hepatocyte growth factor after formation of cirrhosis induced by thioacetamide. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 681-90.
2. Barros CSL, Driemeier D, Pilati C, Barros SS, Castilho LML. *Senecio* spp. poisoning in cattle in Southern Brazil. *Vet Hum Toxicol* 1992; 34(3): 241-46.
3. Odriozola E, Campero C, Casaro A, Lopez T, Olivieri G, Melucci O. Pyrrolizidine alkaloidosis in argentinian cattle caused by *Senecio selloi*. *Vet Human Toxicol* 1994; 36(3): 205-8.
4. Olaso R, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 1998; 29: 836-47.
5. Ridker PM, Seitaro O, McDermott WV, Trey C, Huxtable RJH. Hepatic venoocclusive disease associated with the consumption of pyrrolizidine-containing dietary supplements. *Gastroenterology* 1985; 88(4): 1050-4.
6. Prakash SA, Pereira TN, Reilly PEB, Seawright AA. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mut Res* 1999; 443: 53-67.
7. Tokarnia CH, Döbereiner J. Intoxicação experimental por *Crotalaria mucronata* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. *Pesq Vet Bras* 1982; 2(2): 77-85.
8. Tokarnia CH, Döbereiner J. Intoxicação experimental por *Crotalaria anagyroides* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. *Pesq Vet Bras* 1983; 3(4): 115-123.
9. World Health Organization. Pyrrolizidine alkaloids. 1988, Geneva
10. Dickinson JO, Cooke MP, King RR, Mohamed PA. Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. *JAVMA* 1976; 169(11): 1192-96.
11. Goeger DE, Cheeke PR, Schmitz JA, Buhler DR. Effect of feeding milk from goats fed tansy ragwort (*Senecio jacobae*) to rats and calves. *Am J Vet Res* 1982; 43(9): 1631-33.
12. Deinzer ML, Thomson PA, Burgett DM, Isaacson DL. Pyrrolizidine alkaloids: their occurrence in honey from Tansy Ragwort (*Senecio jacobaea* L.). *Science* 1977; 195(4277): 497-99.
13. Roulet M, Laurini R, Rivier L, Calame A. Hepatic veno-occlusive disease in newborn infant of a woman drinking herbal tea. *J Pediatr* 1988; 112(3) 433-6.

* Referências bibliográficas apresentadas segundo as normas de Vancouver.

14. Small AC, Kelly WR, Seawright AA, Mattocks AR, Jukes R. Pyrrolizidine alkaloidosis in a two month old foal. *J Vet Med* 1993; A40: 213–8.
15. Hooper PT, Scalan WA. *Crotalaria retusa* poisoning of pigs and poultry. *Aust Vet J* 1977; 53: 109–14.
16. Kvitko K, Gimmler MC. Effects of integerrimine on the implantation and intrauterine development of mice. *Rev Brasil Genet* 1986; 9(3): 439-51.
17. Barri MES, Adam SEI, Omer OH. Effects of *Crotalaria saltiana* on Nubian goats. *Vet Hum Toxicol* 1984; 26(6): 476-80.
18. Méndez MC, Riet-Correa F, Schild AL. Intoxicação por *Senecio* spp. (Compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras* 1987; 7: 51-6.
19. Fox DW, Hart MC, Bergeson PS, Jarret PB, Stillman AE, Huxtable RJ. Pyrrolizidine (*Senecio*) intoxication mimicking Reye syndrome. *J Pediatr* 1978; 93(6): 980–82.
20. Sperl W, Stuppner H, Gassner I, Judmaier W, Dietze O, Vogel W. Reversible hepatic veno-occlusive disease in na infant after consumption of pyrrolizidine-containing herbal tea. *Eur J Pediatr* 1995; 154: 112–6.
21. Huan J-YA, Miranda CL, Buhler DR, Cheeke P. Species differences in the hepatic microsomal enzyme metabolism of the pyrrolizidine alkaloids. *Toxicol Lett* 1998; 99: 127–37.
22. Cheeke PR. A review of the functional and evolutionary roles of the liver in the detoxification of poisonous plants, with special reference to pyrrolozidine alkaloids. *Vet Human Toxicol* 1994; 36(3): 240–47.
23. Blythe LL, Craig AM. Role of the liver in detoxification of poisonous plants. *Vet Human Toxicol* 1994; 36(6): 564–66.
24. Craig AM, Latham CJ, Blythe LL, Schmotzer WB, O'Connor OA. Metabolism of toxic pyrrolizidine alkaloids from tansy ragwort (*Senecio jacobae*) in ovine ruminal fluid under anaerobic conditions. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58(9): 2730–36.
25. Krebs HC, Carl T, Habermehl GG. Pyrrolizidine alkaloid composition in six brazilian *senecio* species. *Phytochemistry* 1996; 43(6): 1227-9.
26. Skaanild MT, Friis C, Brimer L. Interplant alkaloid variation and *Senecio vernalis* toxicity in cattle. *Vet Human Toxicol* 2001; 43(3): 147–51.
27. Wahome WM, Muchiri DJ, Mugeru GM. An acute toxicity study of *Heliotropium scottae rendle* in mice. *Vet Hum Toxicol* 1994; 36(4): 295–7.
28. Bach N, Thung SN, Schaffner F. Confrey herb tea-induced hepatic veno-occlusive disease. *Am J Med* 1989; 87: 97-9.

