

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Faculdade de Ciências Médicas

Dalvaci da Cunha Lira Neves

Quantificação das células estreladas ativadas / miofibroblastos e análise da apoptose das células do fígado durante a terapia celular na fibrose hepática em ratos

> Rio de Janeiro 2011

Dalvaci da Cunha Lira Neves

Quantificação das células estreladas ativadas / miofibroblastos e análise da apoptose das células do fígado durante a terapia celular na fibrose hepática em ratos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Laís de Carvalho

Rio de Janeiro 2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE UERJ/REDE SIRIUS/CBB

N518	Neves, Dalvaci da Cunha Lira.
	Quantificação das células estreladas ativadas/ miofibroblastos e análise da apoptose das células do fígado durante a terapia celular na fibrose hepática em ratos / Dalvaci da Cunha Lira Neves. – 2011. 63 f.
	Orientadora: Laís de Carvalho Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica Experimental.
	1. Cirrose hepática - Teses. 2. Cirrose hepática - regeneração. 3. Células -tronco – Teses. 4. Fígado - regeneração - Teses. 5. Apoptose - Teses. 6. Regeneração hepática. I. Carvalho, Laís de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
	CDU 616.36-004

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Dalvaci da Cunha Lira Neves

Quantificação das células estreladas ativadas / miofibroblastos e análise da apoptose das células do fígado durante a terapia celular na fibrose hepática em ratos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

Aprovada em 27 de julho de 2011.

Orientadora:

Prof.^a Dra. Laís de Carvalho Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.ª Dra. Ana Carolina Stumbo Machado Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Helene Santos Barbosa Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao amado mestre Jesus e aos meus amores: minha mãezinha Euza, Carlos e Carlinhos. Em especial a Simone Carvalho, a equipe do Laboratório de Cultura de Células e aos meus amigos. Obrigada por fazerem parte e serem essenciais em minha vida!

AGRADECIMENTOS

A Jesus, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, me direcionando e colocando em minha vida pessoas especiais. Obrigada!

A você mãezinha Euza, meu amor Carlos e minha razão de superar todos os obstáculos Carlinhos, com todo o meu carinho a minha gratidão. Obrigada por existirem em minha vida! Amo vocês!

A Prof^a Dra. Laís de Carvalho, minha orientadora, a qual me abraçou e me acolheu com muito carinho. Obrigada pela oportunidade a mim dada e por transmitir seus conhecimentos e experiência. Você é muito especial para mim e a mãezona dos LCCnianos!

A doutoranda Simone Nunes Carvalho, a minha Có querida, muito obrigada por dividir comigo seus conhecimentos, por sua dedicação, paciência, responsabilidade e ser tão especial. Você é mil!

A Dra. Ana Carolina Stumbo Machado uma pessoa indescritível, está sempre disposta a nos auxiliar com conhecimentos, conselhos e até mesmo com uma meditação. Mostra porque é tão querida por todos. Você é incomensurável!

A Dra. Alessandra Alves Thole, pela amizade, pelo apoio, sugestões e por sua alegria contagiante.

Ao Prof. Dr. Jorge de Carvalho, chefe do Departamento de Histologia e Embriologia, sempre disposto a ajudar, obrigada pela simpatia e pelo bom convívio no DHE durante a realização deste trabalho.

A Mestre Mariana de Freitas Oliveira, pela amizade, pelo carinho, pela disponibilidade de me ajudar sempre, pelos momentos que passamos juntas... que saudades. Obrigada por sua amizade, você é muito querida!

A Mestre Manoela Lopes Carvalho, pela amizade, por sua sinceridade, pela disponibilidade em ajudar e pelos momentos que passamos juntas. Obrigada por sua amizade!

Aos biólogos Genilza Oliveira, Camila Luna (adoro esse par de jarras!), Fabiano Touzdijan e IC Daniela Caldas, obrigada pela amizade, pela ajuda nos experimentos e por tornarem nossos dias de trabalho mais agradáveis e animados.

