

# VASCULARIZAÇÃO NA CIRROSE HEPÁTICA: estudo imunoistoquímico baseado em necropsias

Mariane de Fátima Yukie **MAEDA**, Camilla Duarte **SILVA**, Leila Suemi **HARIMA**, Luiz Fernando Ferraz da **SILVA**, Bruno **CTENAS** e Venâncio Avancini Ferreira **ALVES**

**RESUMO** – *Racional* - O processo patológico mais discutido na gênese da cirrose hepática é a fibrose progressiva, porém alterações na vasculatura do órgão têm sido apontadas como elementos fundamentais na fisiopatologia da doença e de suas complicações, como hipertensão portal, insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular. *Objetivo* - Avaliar a densidade microvascular em 35 casos de necropsias de pacientes com cirrose hepática mediante pesquisa imunoistoquímica do marcador endotelial CD34 a fim de comparar os informes obtidos mediante semi-quantificação com aqueles registrados por método quantitativo morfométrico, além de relacionar as alterações vasculares encontradas com os principais agentes causais, padrões de lesão e complicações clínicas da doença. *Métodos* - Foram estudados 35 casos de cirrose obtidos retrospectivamente de necropsias realizadas no SVOC/USP no período de março de 2002 a junho de 2003. Os casos foram reagrupados segundo padrão anatomopatológico em esteatohepatite e hepatite crônica. A microvasculatura foi avaliada através da reação imunoistoquímica com anticorpo anti-endotélio clone CD34, QBend. *Resultados* - Observou-se associação significativa entre a abordagem semi-quantitativa e a quantificação morfométrica da densidade de vasos no parênquima, o mesmo não ocorrendo no septo. Não foram detectadas associações específicas entre a neovascularização e os tipos de complicação da hepatopatia aqui estudados. O principal achado foi que a neoformação vascular no parênquima é significativamente maior nas cirroses associadas a hepatites crônicas do que nas esteatohepatites. *Conclusão* - Todos esses achados requerem necessários estudos clínicos para avaliar a hipótese de que o estudo do rearranjo da microcirculação hepática, através de marcadores como o CD34, pode ser fator prognóstico em pacientes cirróticos.

**DESCRIPTORIOS** – Cirrose hepática. Hepatite crônica. Fígado gorduroso. Antígenos CD34.

## INTRODUÇÃO

A cirrose é hoje uma das principais causas de morte no mundo ocidental, contabilizando cerca de 27.000 mortes nos EUA em 2004 e mais de 228.145 anos potenciais de vida perdidos<sup>(6)</sup>. No Estado de São Paulo registrou-se, em 2002, mortalidade de 10,31 por 100.000 habitantes, principalmente na faixa dos 50 aos 59 anos<sup>(4)</sup>. O paciente com cirrose alcoólica perde, em média, 12 anos de vida produtivos, mais do que aqueles com cardiopatias (2 anos) e neoplasias (4 anos)<sup>(6)</sup>.

O processo patológico mais discutido da cirrose é a fibrose progressiva. Trabalhos precedentes<sup>(1,3,8,31,37)</sup> têm mostrado que a fibrose, antes tida como processo irreversível e determinante na evolução e complicações clínicas da cirrose, pode regredir com o tempo, estabelecendo-se um modelo em que fatores adicionais estariam envolvidos na progressão da doença. As alterações na micro e macrovasculatura do órgão têm sido apontadas como elementos fundamentais na fisiopatologia da doença, incluindo lesões como a capilarização dos sinusóides<sup>(29,32,38)</sup>, a formação de desvios (“shunts”) anastomóticos pré e pós-sinusoidais e a perda de ramos da veia porta.

A capilarização dos sinusóides envolve desde alterações no endotélio vascular, como perda de fenestrações e depósitos na membrana basal<sup>(39)</sup>, até mudanças nas interações célula-célula e célula-matriz nos sinusóides hepáticos<sup>(7,32)</sup>. Na transformação neoplásica do fígado, uma das principais complicações da cirrose, observa-se que a capilarização dos sinusóides pode ser parte inicial de processo, no qual nódulos displásicos passam a receber suprimento predominantemente arterial, padrão vascular dominante no carcinoma hepatocelular (CHC), o que indica possível relação do desenvolvimento anômalo da microvasculatura com a evolução para um processo neoplásico<sup>(30)</sup>.

As alterações vasculares do fígado cirrótico têm despertado crescente interesse, mas ainda pouco se sabe sobre sua relação com as principais complicações, como a hipertensão portal, insuficiência hepática e o carcinoma hepatocelular e, a partir daí, sua implicação prognóstica, evidenciando-se então, a necessidade de caracterização mais detalhada de aspectos arquiteturais e celulares dessas alterações. Além disso, não se encontrou na literatura revista padronização de métodos para a quantificação da microvasculatura do fígado cirrótico, levando a uma

Trabalho realizado no LIM14 – Laboratório de Investigação Médica em Patologia Hepática, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.  
Correspondência: Dra. Mariane de Fátima Yukie Maeda – Rua Apinagés, 543 – apt. 71 – 05017-000 – São Paulo, SP. E-mail: mariane\_maeda@yahoo.com.br

dificuldade tanto na caracterização das estruturas quanto na comparação dos resultados obtidos nos diferentes estudos.