29. Baron F, Deprez M, Beguin Y. The veno-occlusive disease of the liver. *Haematologica* 1997; 82(6): 718–25.
30. Mohabbat O, Younos MS, Merzad AA, Srivastava RN, Sediq GG, Aram GN. An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in North-Western Afghanistan. *Lancet* 1976; 2(7980): 269-71.
31. Tandon BN, Tandon HD, Tandon RK, Namdranathan M. An epidemic of veno-occlusive disease of liver in Central India. *Lancet* 1976; 2: 271–2.
32. Tandon HD, Tandon BN, Mattocks AR. An epidemic of veno-occlusive disease of the liver. *Am J Gastroenterol* 1978; 70(6): 607–13.
33. Barros CSL, Metzendorf LL, Peixoto PV. Ocorrência de surtos de intoxicação em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras* 1987; 7(4): 101-7.
34. Hill BD, Gaul KL, Noble JW. Poisoning of feedlot cattle by seeds of *Heliotropium europaeum*. *Aust Vet J* 1997; 75(5): 360-1.
35. Ilha MRS, Loretto AP, Barros SS, Barros CSL. Intoxicação espontânea por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em ovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras* 2001; 21(3): 123–38.
36. Noble JW, Crossley JB, Hill BD, Pierce RJ, McKenzie RA, Debritz M, Morley AA. Pyrrolizidine alkaloidosis of cattle associated with *Senecio lautus*. *Aust Vet J* 1994; 17(7): 196-200.
37. Seaman JT. Pyrrolizidine alkaloid poisoning of sheep in New South Wales. *Aust Vet J* 1987; 64(6): 164–7.
38. Seawright AA, Kelly WR, Hrdlicka J, McMahon P, Mattocks AR, Jukes R. Pyrrolizidine alkaloidosis in cattle due to *Senecio* species in Australia. *Vet Rec* 1991; 31: 198-9.
39. Smith RA, Panariti E. Intoxication of Cattle after ingestion of *Senecio subalpinus*. *Vet Hum Toxicol* 1995; 37(5): 478–9.
40. Walker KH, Kirkland PD. *Senecio lautus* toxicity in cattle. *Aust Vet J* 1981; 57: 1–7.
41. Artz J, Mount ME. Hepatotoxicity associated with pyrrolizidine alkaloid (*Crotalaria* spp.) ingestion in a horse on Easter Island. *Vet Human Toxicol* 1999; 4(2): 96-9.
42. Gava A, Barros CSL. *Senecio* pp. Poisoning of horses in southern Brazil. *Pesq Vet Bras* 1997; 17(1): 36–40.
43. Hooper PT, Scalan WA. *Crotalaria retusa* poisoning of pigs and poultry. *Aust Vet J* 1977; 53:109-14.