Ao técnico João Roberto Perez meu muito obrigado, pela simpatia, por estar sempre disposto a me auxiliar e ter assim grande participação na realização deste trabalho.

Ao médico veterinário Carlos Eduardo Caetano, sempre disponível para colaborar na realização do transplante de células de medula óssea. Obrigada pelo auxílio.

A Renata Travassos obrigada por ter me inserido ao grupo e as Dras Ana Paula Gadelha e Moema Hausen por terem me recebido, acolhido e me transmitido os seus conhecimentos com muito esmero e carinho.

A Amélia Faustino a mais nova integrante da minha família. Obrigada por sua amizade e carinho. Você é muito especial!

A doutoranda Aline Félix muito obrigada por sua amizade, carinho e por seus auxílios na hora que mais precisei. Adoro você!

A aluna de mestrado Ana Carla Bandeira obrigada por sua amizade, pelo carinho e pela companhia no almoço.

A doutoranda Marcela Otrano obrigada pelo incentivo e pelo carinho.

Aos técnicos Ana Lúcia Nascimento, Patrícia Martinez, Fábio Barbosa, Marcelo Walter, Josefa Alves, Angélica da Silva, Geziléia Lau, Kátia Lima e Cristina Teles, obrigada pela simpatia e auxílios constantes durante a realização deste trabalho.

Ao meu sogrão Wilson Neves por ser este paizão maravilhoso e a minha sogrita Júlia Batista, obrigada por permitirem quem eu faça parte desta família e serem tão especiais comigo. A minha maravilhosa dinda Elisabete da Silveira que é uma guerreira, sempre disposta a ajudar, animada, tudo para ela está bom, ela é show. Adoro vocês!

Aos meus irmãos de coração Janaína Rodrigues e Luis Antônio Fajardo, muito obrigado por vocês existirem em minha vida! Pelos momentos agradáveis e difíceis da vida que já passamos e os que virão.

Aos meus amigos extra-UERJ Alessandra Carmona, Carlos Ruas, Flávia Miranda, Luciana Cerqueira, Magna Dias, Márcia Silva, Mauro da Silveira, Paula Fragoso e Tânia Marinho, muito obrigada por suas amizades, auxílios, conselhos e sugestões tão importante em minha vida, cada um em um momento diferente.

A fonoaudióloga Heloisa Miguens, um pouco psicóloga, amiga, conselheira, um achado mandado por Deus! Mostrou-me que não adiantava só sonhar, mas acreditar no sonho e para concretizá-lo, eu precisava planejar, executar e criticar. Obrigada pelo seu profissionalismo, sua atenção e carinho.

Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças.

Charles Darwin

RESUMO

NEVES, Dalvaci da Cunha Lira. *Quantificação das células estreladas ativadas/ miofibroblastos e análise da apoptose das células do fígado durante a terapia celular na fibrose hepática em ratos*. 2011. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências -Fisiopatologia Clínica Experimental), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