Entre os vários procedimentos descritos para o estudo da arquitetura vascular hepática, destaca-se a marcação imunoistoquímica das células endoteliais. O antígeno CD34 é importante marcador de células endoteliais, presente, segundo FINA et al.<sup>(14)</sup>, nos capilares da maioria dos tecidos, não sendo demonstrado no endotélio sinusoidal normal, mas tornando-se visível nos sinusóides capilarizados, inclusive na neoangiogênese dos nódulos displásicos<sup>(30)</sup>. Na literatura disponível, não se encontrou comparação da sensibilidade da detecção do CD34 com outros marcadores endoteliais como fator VIII, CD31 ou lectina de *Ulex europeus* na demonstração da capilarização de sinusóides hepáticos, mas HOLLINGSWORTH et al.<sup>(19)</sup> e TANIGAWA et al.<sup>(34)</sup>, estudando ovário e estômago, respectivamente, observaram maior número de vasos corados com o anticorpo anti-CD 34 do que com o anti-fator VIII, mostrando ser a detecção do CD34 abordagem mais sensível e com melhores resultados, tanto funcional quanto morfológicamente.

O objetivo deste estudo foi avaliar, em fígados de necropsias, a densidade da microvasculatura do fígado cirrótico através da imunoistoquímica com anticorpo anti-endotélio CD34 a fim de comparar os informes obtidos mediante semi-quantificação em graus com aquelas registradas por método quantitativo morfométrico, no intuito de relacionar as alterações vasculares encontradas com os principais agentes causais, com os padrões de lesão e com as complicações clínicas da doença.

## MÉTODOS

### Pacientes

O presente estudo foi desenvolvido através da análise de 35 casos selecionados retrospectivamente<sup>(20)</sup> de necropsias realizadas no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC/USP), São Paulo, SP, no período de março de 2002 a junho de 2003. Para cada caso foram colhidos os dados clínicos, exames laboratoriais, características macroscópicas e laudo final de autópsia.

Foram incluídos pacientes com diagnóstico de cirrose hepática de qualquer causa e idade superior a 20 anos. Foram excluídos da casuística, fígados de pacientes com história prévia ou diagnosticada em autópsia de lesão por esquistossomose, bem como casos em que a amostragem histológica disponível apresentava apenas o tecido hepático neoplásico ou peritumoral, já que essas regiões não representariam o padrão microvascular do fígado cirrótico como um todo.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 28 de julho de 2005 - Protocolo de Pesquisa n° 582/05.

### Agrupamento de casos

#### *Padrão anatomopatológico*

Todos os casos selecionados para o estudo foram analisados quanto ao padrão anatomopatológico e classificados em dois grandes grupos: o de cirroses associadas a hepatites crônicas e o daquelas associadas às esteatohepatites, conforme os seguintes critérios:

- Esteatohepatites: englobam esteatose macro e microvascular, fibrose perivenular, balonização e necrose de hepatócitos em áreas centrolobulares, infiltrado inflamatório e número variável de hepatócitos com material hialino denso e acidófico em seu citoplasma (hialino de Mallory). Macroscopicamente são relatadas como mais frequentemente associadas a cirroses micronodulares. O desenvolvimento de esteatohepatite relaciona-se frequentemente ao etilismo crônico, podendo também se associar a outras causas como diabetes mellitus, dislipidemias e obesidade<sup>(5, 17, 23)</sup>.
- Hepatites crônicas: o diagnóstico histológico se aplica aos quadros de comprometimento difuso do fígado por infiltrado inflamatório portal, predominantemente linfocitário, com quantidade variável de histiócitos e plasmócitos concomitantes. Além das alterações portais, existem ainda graus variáveis de lesões parenquimatosas. As formas mais frequentes são as hepatites crônicas virais (VHB e VHC), hepatites auto-imunes, hepatites crônicas por drogas e os distúrbios genéticos, como a doença de Wilson<sup>(16, 35)</sup>.

Os casos apresentando concomitância de marcadores histológicos dos dois padrões foram classificados de acordo com as características predominantes.

Apenas 1 dos 35 casos não pôde ser classificado, mesmo após a avaliação dos dados clínicos disponíveis quanto ao processo etiológico da cirrose, por apresentar características de ambos os grupos de maneira equivalente.

#### *Análise sorológica*

Entre os pacientes previamente internados no Hospital das Clínicas da FMUSP (HC-FMUSP) e cujos dados do prontuário estavam disponíveis, foi anotado o resultado da pesquisa de AgHBs, indicando infecção presente pelo VHB, e anti-VHC, marcador indireto de infecção pelo VHC. Na ausência destes dados do prontuário, a pesquisa de antígeno AgHBs no tecido hepático foi efetuada pelo sistema imunoistoquímico da streptavidina-peroxidase (LSAB+, Dako, EUA).

#### *Ingestão alcoólica*

A presença de ingestão alcoólica foi pesquisada nos dados do prontuário, quando disponível, ou através de entrevista realizada pelos profissionais do SVOC-SP com os familiares dos indivíduos necropsiados, como procedimento padrão do serviço. Considerou-se etilismo a ingestão média diária acima de 40 g de álcool etílico para homens e de 20 g para mulheres, conforme preconizado por COATES et al.<sup>(9)</sup>.

#### *Análise da ocorrência de complicações do processo cirrótico:*

A ocorrência de complicações da cirrose foi pesquisada no prontuário, no caso de pacientes previamente internados no HC-FMUSP, ou através do atestado de óbito, no caso de pacientes que não dispunham de prontuário médico. Para tais comparações, foram excluídos os casos nos quais não foi possível esclarecer tal ocorrência.

## Histologia

Cortes histológicos de 4  $\mu\text{m}$  do material coletado previamente fixado em solução de formalina a 10% e incluído em parafina foram corados pelos métodos da hematoxilina e eosina, tricrômico de Masson, impregnação pela prata pelo método de Gomori e reação pelo Picro-Sirius<sup>(21, 22)</sup> para avaliação de matriz extracelular, além da coloração de Perls para pigmentos.