44. Peckham JC, Sangster LT, Jones OH. *Crotalaria spectabilis* poisoning in swine. JA VMA 1974; 165(7): 633–38.
45. McGrath JPM, Duncan JR. *Crotalaria spectabilis* toxicity in swine characterization of the renal glomerular lesions. J Comp Path 1975; 85: 185–94.
46. Torres MBAM, Salles, MWS, Headley SA, Barros CSL. Intoxicação experimental por sementes de *Crotalaria spectabilis* (Leguminosae) em suínos. Ciência Rural 1997; 27(2): 307-12.
47. Figueredo MLA, Rodriguez J, Alfonso HÁ. Patomorfologia de la intoxicación experimental aguda por *Crotalaria retusa* y *C. spectabilis* en pollos. Rvta Cub Cienc 1987; 18(1y2): 63-71.
48. Nobre D, Dagli MLZ, Haraguchi M. *Crotalaria juncea* intoxication in horses. Vet Human Toxicol 1994; 36(5): 445-48.
49. Tokarnia CH, Döbereiner J. Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (Compositae) em bovinos. Pesq Vet Bras 1984; 4(2): 39–65.
50. Méndez MC, Riet-Correa F, Schild AL, Martz W. Intoxicação experimental por cinco espécies de senecio em bovinos e aves. Pesq Vet Bras 1990; 10(3): 63–9.
51. Molyneux RJ, Johnson AE, Olsen JD, Baker DC. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids from Riddel groundsel (*Senecio riddellii*) to cattle. Am J Vet Res 1991; 52(1): 146–51.
52. Driemeier D, Barros CSL. Intoxicação experimental por *Senecio oxyphyllus* (Compositae) em bovinos. Pesq Vet Bras 1992; 12 (1/20): 33 – 42.
53. Craig AM, Pearson EG, Meyer C, Schmitz JÁ. Serum liver enzyme and histopathologic changes in calves with chronic and chronic-delayed *Senecio jacobae* toxicosis. Am J Vet Res 1991; 52(12):1969-78.
54. Martinez-Hernandez A. The hepatic extracellular matrix. II. Electron immunohistochemical studies in rats with CCl4-induced cirrhosis. Lab Invest 1985; 53(2): 166-86.
55. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. The Faseb Journal. v. 9, p. 1401 – 1410, 1995.
56. Martinez-Hernandez A, Delgado FM, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. Location of collagen types I, III, IV, laminin and fibronectin. Lab Invest 1991; 64(2): 157-66.
57. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaran R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. Sem Liv Diseas 2001; 21(3): 351-72.

58. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver. *Archiv A Pathol Anat* 1993; 423: 1 –11.
59. Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. Molecular biology of the cell. 3 ed. In: cells junctions, cell adhesion, and the extracellular matriz. New York & London: Garland Publishing, 1994: 949-1009.
60. Myllyharju J, Kivirikko, KI. Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med* 2001; 33(1): 7-21.
61. Brown JC, Timpl R. The collagen superfamily. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107: 484-90.
62. Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Inter* 1996; 20(1): 15-27.
63. Clement B, Grimaud JA, Campion JP, Deugnier I, Guillouzo A. Cell types involved in collagen and fibronectin production in normal and fibrotic humanliver. *Hepatology* 1986; 6(2): 225-34.
64. Grimaud JA, Druguet M, Peyrol S, Chevalier O, Herbage D, El Badrawy N. Collagen immunotyping in human liver: light and eletronic microscope study. *J Histochem and Cytochem* 1980; 28(11): 1145-56.
65. Loreal O, Clément B, Schuppan D, Rescan PY, Rissel LM, Guillouzo A. Distribution and cellular origin of collagen VI during development and in cirrhosis. *Gastroenterology* 1992; 102: 980-87.
66. Rojkind M, Giambrone MA, Biempica L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology.v* 1979; 76(4): 710-19.
67. Seyer JM, Hutcheson ET, Kang, AH. Collagen polymorphism in normal and cirrhotic human liver. *The J Clin Inv* 1977; 59: 241-48.
68. Mak KM, Lieber C. S. Lipocytes and transitional cells in alcoholic liver disease: a morphometric study. *Hepatology* 1988; 8(5): 1027-33.
69. Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissel DM. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Med Scienc* 1985; 82: 8681-85.
70. Martinez-Hernandez A. The hepatic extracellular matrix. Electron immunohistochemical studies in normal rat liver. *Lab Invest* 1984; 51(1): 57-74.
71. Mak KM, Leo MA, Lieber CS. Alcoholic liver injury in baboons: transformation of lipocytes to transitional cells. *Gastroenterology* 1984; 87:188-200.
72. Benyon R, Chistopher A, Michael JP. Mechanisms of hepatic fibrosis. *J Ped Gastroenterol Nutr* 1998; 27(1): 75-85.