A fibrose hepática é o resultado de uma resposta cicatrizante frente a repetidas lesões no fígado, e é caracterizada pelo acúmulo excessivo de proteínas da matriz extracelular (MEC) no parênguima hepático, incluindo colágeno, fibronectina, elastina, laminina e proteoglicanos, com a participação de diferentes populações celulares do fígado. As principais células responsáveis pela síntese de proteínas da MEC na fibrose hepática são as células estreladas hepáticas ativadas e os miofibroblastos, que surgem após estímulo inflamatório e são caracterizadas pela expressão de alfa-actina de músculo liso (α-SMA). Sabe-se que durante a progressão da fibrose hepática, ocorre a morte de hepatócitos e sua substituição por células fibrogênicas α -SMA⁺. A apoptose dessas células fibrogênicas é de grande relevância para a regressão da fibrose e regeneração hepática. Nos últimos anos, a terapia com células tronco de medula óssea tem sido utilizada para estimular a regeneração hepática em diferentes modelos experimentais e protocolos clínicos. A fração mononuclear da medula óssea adulta possui duas populações de célulastronco importantes no tratamento de diversas doenças hepáticas: células-tronco hematopoiéticas e células-tronco mesenguimais. O objetivo deste estudo foi analisar a expressão de a-SMA e o processo de apoptose de células hepáticas durante a fibrose hepática induzida por ligadura do ducto biliar (LDB) e após o transplante de células mononucleares de medula óssea (CMMO). Os fígados foram coletados de ratos dos seguintes grupos: normal, 14 dias de LDB, 21 dias de LDB e animais que receberam CMMO após 14 dias de LDB, e foram analisados após 7 dias (totalizando 21 dias de LDB). Para quantificar a expressão de α-SMA por células fibrogênicas nos grupos experimentais, foi realizada imunoperoxidase para α-SMA, seguida de morfometria no programa Image Pro Plus. Para analisar a apoptose nas células hepáticas, foi realizada imunoperoxidase e Western Blotting (WB) para caspase-3 (proteína apoptótica) e imunofluorescência com dupla-marcação para caspase-3 e α-SMA, seguida de observação em microscópio confocal. Os resultados da quantificação de α-SMA por morfometria mostraram que a expressão de α-SMA aumentou significativamente 14 e 21 dias após a LDB. Entretanto, essa expressão diminuiu significativamente no grupo tratado com CMMO, que apresentou parênquima hepático mais preservado em relação ao grupo com 21 dias de LDB. Os resultados de imunoperoxidase, WB e microscopia confocal para expressão de caspase-3 demonstraram que essa proteína diminuiu nos animais fibróticos com 14 e 21 dias de LDB com relação ao grupo normal, e estava significativamente elevada no grupo tratado com CMMO. A análise por microscopia confocal demonstrou que algumas células coexpressaram α-SMA e caspase-3 nos animais tratados com CMMO, sugerindo a morte de células fibrogênicas e remodelamento do parênquima hepático.

Palavras-chave: Fibrose hepática. Células mononucleares de medula óssea. Alfaactina de músculo liso. Caspase-3. Apoptose.

ABSTRACT

Hepatic fibrosis is the result of a scarring response due to continued injury to the liver, and is featured by excessive accumulation of extracellular matrix (MEC) proteins in hepatic parenchyma. These proteins include collagen, fibronectin, elastin, laminin and proteoglicans, along with the participation of different cell populations within the liver. The main cells responsible for the synthesis of MEC proteins are activated hepatic stellate cells and myofibroblasts, which appear after inflammatory stimuli and are characterized by the expression of alpha-smooth muscle actin (α -SMA). It is known that hepatic fibrosis progression is accompanied by hepatocyte death and its substitution by α -SMA⁺ fibrogenic cells. Therefore, apoptosis of these fibrogenic cells is of main relevance to fibrosis regression and hepatic regeneration. In the later years, bone marrow stem cell therapy has been used to stimulate hepatic regeneration in different experimental models and clinical protocols. The adult bone marrow mononuclear fraction contains two stem cell populations particularly important in the treatment of diverse hepatic diseases: hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells. The aim of this study was to analyze α -SMA expression and the apoptotic process in hepatic cells during hepatic fibrosis induced by bile duct ligation (BDL) and after bone marrow mononuclear cell (BMMC) transplantation. Livers were collect from rats of the following groups: normal, 14 days of BDL, 21 days of BDL and rats that received BMMC 14 days after BDL and were analyzed after 7 days (total of 21 days of BDL). To quantify α -SMA expression by fibrogenic cells in the experimental groups, immunoperoxidase to α -SMA followed by morphometry in the Image Pro Plus software was performed. To analyze apoptosis in hepatic cells, immunoperoxidase and western blotting (WB) against caspase-3 (apoptotic protein) were used, along with double immunofluorescence against caspase-3 and α -SMA to confocal microscopy analysis. Results of α-SMA quantification by morphometry showed that α-SMA expression increased significantly 14 and 21 days after BDL. However, this expression was significantly decreased in the BMMC treated group, which presented a more preserved hepatic parenchyma in relation to the group with 21 days of BDL. Immunoperoxidase, WB and confocal microscopy results showed that caspase-3 is decreased in fibrotic livers with 14 and 21 days of BDL in comparison to normal group, and was significantly augmented in the BMMC treated group. Confocal microscopy analysis showed that were cells coexpressing α-SMA and caspase-3 in rats treated with BMMC, suggesting fibrogenic cells death and hepatic remodeling.