Também foram preparadas lâminas para realização da reação imunoistoquímica com anticorpo dirigido contra o antígeno endotelial, clone CD34<sup>(13, 18, 27)</sup>, clone Q-Bend (Dako, EUA), (com amplificação pelo sistema streptavidina-peroxidase LSAB+, Dako, EUA), com objetivo de identificar células endoteliais, quer em artérias ou veias pré-existentes, quer em vasos septais neoformados. Tal reação demonstra também, com especial precisão, o delineamento contínuo de endotélio nos sinusóides capilarizados.

## Análise semi-quantitativa

A análise semi-quantitativa dos vasos foi feita atribuindo-se graus de 0 a 4 (ausente, quantidade muito pequena, pequena, moderada e abundante) por dois observadores diferentes em cada caso.

## Quantificação

A análise quantitativa dos vasos foi feita por meio de contagem manual realizada por cinco observadores instruídos de maneira equivalente. Em cada lâmina foram analisados 15 campos aleatórios, utilizando objetivas de 20x (aumento total de 200x) de cada um dos compartimentos definidos (septo e parênquima). Os valores encontrados foram divididos em quartis e submetidos a análise estatística.

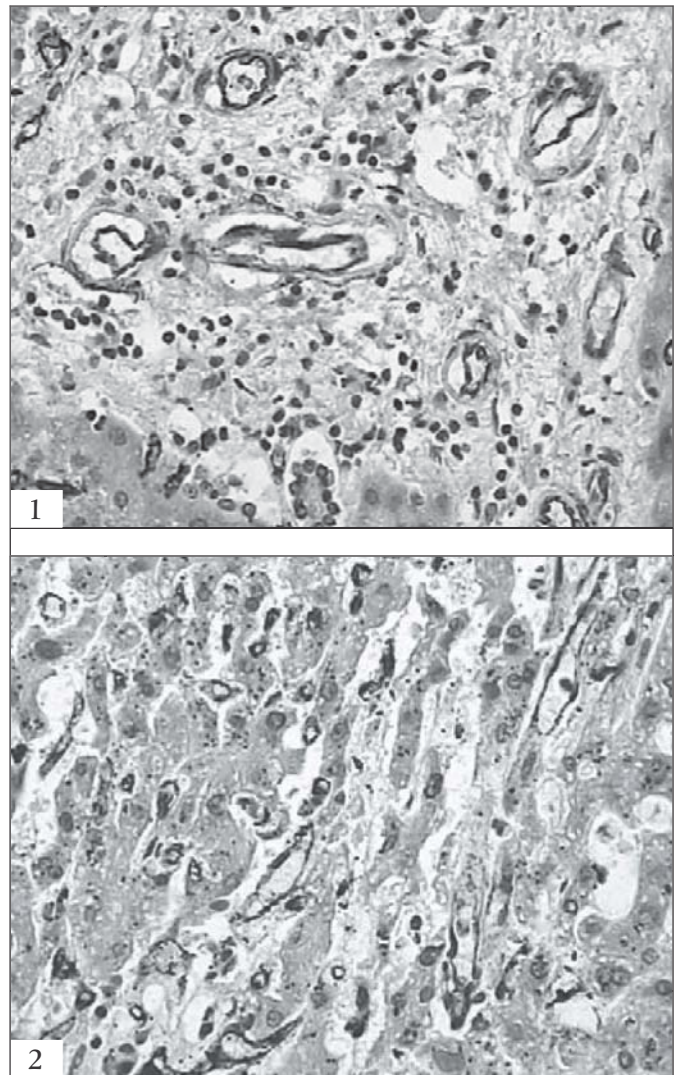
## Avaliação imunoistoquímica da vascularização

Em cada caso foram analisados 15 campos aleatórios sob aumento total de 200x, sendo analisados de modo compartimentalizado os septos, onde foram pesquisados neovasos e a região do parênquima hepático, onde foram pesquisados os sinusóides capilarizados. Foram adquiridas imagens digitais através de uma câmera JCV TK-C1380 Color Vídeo - câmera acoplada a um microscópio Leica DMR e realizada a análise morfométrica computadorizada de imagens utilizando-se o software Image Pro Plus<sup>®</sup> 4.1.

A densidade dos vasos foi expressa como a razão entre o número de vasos corados e a área total dos septos ou parênquimas mensurados ( $\text{vasos}/\mu\text{m}^2$ ). Foi analisada ainda a contagem do número de vasos presentes em cada um dos campos analisados (Figuras 1 e 2)

## Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise estatística utilizando o Software SPSS 13.0 (SPSS inc<sup>®</sup>). Os dados quantitativos foram avaliados utilizando-se o teste *t* de Student ou Mann-Whitney na dependência de se mostrarem paramétricos ou não. Os dados categóricos e semiquantitativos foram avaliados através do teste do Qui ao quadrado ( $\theta^2$ ). Correlações diretas foram obtidas através do coeficiente de correlação de Pearson ou Spearman, na dependência da distribuição da amostra. Foi estabelecido o nível de significância estatística para  $P < 0,05$ .



FIGURAS 1 e 2. Fotomicrografia de fígado cirrótico mostrando a neoformação de vasos nos septos fibrosos (1) e a exuberante capilarização de sinusóides na região do parênquima (2) (CD 34, streptavidina-biotina-peroxidase, x200)

## RESULTADOS

### 1) Caracterização da casuística

O estudo teve por base 35 casos, 27 (77,14%) do sexo masculino, sendo a média de idade de 57,6 anos.