73. Porto LC, Chevalier M, Peyrol S, Guerret S, Grimaud JÁ. Elastin in human, baboon, and mouse liver: an immunohistochemical and immunoelectron microscopic study. *Anatomical Record* 1990; 222: 392 - 404.
74. Monte A, Costa A, Porto LC. Distribution of elastic system fibres in human fetal liver. *J Anat* 1996; 188: 645-50.
75. Sokol, RJ. Liver cell injury and fibrosis. *J Pediatric Gastroenterol Nutrit* 2002; 35(1):S7-S10.
76. Benyon RC, Arthur MJP. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Seminars in liver disease* 2001; 21(3): 373-84.
77. Iredale JP. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Seminars in liver disease* 2001; 21(3): 427-36.
78. Burt AD, Le Bail B, Balabaud C, Bioulac-Sage P. Morphologic Investigation of sinusoidal cells. *Seminars in Liver Disease* 1993;13 (1): 21-38.
79. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Sem Liver Dis* 2001; 21(3): 311-35.
80. Shiratori Y, Tanaka M, Kawase T, Shiina S, Komatsu Y, Omata M. Quantification of sinusoidal cell function in vivo. *Seminars in Liver Disease* 1993; 13 (1): 39-49.
81. Calés P. Apoptosis and liver fibrosis: antifibrotic strategies. *Biomed & Pharmacother* 1998;52: 259-63.
82. Tanikawa, K. Stellate cell, endothelial cell and Kupffer cell - their role in liver fibrosis. *J Gastroenterology and Hepatology* 1999; 14: A281-82.
83. Winwood PJ, Arthur MJP. Kupffer cells: their activation and role in animal models of liver injury and human liver disease. *Seminars in liver disease* 1993; 13(1):50-9.
84. Grinko I, Geerts A, Wisse E. Experimental biliary fibrosis correlates with increased numbers of fat-storing and Kupffer cells, and portal endotoxemia. *J Hepatol* 1995; 23: 449-58.
85. Yamate J, Tatsumi M, Nakatsuji S, Kuwamura M, Kotani T, Sakuma S. Immunohistochemical observations of macrophages and perisinusoidal cells in carbon tetrachloride-induced rat liver injury. *J Vet Med Sci* 1993; 55(6): 973-77.
86. Winnock M, Barcina MG, Lukomska B, Bioulac-Sage P, Balabaud C. Liver-associated lymphocytes: role in tumor defense. *Sem Liv Diseas* 1993; 13(1): 81-92.
87. Crispe N, Mehal WZ. Strange brew: T cells in the liver. *Imunology Today* 1996; 17(11): 522-25.