Keywords: Hepatic fibrosis. Bone marrow mononuclear cells. Alpha-smooth muscle actin. Caspase-3. Apoptosis.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Representação esquemática do fígado	17
Esquema 2	Representação das células do fígado	19
Esquema 3	Desenvolvimento da fibrose hepática	22
Esquema 4	Alterações fenotípicas da CEH durante a ativação na lesão do	
	fígado	24
Esquema 5	Características morfológicas da apoptose e da necrose	29
Esquema 6	Vias extrínseca e intrínseca da apoptose	30
Esquema 7	Gênese da fibrose hepática	33
Esquema 8	Consequências de terapias anti-apoptóticas nas doenças hepáticas	34
Esquema 9	Cirurgia de ligadura do ducto biliar (LDB)	39
Esquema10	Isolamento de CMMO de ratos	40
Esquema11	Organização dos grupos controle e com fibrose hepática	41
Esquema12	Quantificação de α-SMA	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imunoperoxidase para expressão de α-SMA	46
Figura 2	Quantificação de α-SMA	47
Figura 3	Imunoperoxidase para caspase-3	49
Figura 4	Western blotting para caspase 3	51
Figura 5	Imunofluorescência para expressão de caspase-3	53
Figura 6	Imunofluorescência para expressão de α-SMA e caspase-3	54
Figura 7	Imunofluorescência mostrando a coexpressão de α-SMA e	
	caspase-3	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APAF-1 Apoptosis protease activating factor-1/Fator ativador de protease da apoptose 1
 - Bak BCL2 antagonist killer 1/Antagonista de BCL-2 ou fator de morte 1
 - Bax BCL2 associated X protein/Proteína X associada à BCL-2
 - BID BH3 interacting domain death agonist/Agonista de morte com domínio de interação BH3
 - BSA Bovine serum albumin/Albumina de soro bovino
 - CEH Célula estrelada hepática
 - CTE Célula-tronco embrionária
 - CTH Célula-tronco hematopoiética
 - CTM Célula-tronco mesenquimal
- CMMO Células mononucleares da medula óssea
- DAB Diaminobenzidina
- DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DMEM Dulbecco's modified Eagle medium /Meio de Eagle modificado por Dulbecco
- DISC Death inducing signaling complex/Complexo de sinalização indutor de morte
- ERKs Extracellular signal-regulated kinases/Quinases reguladas por sinal extracelular
- ET Endotelin/Endotelina
- FAS Fatty acid synthetase/Ácido graxo sintetase
- FasL Fatty acid synthetase ligand/Ligante de ácido graxo sintetase
- HGF Hepatocyte growth factor/Fator de crescimento do hepatócito
- IFN-γ Interferon-γ/Interferon gama
- IHF Insuficiência hepática fulminante
- JNK C-jun N-terminal kinase/Quinase de C-jun N-terminal
- LDB Ligadura do ducto biliar
- MCP Monocyte chemoattractant protein/Proteína quimiotática de monócitos
- MEC Matriz extracelular
- MMP Matrix metalloproteinases/Metaloproteinases de matriz
- MMP-9 Metaloproteinase 9
 - NK Natural killer
 - NKT Natural killer T
- PBS Phosphate buffer saline/tampão fosfato salino
- PDGF Platelet-derived growth factor/Fator de crescimento derivado de plaquetas