A padronização anatomopatológica definiu os grupos das hepatites crônicas (22 casos ou 62,86%) e das esteatohepatites (12 casos ou 34,28%) (Figura 3). Apenas um caso (2,86%) não foi alocado em qualquer destes grupos por apresentar equitativamente características de ambas as classes. Dentre estes casos, apenas aqueles cujos dados clínicos e epidemiológicos puderam ser levantados foram incluídos nas análises descritas a seguir.

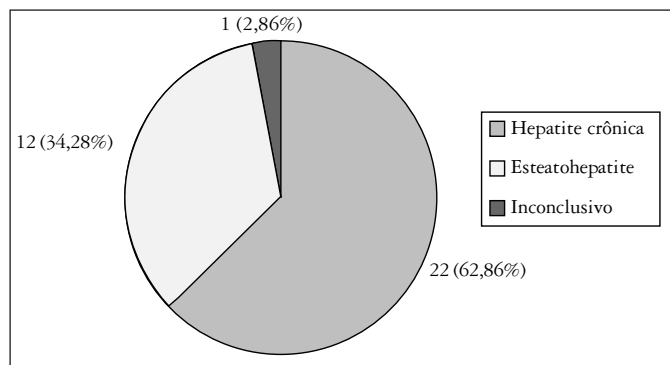


FIGURA 3. Distribuição dos 35 casos conforme padrão anatomopatológico

Em 24 casos foi possível obter informes sorológicos, sendo que destes, 12 (50,00%) mostraram-se positivos para VHC, 1 dos quais com co-infecção pelo VHB. Infecção exclusiva pelo VHB foi detectada em 2 casos (8,33%) e os 10 restantes (41,67%) mostraram-se negativos. Os 11 casos sem dados sorológicos foram previamente testados para a presença do AgHBs no tecido por imunohistoquímica, todos com resultados negativos.

Dezesseis casos (47,06%) apresentavam história positiva para etilismo, 16 (47,06%) história negativa, não tendo sido possível a obtenção deste informe em 2 casos (5,88%).

Entre os casos previamente selecionados, foram encontrados macronódulos em 22 casos (62,86%), sendo 8 diagnosticados como nódulos macroregenerativos ou como nódulos displásicos e 13 como carcinomas hepatocelulares. Achado digno de nota foi o encontro de um caso de colangiocarcinoma, em paciente com cirrose associada à esteatohepatite. Em um dos casos de CHC, surpreendeu-se a concomitância de carcinoma epidermóide de base de língua metastático no fígado cirrótico.

A análise conjunta dos prontuários e da necropsia permitiu o estudo de complicações da cirrose em 29 casos. Destes, a hipertensão portal isolada ocorreu em 8 casos (27,59%) e a insuficiência hepatocelular isolada em 5 casos (17,24%). Havia registro de ambas em 12 casos (41,38%), estando ausentes em outros 4 casos (13,79%) (Figura 4). Para os casos que não apresentavam sinais de hipertensão portal ou insuficiência hepatocelular no momento do óbito, as causas de morte foram broncopneumonia (dois casos) e sepse (dois casos, sendo um decorrente de apendicite supurada e outro de pancreatite aguda necrohemorrágica).

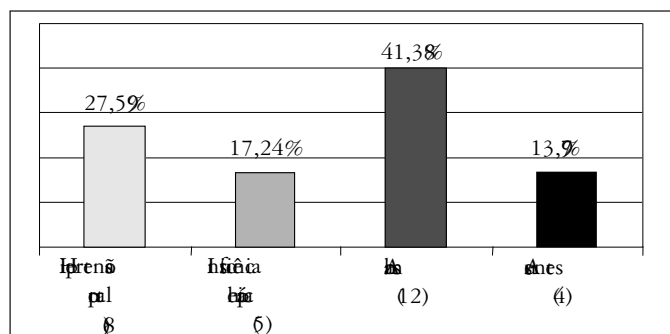


FIGURA 4. Distribuição dos 29 casos conforme complicações clínicas da cirrose

## 2) Análise conjunta dos dados referentes ao parênquima

A quantidade de vasos no parênquima em 15 campos de 200x, apresentou mediana de 4,03 (0,20-9,20), sendo que sua densidade (número de vasos corrigido pela área de parênquima analisada) teve mediana de  $7,01 \times 10^{-5}$  vasos /  $\mu\text{m}^2$  ( $0,37 \times 10^{-5}$  -  $17,59 \times 10^{-5}$ ).

Houve correlação direta significativa ( $P = 0,032$ ) entre a semiquantificação dos vasos pelo CD 34 e o estudo morfométrico da densidade de vasos do parênquima hepático. Entretanto, a correlação entre a semiquantificação dos vasos com o número absoluto esteve no limite da significância estatística ( $P = 0,072$ ) (Figura 5).

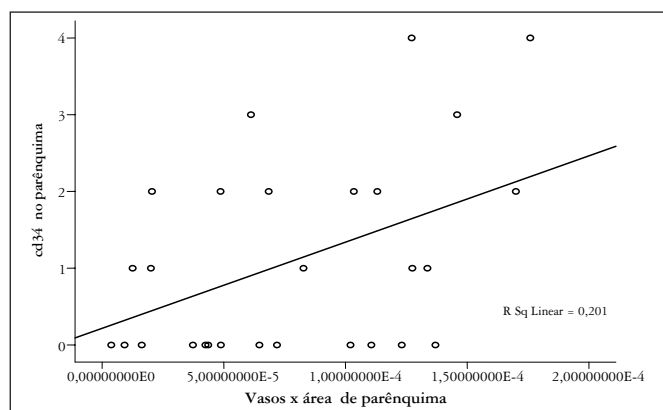


FIGURA 5. Correlação entre a semiquantificação dos vasos no parênquima mediante imunoe expressão de CD34 e a densidade vascular analisada por morfometria

Dentre os casos estudados, 25 possuíam alguma complicação relacionada à cirrose. Estes casos foram correlacionados com os dados semiquantitativos do CD 34 no parênquima hepático, não tendo sido observado nenhum resultado significativo. Procurou-se, então, estabelecer correlação entre a densidade e o número absoluto de vasos do parênquima com alguma das complicações e com cada uma delas individualmente, não tendo sido encontrado nenhum resultado significativo (Tabela 1).