88. Takashi T, Shimizu Y, Higuchi K, Watanabe A. Effect of branched-chain amino acids on the composition and cytolytic activity of liver-associated lymphocytes in rats. *Gastroenterol and hepatol* 2000; 15(8): 849-59.
89. Kaneko J J, Harvey JW, BRUSS ML. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5^a ed. San Diego: Academic Press, 1997.
90. Meyer DJ, Harvey JW. *Veterinary laboratory medicine: interpretação & diagnóstico*. 2^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1998.
91. Medeiros MBA, Souza FF, Neto PIS, Coelho KIR. Técnica de biópsia hepática guiada pelo ultra-som em bezerros. *Rev Educ Cont CRMV-SP* 2002; 5(1): 94-99.
92. Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol* 1997; 25(1):82-88.
93. Levin S, Bucci TJ, Cohen SM, Fix AS, Hardisty JF, Legrand EK, Maronpot RR, Trump BF. The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol Pathol* 1999; 27(4): 484-90.
94. Montes GS. Distribution of oxytalan, elaunin and elastic fibres in tissues. *Ci Cult J Braz Assoc Sci* 1992; 44:224-33.
95. James J, Bosch KS, Aronson DC, Houtkooper JM. Sirius Red histophotometria and spectrophotometry of sections in the assessment of the collagen content of liver tissue and its applications in growing rat liver. *Liver* 1990; 10: 1 - 5.
96. Hsu SM, Raine L, Fanger N. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29:577-80.
97. Mendel VE, Witt MR, Gitchel BS, Gribble DN, Rogers QR, Segal HJ, Knight HD. Pyrrolizidine alkaloid-induced liver disease in horses: an early diagnosis. *Am J Vet Res* 1988; 49(4): 572-78.
98. Driemeier D. Intoxicação experimental por *Senecio oxyphyllus* (Compositae) em bovinos (dissertação). Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 1990.
99. Jonhson AE, Smart RA. Effects on cattle and their calves of tansy ragwort (*Senecio jacobae*) fed in early gestation. *Am J Vet Res* 1983; 44(4): 1215-19.
100. Curran JM, Sutherland RJ, Peet RL. A screening test for subclinical liver disease in horse affected by pyrrolizidine alkaloid toxicosis. *Aust Vet J* 1996; 74(3): 236-40.
101. Lang M, Pelkonen O. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. In: Vineis P, Malats N, Lang M, D'Errico A, Caparaso N, Cuzich J, Boffeta P. *Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer*. Lyon: IARC Scientific Publications n.148, 1999:13-22.

102. Feldmann G. Liver apoptosis. *J Hepatol* 1997; 26(2): 1-11.
103. De Leve L, Shulman HM, McDonald GB. Toxic injury to hepatic sinusoids: sinusoidal obstruction syndrome (veno-occlusive disease). *Seminars in Liver Disease* 2002; 22(1): 27-38.
104. Takahara T, Kojima T, Miyabayashi C, Kyoichi I, Sasaki H, Muragaki Y, Ooshima A. Collagen production in fat-storing cells after tetrachloride intoxication in the rat. Immunoelectron microscopic observation of type I, type III collagens, and prolyl hydroxylase. *Lab Invest* 1988; 59(4): 509-521.
105. Sato S, Adachi A, Wakamatsu K. Abnormal elastic system fibers in fibrotic human liver. *Med Electron Microsc* 2000; 33: 135-142.
106. Masako S, Ichiro S, Mitugi Y, Kunio L, Susumu I. Expression of type I and type III collagens during the course of dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Liver* 1998; 18(3): 196-204.
107. Gordon GJ, Coleman WB, Crisham JW. Bax-mediated apoptosis in the livers of rats after partial hepatectomy in the retrorsine model of hepatocellular injury. *Hepatol* 2000; 32(2): 312-20.
108. Junqueira LCU, Cossemelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histo Jpn* 1978; 41:267—74.
109. Junqueira LCU, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochem* 1982; 74:153-56.
110. Montes GS, Junqueira LCU. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991;86(Suppl.III): 1-11.
111. Barbosa Jr AA. Morphological computer-assisted quantitative estimation of stained fibrous tissue in liver sections: applications in diagnosis and experimental research. *J Bras Patol* 2001; 37(3):197-200.
112. Biempica L, Morecki R, Wu CH, Giambone M-A, Rojkind M. Immunocytochemical localization of type B collagen. *Am J Pathol* 1980; 98(3):591-602.
113. Kage M, Shimamatu K, Nakashima E, Kojiro M, Inoue O, Yano M. Long-term evolution of fibrosis from chronic hepatitis to cirrhosis in patients with hepatitis C: morphometric analysis of repeated biopsies. *Hepatol* 1997; 25(4): 1028-31.
114. Alisson MR, Poulsom R, Forbes SJ. Update on hepatic stem cells. *Liver* 2001;21:367-373.

-
- 115.Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells in liver regeneration. *Faseb J* 1996; 10:1249-1256.
 - 116.Amorim LFS. Hepatite sífilítica congênita: estudo semi-quantitativo e quantitativo da fibrose e das células de Kupffer.(dissertação). Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 1999.
 - 117.Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Int J Gastroenterol Hepatol* 2000; 46(4):443-46.
 - 118.Bartok I, Jeannette T, Remenar E, Virágh SZ. Ultrastructure of the hepatic perisinusoidal cells in man and mammalian species. *Anat Rec* 1979; 194: 571-86.