- RE Retículo endoplasmático
- RPM Rotações por minuto
- TBS Solução de PBS e Tween 20 a 0,1%
- TGF- β_1 Transforming growth factor beta1/Fator de crescimento transformante beta-1
- TIMP Tissue inhibitors of metalloproteinases/Inibidores teciduais de metaloproteinases
- TNF Tumor necrosis factor/Fator de necrose tumoral
- TNF-α Tumor necrosis factor alpha/Fator de necrose tumoral alfa
- α-SMA alpha-smooth muscle actin/alfa-actina de músculo liso

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	HISTOLOGIA DO FÍGADO	16
2	FIBROSE HEPÁTICA	20
3	ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS ESTRELADAS NA FIBROSE	
	НЕРА́ТІСА	23
4	CÉLULAS-TRONCO	25
4.1	Células-tronco de medula óssea (CTMO)	25
4.2	CTMO na regeneração hepática	26
5	APOPTOSE	28
5.1	Características	28
5.2	Apoptose das células hepáticas na fibrose hepática	31
6	JUSTIFICATIVA	36
7	OBJETIVOS	37
8	METODOLOGIA	38
8.1	Indução por ligadura do ducto biliar e transplante de CMMO	38
8.2	Isolamento de CMMO de ratos	39
8.3	Grupos experimentais	41
8.4	Expressão e quantificação de α-SMA	42
8.5	Detecção de apoptose.	43
8.5.1	Por imunoperoxidase	43
8.5.2	Por imunofluorescência	43
8.5.3	Processamento para wester blotting	44
8.6	Análises estatísticas	44
9	RESULTADOS	45
9.1	Análise quantitativa de CEHs/miofibroblastos	45
9.2	Imunoperoxidase para caspase-3	48
9.3	Wester blotting para caspase-3	50
9.4	lmunofluorescência com dupla marcação p/ α-SMA e caspase-3	52
10	DISCUSSÃO	56
11	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXO - Carta de submissão do artigo científico	63

INTRODUÇÃO

A fibrose hepática é o resultado de uma resposta cicatrizante frente a repetidas lesões no fígado, e é caracterizada pelo acúmulo excessivo de proteínas da matriz extracelular (MEC) no parênquima hepático, incluindo colágeno, fibronectina, elastina, laminina e proteoglicanos, com a participação de diferentes populações celulares do fígado. As principais células responsáveis pela síntese de proteínas da MEC na fibrose hepática são as células estreladas hepáticas ativadas e os miofibroblastos, que surgem após estímulo inflamatório e são caracterizadas pela expressão de alfa-actina de músculo liso (α-SMA). Sabe-se que durante a progressão da fibrose hepática, ocorre a morte de hepatócitos e sua substituição por células fibrogênicas α-SMA. A apoptose dessas células fibrogênicas é de grande relevância para a regressão da fibrose e regeneração hepática. Nos últimos anos, a terapia com células tronco de medula óssea tem sido utilizada para estimular a regeneração hepática em diferentes modelos experimentais e protocolos clínicos. A fração mononuclear da medula óssea adulta possui duas populações de célulastronco importantes no tratamento de diversas doenças hepáticas: células-tronco hematopoiéticas e células-tronco mesenguimais. O objetivo deste estudo foi analisar a expressão de α-SMA e o processo de apoptose de células hepáticas durante a fibrose hepática induzida por ligadura do ducto biliar (LDB) e após o transplante de células mononucleares de medula óssea (CMMO).