TABELA 1. Análise comparativa entre o número e densidade de vasos no parênquima com o padrão morfológico das cirroses e com as principais complicações clínicas

		Número de vasos			Densidade de vasos		
		Mediana	Min/Máx	P	Mediana	Min/Máx	P
Padrão anatomopatológico	Hepatite crônica	7,33	1,67/5,60	0,117	$1,9 \times 10^{-4}$	$0,379 \times 10^{-4}$ / $3,09 \times 10^{-4}$	0,105
	Esteatohepatite	6,07	0,2/8,6	0,117	$1,5 \times 10^{-4}$	$0,112 \times 10^{-4}$ / $2,08 \times 10^{-4}$	0,105
Complicações da cirrose	Insuficiência hepática	1,67/12,93	0,956	0,956	$7,0 \times 10^{-5}$	$0,373 \times 10^{-5}$ / $17,5 \times 10^{-5}$	0,569
	Hipertensão portal	6,8	3,47/15,6	0,633	$1,7 \times 10^{-4}$	$0,7 \times 10^{-4}$ / $2,60 \times 10^{-4}$	0,545

### 3) Análise conjunta dos dados referentes aos septos

A análise dos septos demonstrou que a mediana da quantidade de vasos neste segmento foi de 6,67 (0,20-15,60), enquanto sua densidade foi de  $16,44 \times 10^{-5}$  vasos / $\mu\text{m}^2$  ( $0,11 \times 10^{-5}$ -  $30,97 \times 10^{-5}$ ).

De modo similar aos achados encontrados no parênquima, os elementos semiquantitativos dos septos fibrovasculares demonstraram correlação direta estatisticamente significativa apenas com o número absoluto de vasos ( $P = 0,013$ ), mas não com a densidade ( $P = 0,102$ ) (Figura 6).

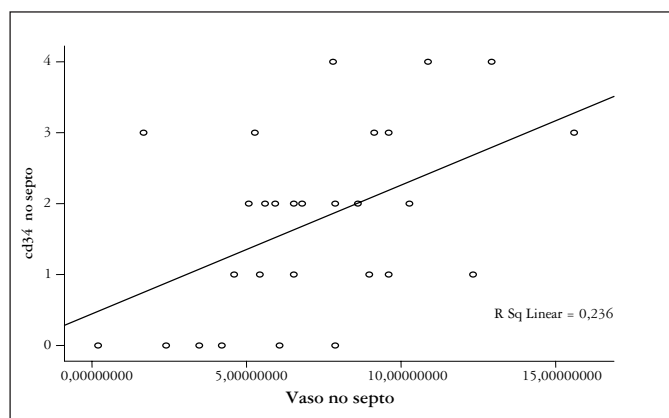


FIGURA 6. Correlação entre a semiquantificação dos vasos no septo mediante imunoexpressão de CD34 e a densidade vascular analisada por morfometria

Os casos com alguma complicação também não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados às seguintes variáveis nos septos fibrovasculares: análise semiquantitativa pelo CD 34, densidade e número absoluto de vasos. Cada uma destas complicações ainda foi correlacionada individualmente com o número absoluto e a densidade de vasos dos septos, não tendo sido encontrado nenhum resultado significativo (Tabela 2).

TABELA 2. Análise comparativa entre o número e densidade de vasos nos septos com o padrão morfológico das cirroses e com as principais complicações clínicas

		Número de vasos			Densidade de vasos		
		Mediana	Min/Máx	P	Mediana	Min/Máx	P
Padrão anatomopatológico	Hepatite crônica	5,66	0,20/9,20	0,016	$10,27 \times 10^{-5}$	$3,73 \times 10^{-5}$ / $17,6 \times 10^{-5}$	0,016
	Esteatohepatite	2,33	0,67/5,93	0,016	$4,36 \times 10^{-5}$	$0,921 \times 10^{-5}$ / $11,1 \times 10^{-5}$	0,016
Complicações da cirrose	Insuficiência hepática	4,6	0,67/7,80	0,351	$8,69 \times 10^{-5}$	$1,25 \times 10^{-5}$ / $14,5 \times 10^{-5}$	0,612
	Hipertensão portal	5,47	2,00/9,20	0,545	$2,0 \times 10^{-5}$	$0,3 \times 10^{-5}$ / $14,4 \times 10^{-5}$	0,163

### 4) Comparação da neovascularização nas cirroses originadas em esteatohepatites ou em hepatites crônicas

Os casos de cirrose previamente agrupados conforme originados em hepatite crônica ou em esteatohepatite foram comparados entre si em relação ao número e a densidade de vasos no parênquima e nos septos.

No parênquima, houve densidade significativamente maior ( $P = 0,016$ ) de vasos na hepatite crônica [ $10,27 \times 10^{-5}$  vasos / $\mu\text{m}^2$  ( $3,73 \times 10^{-5}$ -  $17,6 \times 10^{-5}$  vasos / $\mu\text{m}^2$ )] em relação à esteatohepatite [ $4,36 \times 10^{-5}$  ( $0,921 \times 10^{-6}$ /  $11,1 \times 10^{-5}$ )], assim como maior contagem absoluta de vasos nos casos com esta causa [hepatite crônica: 5,6 (0,20-9,20); esteatohepatite: 2,33 (0,67-5,93),  $P = 0,016$ ] (Tabela 1).