1 HISTOLOGIA DO FÍGADO

O fígado, segundo maior órgão e a maior glândula do corpo humano, está associado ao tubo digestivo e situado no quadrante superior direito da cavidade abdominal, abaixo do diafragma. Além disso, o fígado é estruturalmente e funcionalmente complexo e, portanto, é considerado o segundo maior órgão em relação ao cérebro, em sua complexidade. A maior parte do sangue chega ao fígado pela veia porta (70-80%), contendo os nutrientes absorvidos no tubo digestivo, onde também traz o sangue proveniente do pâncreas e do baço. O restante é suprido pela artéria hepática, que traz o sangue oxigenado pelos pulmões (esquema 1A). Lipídios complexos (ou quilomícrons) são nutrientes que, após serem absorvidos pelo sistema digestivo, chegam ao fígado através da artéria hepática. Assim, o fígado ocupa uma posição estratégica no sistema circulatório, ideal para captar, transformar e armazenar metabólitos e para neutralizar e eliminar substâncias tóxicas produzidas ou absorvidas pelo organismo. A eliminação ocorre na bile, uma secreção exócrina do fígado, importante para a digestão de lipídeos. O fígado tem função muito importante na síntese de proteínas plasmáticas, como a albumina e outras proteínas carreadoras que mantém a homeostase sanguínea (Kmiec 2001; Junqueira e Carneiro 2008; Malarkey, Johnson et al. 2005).

O fígado é revestido por uma camada delgada de tecido conjuntivo (cápsula de Glisson) que se torna mais espessa no hilo hepático, por onde a veia porta e a artéria hepática penetram no fígado e por onde saem os ductos hepáticos direito e esquerdo e os linfáticos. Estes vasos e ductos são circundados por tecido conjuntivo ao longo de toda a sua extensão, até o término (ou origem) nos espaços porta entre os lóbulos hepáticos (esquema 1B). Neste local forma-se uma delicada rede delgada de fibras reticulares, composta principalmente de colágeno tipo I e III, que suporta os hepatócitos (principal célula do fígado) e células endoteliais dos capilares sinusóides (Kmiec 2001; Junqueira e Carneiro 2008; Malarkey, Johnson et al. 2005).

O componente estrutural básico do fígado é a célula hepática ou hepatócito (do grego *hepar*, fígado, *+ kytos*, célula). Essas células epiteliais poligonais estão localizadas bem próximas umas das outras formando placas espessas que se anastomosam limitando os espaços sinusoidais. O hepatócito é uma célula altamente versátil e de metabolismo intenso, com muitas mitocôndrias e retículo endoplasmático (RE) liso e rugoso bem desenvolvido, exibindo variações em suas propriedades estruturais, histoquímicas e bioquímicas, dependendo de sua localização nos lóbulos hepáticos (Junqueira e Carneiro 2008).

Na periferia dos lóbulos hepáticos estão presentes os espaços porta, os quais são constituídos de um ramo da veia porta, um ramo de artéria hepática, um ducto do sistema de ductos biliares, vasos linfáticos e nervos. Os ductos biliares são formados de epitélio cubóide e transportam a bile, sintetizada pelos hepatócitos, em direção ao ducto hepático para ser armazenada na vesícula biliar (esquema 1C) (Gartner e Hiatt 2007).



Esquema 1: Representação do fígado normal. Em (A), a anatomia do fígado mostrando os lobos hepáticos e os principais vasos. (B) Lóbulos hepáticos mostrando os espaços porta e a veia centrolobular. (C) Porção do lóbulo hepático, mostrando o espaço porta (tríade portal), placas de hepatócitos, os capilares sinusóides, o canalículo biliar e a veia centrolobular (Gartner e Hiatt 2007).

Os hepatócitos estão radialmente dispostos no lóbulo hepático, arranjados como tijolos de uma parede. Estas placas celulares estão direcionadas da periferia do lóbulo para o seu centro e anastomosam-se livremente, formando um labirinto

semelhante a uma esponja. Os espaços entre essas placas contêm capilares, os sinusóides hepáticos (esquema 1C). Esses sinusóides são vasos irregularmente dilatados compostos por uma camada descontínua de células endoteliais fenestradas. As células endoteliais estão separadas dos hepatócitos adjacentes por uma lâmina basal descontínua e um espaço subendotelial conhecido como espaço de Disse, que contém microvilos dos hepatócitos (esquema 2). Fluidos provenientes do sangue atravessam rapidamente a parede endotelial e fazem um contato íntimo com a parede dos hepatócitos, o que permite uma troca fácil de macromoléculas entre o lúmen sinusoidal e os hepatócitos e vice e versa. Esta troca é fisiologicamente importante não apenas devido grande ao número de macromoléculas (lipoproteínas, albumina, fibrinogênio) secretadas dos hepatócitos para o sangue, mas também porque o fígado capta e cataboliza muitas moléculas grandes (Junqueira e Carneiro 2008).

Pelo menos 15 tipos diferentes de células podem ser encontradas no fígado normal como, por exemplo, hepatócitos, células sinusoidais, células de Kupffer, células estreladas hepáticas e células ductais (Malarkey, Johnson et al. 2005)

As células de Kupffer constituem cerca de 15% da população celular do fígado e são conhecidas como macrófagos residentes. As células de Kupffer são encontradas na superfície luminal das células endoteliais, e suas principais funções são: metabolizar eritrócitos velhos, digerir hemoglobina, secretar proteínas relacionadas com processos imunológicos e destruir bactérias que eventualmente penetrem no sangue portal a partir do intestino grosso (Junqueira e Carneiro 2008).

As células estreladas hepáticas (CEH), também conhecidas como células de lto, se localizam no espaço de Disse e contêm inclusões lipídicas ricas em vitamina A. No fígado saudável estas células desempenham várias funções, como captação, armazenamento e liberação de retinóides, síntese e secreção de várias proteínas da matriz extracelular e proteoglicanos, secreção de fatores de crescimento e citocinas e regulação do diâmetro do lúmen sinusoidal em resposta a diferentes fatores reguladores (prostaglandinas, tromboxano A2, etc.). Durante uma lesão crônica (como consumo de etanol e toxinas), sob estímulo inflamatório as células estreladas hepáticas se tornam ativadas e proliferam, adquirindo características de miofibroblastos, como a expressão de alfa-actina de músculo liso (α-SMA) (Malarkey, Johnson et al. 2005; Iredale 2007). Entre as membranas celulares de dois hepatócitos existem regiões de junções oclusivas e junções comunicantes do tipo *gap*, e ocorre a delimitação de um espaço tubular com pequenos microvilos no seu interior, denominado canalículo biliar, que é a primeira porção do sistema de ductos biliares (esquema 2). Esses canalículos biliares formam uma rede complexa entre os hepatócitos, e se anastomosam ao longo das placas do lóbulo hepático, terminando no ducto biliar dos espaços porta. Assim, a bile flui do centro para a periferia do lóbulo hepático, onde entra nos dúctulos biliares, também chamados Canais de Hering, que são os menores ramos dos ductos biliares do espaço porta (Junqueira e Carneiro 2008; Malarkey, Johnson et al. 2005).



Esquema 2: Representação das células do fígado. Os pontos de junção entre dois hepatócitos apresentam os canalículos biliares, que transportam a bile. Os cordões de hepatócitos estão separados das células endoteliais dos capilares sinusóides hepáticos pelo espaço de Disse, onde a matriz extracelular é secretada principalmente pelas células estreladas hepáticas. As células de Kupffer são macrófagos que residem na luz dos capilares sinusóides (Iredale 2007).

2 FIBROSE HEPÁTICA

Resultado de uma resposta cicatrizante frente a repetidas lesões, a fibrose hepática é caracterizada pelo acúmulo excessivo de proteínas da matriz extracelular (MEC) no parênquima hepático, incluindo colágeno I, II, III, IV, fibronectina, elastina, laminina e proteoglicanos, com a participação de diferentes populações celulares do fígado (Carvalho, Lira et al. 2010; Jiao, Friedman et al. 2009). Esse acúmulo de proteínas da MEC atua desfazendo a arquitetura hepática, formando uma cicatriz fibrosa com subseqüente desenvolvimento de nódulos pelos hepatócitos em regeneração. As principais causas de seu desenvolvimento são infecção viral (hepatite C), abuso de álcool, esteato-hepatite não alcoólica e parasitemias (Bataller e Brenner 2005; Friedman 2008). O modelo de indução de fibrose por ligadura do ducto biliar (LDB), bastante conhecido, leva a uma retenção tóxica da bile no fígado, acompanhado por uma inflamação e fibrose localizada principalmente nos espaços porta hepático e próximo as células epiteliais dos ductos biliares (Carvalho, Lira et al. 2010; Glaser, Gaudio et al. 2009)