Nos septos fibrosos dos casos de hepatite crônica, a mediana do número absoluto de vasos encontrados foi 7,33 (1,67/5,60), sendo que a mediana de sua densidade foi de  $1,9 \times 10^{-4}$  / $\mu\text{m}^2$  ( $0,379 \times 10^{-4}$ /  $3,09 \times 10^{-4}$ ). Em relação aos casos de esteatohepatite, encontraram-se 6,07 (0,2/8,6) vasos por campo analisado, o que representa uma densidade cuja mediana é de  $1,5 \times 10^{-4}$  vasos / $\mu\text{m}^2$  ( $0,112 \times 10^{-4}$ /  $2,08 \times 10^{-4}$ ). A comparação entre os dois grandes grupos cuja origem era a cirrose hepática com as variáveis número e densidade de vasos no septo não mostrou diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,117$  e  $P = 0,105$ ) (Tabela 2).

Os casos foram avaliados adicionalmente quanto à história positiva ou negativa para etilismo. No grupo das esteatohepatites, obtiveram-se quatro casos com história de etilismo anterior e quatro que o negavam. No grupo de hepatites crônicas, obteve-se história positiva de etilismo em 10 casos e informe de ausência do mesmo em 11. A história de etilismo não se correlacionou com a densidade de vasos, quer no fígado como um todo, quer em cada compartimento (parênquima ou septo) individualizado ( $P = 0,839$  e  $P = 0,874$ ).

## DISCUSSÃO

A cirrose hepática é responsável por elevada morbimortalidade, tanto no Brasil como em todo o mundo. A literatura tem valorizado, principalmente, a extensão e, por vezes, os padrões de deposição de matriz extra-celular, em especial dos colágenos, daí o jargão “grau de fibrose”, extremamente usado na avaliação de estágio das lesões, como na própria classificação de hepatites crônicas pelo grupo francês METAVIR<sup>(2)</sup>, que gradua as hepatites de F0 (arquitetura normal) até F4 (cirrose).

É importante reconhecer que grande parte das complicações da cirrose deve-se às alterações microvasculares observadas tanto como aumento do número, do calibre ou da luz dos vasos septais, quanto como capilarização dos sinusóides no parênquima, com conseqüente formação de curto-circuitos (“shunts”) artério-venosos<sup>(11)</sup>. Situações como estas, bem como alterações na permeabilidade e perfusão dos sinusóides ou presença de trombose vascular, levam à hipóxia que por sua vez, culmina com a formação de neovasos já em fases iniciais da doença. Além disso, a hipóxia hepática agrava a

progressão da fibrose, gerando um círculo vicioso que ocasiona ruptura no processo normal de reparação tecidual, levando à progressão da doença para estágios terminais<sup>(10)</sup>.

Os trabalhos que se propuseram a estudar as alterações microvasculares do fígado cirrótico através de marcadores histoquímicos e imunoistoquímicos são relativamente escassos, não apresentando padrão homogêneo que pudesse validar os modos de semiquantificar ou de propriamente quantificar tais alterações na cirrose hepática<sup>(10, 32, 38)</sup>. A proposta do presente estudo foi avaliar tais alterações através do método imunoistoquímico mediante detecção do antígeno endotelial CD 34, método amplamente utilizado como marcador endotelial em diversas outras entidades patológicas, especialmente nas neoplasias<sup>(19, 34)</sup>.

No presente estudo, assim como observado em outros órgãos, a utilização da detecção do CD 34 como método quantitativo e semiquantitativo em fígados cirróticos mostrou-se adequada para a avaliação de alterações microvasculares. O uso de escala semiquantitativa mostrou-se útil na avaliação dos vasos do parênquima hepático, com relação direta com a densidade de vasos pela quantificação morfométrica. No entanto, nos septos, a grande variação de espessura do tecido conjuntivo tornou-se uma variável de confusão, resultando em correlação positiva da análise semiquantitativa com o número absoluto de vasos nos septos, mas não com sua densidade.

Com relação ao padrão microscópio da vasculatura hepática, são raros os trabalhos que abordam este tema sob o prisma da histopatologia. Trabalhos em animais têm mostrado que amostras hepáticas in vivo são semelhantes às postmortem em relação à atividade necroinflamatória, fibrose<sup>(36)</sup> e vascularização<sup>(28)</sup>. Assim, apesar da literatura escassa, parece adequado o estudo da microvascularização hepática baseado em necropsias.

Sabe-se que as principais causas de morte da cirrose são ligadas a fenômenos circulatórios, principalmente relacionadas a complicações da hipertensão portal, como a presença de ascite, esplenomegalia e circulação colateral. As alterações microvasculares do fígado cirrótico, juntamente com lesões fibróticas, representam o componente mecânico na patogênese da hipertensão portal, implicando possível relação destas com as principais complicações da doença<sup>(12)</sup>.

No entanto, a proposta do presente estudo de correlacionar as complicações da cirrose (insuficiência hepática ou hipertensão portal) com a presença de neovascularização, não demonstrou associações estatisticamente significantes. Este dado pode ser resultante da escolha desta casuística, visto que se planejou aqui comparar apenas casos de necropsias de pacientes com cirrose, sempre em estágio avançado, em sua maioria com o próprio óbito decorrente das complicações da cirrose. Tal seleção permitiu constituir um grupo relativamente homogêneo, no qual se caracterizaram as alterações microvasculares gerais da cirrose, mas tal seleção de casos pode ter sido responsável por não terem sido refletidas todas as fases de

evolução da doença. Uma alternativa para futuro estudo, mais concentrado na fisiopatologia das complicações, será a seleção criteriosa de pacientes cujo óbito não apresente relação com a cirrose hepática, a fim de se poder registrar adequadamente as alterações vasculares em cada apresentação clínico-funcional da cirrose.

Na ótica dos autores, o principal achado do presente trabalho foi a demonstração de que a neoformação vascular no parênquima é significativamente maior nas cirroses associadas a hepatites crônicas que naquelas de padrão de esteatohepatite.

O significado fisiopatológico da angiogênese associada à hepatite viral crônica ainda é desconhecido. MEDINA et al.<sup>(25)</sup> propuseram recentemente que a neoformação vascular apresenta papel benéfico na reparação tecidual e regeneração pós-dano hepático, podendo, por outro lado, representar possível fator de risco na progressão para CHC em pacientes com hepatite C crônica. Os mecanismos moleculares envolvidos no processo ainda não estão completamente identificados. A produção local de óxido nítrico (ON) como resultado de uma hiperexpressão de ON-sintase, pode participar do processo induzindo vasodilatação. O aumento de expressão dos fatores de crescimento de hepatócitos e de endotélio vascular recentemente detectado nas hepatites B e C, também contribui aumentando a permeabilidade vascular; o VEGF ainda parece atuar mediando a vasodilatação induzida pelo ON<sup>(26)</sup>. Ainda, fatores pró-inflamatórios e pró-fibrogênicos, além do próprio vírus, induzem à produção de MMPs (*matrix metalloproteinase*), também envolvidas no processo de angiogênese<sup>(26)</sup>.

MEDINA et al.<sup>(25)</sup> mostraram correlação entre neovascularização e expressão de fator de crescimento de endotélio vascular, enquanto SHIMODA et al.<sup>(33)</sup> encontraram uniformidade na expressão tecidual deste fator nos grupos com esteatohepatite, hepatite crônica por vírus C e carcinoma hepatocelular. O presente estudo, no entanto, observou aumento significativo de neovascularização no parênquima dos casos com hepatite viral crônica comparativamente aos casos com esteatohepatite. Tal diferença pode indicar a presença de outros fatores envolvidos no processo de angiogênese em cirroses causadas por hepatites crônicas, não incluídos neste estudo, e que deverão ser motivo de novas pesquisas.

Procurou-se ainda, através da comparação entre a presença/ausência de etilismo em cada um desses grupos, observar se este seria fator com influência direta na angiogênese do fígado cirrótico, e não se obteve resultado significativo. Este dado confirma a hipótese dos autores de que o padrão de lesão da cirrose é o fator mais relevante no processo de neovascularização.

Ao contrário da fibrose, que parece ser reversível, distorções arquiteturais e, principalmente, anastomoses arteriovenosas nos septos fibrosos parecem regredir de forma tão demorada que, do ponto de vista de sobrevivência humana, podem ser considerados irreversíveis<sup>(11)</sup>. Dessa forma, uma nova perspectiva que se

abre é o possível valor prognóstico do estudo do rearranjo da microcirculação hepática através de marcadores como o CD34. Futuros estudos conjuntos clínicos e anatomopatológicos devem abordar tal possibilidade.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de Iniciação Científica.

---

Maeda MFY, Silva CD, Harima LS, Silva LFF, Ctenas B, Alves VAF. Vascularization in hepatic cirrhosis: an immunohistochemical study on necropsies. *Arq Gastroenterol.* 2008;45(1):38-45.

**ABSTRACT – Background** - Fibrosis has been the most cited variable in cirrhosis, but major alterations in hepatic vascularization have been pointed as basic elements in the physiopathology of the illness and its complications as portal hypertension, hepatic failure and hepatocellular carcinoma. **Methods** - The present study aims at assessing microvascular density in 35 cases of necropsies of cirrhotic patients by immunohistochemical detection of endothelial marker CD34, comparing semi-quantification with morphometric quantitative method, also searching for a possible relation of vascular alterations with the main causal agents, injury patterns and major clinical complications. **Results** - A significant association was detected between semi-quantitative and quantitative approach of microvessel density in parenchyma, but not in septa. No significant association was detected between neovascularization and any specific clinical complication of cirrhosis. Under our standpoint, the main achievement of the present study was the demonstration that the vascular neoformation in hepatic parenchyma is significantly higher in cirrhosis associated with chronic hepatitis than in cirrhosis resulting from steatohepatitis. **Conclusion** - These findings require further clinical studies to assess the hypothesis that the rearrangement of liver microcirculation through the detection of CD34 might be relevant in prognostic assessment of cirrhotic patients.

**HEADINGS** – Liver cirrhosis. Hepatitis, chronic. Fatty liver. Antigens, CD34.

---

## REFERÊNCIAS

- Assy N, Spira G, Paizi M, Shenkar L, Kraizer Y, Cohen T, Neufeld G, Dabbah B, Enat R, Baruch Y. Effect of vascular endothelial growth factor on hepatic regenerative activity following partial hepatectomy in rats. *J Hepatol.* 1999;30:911-5.
- Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology.* 1996;24:289-93.
- Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut.* 2000;46:443-6.
- Brasil. Ministério da Saúde. Indicadores e dados básicos 2004. Sistema de informações sobre mortalidade [citado em fevereiro de 2007]. Disponível em: URL: <http://www.datasus.gov.br>.
- Brunt EM. Non-alcoholic fatty liver disease. In: Burt AD, Portmann BC, Ferrel LD, editors. *MacSween's pathology of the liver.* 5th ed. London: Churchill-Livingstone; 2007. p.367-98.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. National data. Deaths from final 2004 [citado em fevereiro de 2007]. Disponível em: URL: <http://www.cdc.gov>.
- Chedid A. Regression of human cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:1591.
- Chejfec G. Controversies in pathology. Is cirrhosis of the liver a reversible disease? *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:1585-6.
- Coates RA, Halliday ML, Ranking JG, Feinman SV, Fisher MM. Risk of fatty infiltration or cirrhosis of the liver in relation to ethanol consumption: a case-control study. *Clin Invest Med.* 1986;9:26-32.
- Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology.* 2002;35:1010-21.
- Desmet VJ, Roskams T. Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *J Hepatol.* 2004;40:860-7.
- Desmet VJ. Comments on cirrhosis reversal. *Dig Liver Dis.* 2005;37:909-16.
- Di Carlo I, Frassetto F, Lombardo R, Azzarello G, Vasquez G, Puleo S. CD 34 expression in chronic and neoplastic liver diseases. *Panminerva Med.* 2002;44:365-7.
- Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood.* 1990;75:2417-26.
- Garcia-Tsao G. Portal hypertension. *Curr Opin Gastroenterol.* 2003;19:250-8.
- Gayotto LCC, Alves VAF, Cerski CTS, Escanhoela CA, Nekkim ES, Freitas Lar & Comitê SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. *GED Gastroenterol Endosc Dig.* 2000;19:137-40.
- Hall PM. Alcoholic liver disease. In: Burt AD, Portmann BC, Ferrel LD, editors. *MacSween's pathology of the liver.* 5th ed. London: Churchill-Livingstone; 2007. p.332-66.
- Haratake J, Hisaoka M, Yamamoto O, Horie A. An ultrastructural comparison of sinusoids in hepatocellular carcinoma, adenomatous hyperplasia, and fetal liver. *Arch Pathol Lab Med.* 1992;116:67-70.
- Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML, Merino MJ. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol.* 1995;147:9-19.
- Iida VH, Da Silva ASF, Da Silva LFF, Alves VAF. Cirrose hepática: aspectos morfológicos relacionados às suas possíveis complicações. Um estudo centrado em necropsias. *J Bras Patol Med Lab.* 2005;41:29-36.
- James J, Bosch KS, Zuyderhoudt FM, Houtkooper JM, van Gool J. Histophotometric estimation of volume density of collagen as an indication of fibrosis in rat liver. *Histochemistry.* 1986;85:129-33.
- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979;11:447-55.
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41:1313-21.
- Lai WK, Adams DH. Angiogenesis and chronic inflammation; the potential for novel therapeutic approaches in chronic liver disease. *J Hepatol.* 2005;42:7-11.
- Medina J, Caveda L, Sanz Cameno P, Arroyo AG, Martin-Vilchez S, Majano PL, Garcia-Buey L, Sanchez-Madrid F, Moreno-Otero R. Hepatocyte growth factor activates endothelial proangiogenic mechanisms relevant in chronic hepatitis C-associated neoangiogenesis. *J Hepatol.* 2003;38:660-7.
- Medina J, Arroyo AG, Sanchez-Madrid F, Moreno-Otero R. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology.* 2004;39:1185-95.
- Middleton J, Americh L, Gayon R, Julien D, Mansat M, Anract P, Cantagrel A, Cattan P, Reimund JM, Aquilar L, Almaric F, Girard JP. A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 and CD146. *J Pathol.* 2005;206:260-8.
- Nizza MMRE, Vilela CR, Ferreira AJA, Gonçalves MS, Pisco JM. Arterial blood supply in the dog. *RPCV.* 2003;98:69-76.
- Onori P, Morini S, Franchitto A, Sferra R, Alvaro D, Gaudio E. Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl4-treated rats. *J Hepatol.* 2000;33:555-63.
- Park YN, Yang CP, Fernandez GJ, Cubukcu O, Thung SN, Theise ND. Neoangiogenesis and sinusoidal "capillarization" in dysplastic nodules of the liver. *Am J Surg Pathol.* 1998;22:656-62.
- Ray MB. Regression of cirrhosis: a timely topic. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:1589-90.
- Schaffner F, Popper H. Capillarization of the hepatic sinusoids in man. *Gastroenterology.* 1963;44:239-42.
- Shimoda K, Mori M, Shibuta K, Banner BF, Barnard GF. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor mRNA expression in patients with chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 1999;14:353-9.
- Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T, Horiuchi T, Muraoka R, Iki M. Extent of tumor vascularization correlates with prognosis and hematogenous metastasis in gastric carcinomas. *Cancer Res.* 1996;56:2671-6.
- Theise ND, Bordenheimer HC, Ferrel LD. Acute and chronic viral hepatitis. In: Burt AD, Portmann BC, Ferrel LD, editors. *MacSween's pathology of the liver.* 5th ed. London: Churchill-Livingstone; 2007. p.399-442.
- Tostes R, Bandarra EP. Biopsia hepática em cães: relação entre qualidade da amostra e grau de conclusão do diagnóstico. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2002;54:468-72.
- Wanless IR, Nakashima E, Sherman M. Regression of a human cirrhosis: morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:1599-607.
- Ward NL, Haninee AL. Angiopoietin-1 causes reversible degradation of the portal microcirculation in mice: implications for treatment of liver disease. *Am J Pathol.* 2004;165:889-99.
- Wisse E, DeZanger RB, Charles K, Van der Smissen P, McCuskey RS. The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall, and the space of Disse. *Hepatology.* 1985;5:683-92.

Recebido em 30/4/2007.  
Aprovado em 29/8/2007.