Células inflamatórias ativadas, incluindo as células de Kupffer (macrófagos residentes do fígado), produzem uma gama de citocinas pró-fibróticas como fator-1 de crescimento transformante (TGF- β_1), o qual promove a ativação de fibroblastos portais e das células estreladas hepáticas (CEH) e sua diferenciação em miofibroblastos (Lefkowitch 2007). Esse tipo celular é caracterizado por expressar a proteína alfa-actina de músculo liso (α -SMA) e pela produção de uma matriz extracelular rica em colágeno, sendo a principal célula responsável pela desorganização do parênquima hepático (Guyot, Lepreux et al. 2006; Friedman 2008). O excesso de colágeno acumulado nos espaços de Disse e entre os lóbulos hepáticos prejudica o contato entre os hepatócitos e os sinusóides hepáticos, acarretando na morte dos hepatócitos e em um processo inflamatório onde pode ocorrer necrose. Nesse estágio se desenvolve uma complicação da fibrose hepática, denominada cirrose (Malarkey, Johnson et al. 2005; Iredale 2007).

As CEH ativadas são identificadas como sendo as principais produtoras de colágeno em um fígado lesado. Após a sua ativação, essas células migram do espaço de Disse para o local da lesão, secretando grandes quantidades de MEC e desregulando a sua degradação, dando início ao processo fibrótico (esquema 3)

(Iredale 2007). O comprometimento do balanço normal entre a produção e degradação dos componentes da matriz extracelular é tido como principal característica nos fígados fibróticos (Atzori, Poli et al. 2009).

As CEH ativadas apresentam potencial fibrogênico. Passados 14 dias da indução da fibrose por ligadura do ducto biliar, tem-se a diferenciação das CEH em miofibroblastos ao redor dos ductos biliares em proliferação e uma extensa deposição de colágeno (Carvalho, Lira et al. 2010).

Fígados normais expressam predominantemente, colágenos do tipo I e III, no espaço perisinusoidal de Disse e nos espaços porta hepáticos. Contudo, fígados fibróticos, além de apresentarem uma alta na expressão desses dois tipos de colágeno, expressam também o colágeno tipo IV, localizado principalmente na lâmina basal formada ao redor dos ductos biliares em proliferação e nos sinusóides hepáticos, comprometendo assim a nutrição hepatocelular (Iredale 2007).

Os hepatócitos, alvos de diversos agentes hepatotóxicos, uma vez lesados liberam espécies reativas de oxigênio e mediadores fibrogênicos induzindo uma resposta inflamatória. Tanto o infiltrado de células inflamatórias no fígado, como a apoptose dos hepatócitos estimulam a ativação das CEH, levando-as a secretarem colágenos (Bataller e Brenner 2005). Nessas condições, o excesso de colágeno acumulado nos espaços de Disse e entre os lóbulos hepáticos prejudica o contato entre os hepatócitos e os sinusóides hepáticos, ocasionando a morte dos hepatócitos e um processo inflamatório onde pode ocorrer uma necrose hepatocelular generalizada. Esse estágio final da fibrose hepática denominada cirrose, quando não tratado, acarreta em muitas das vezes na falência do órgão (Iredale 2007; Jiao, Friedman et al. 2009).



Esquema 3: Desenvolvimento da fibrose hepática. Lesão do hepatócito resultando na estimulação e recrutamento de células inflamatórias exógenas e residentes do fígado (incluindo as células de Kupffer). Ativação das células estreladas (CEHs), levando-as a assumir características de células do tipo miofibroblastos. Essa ativação resulta na formação de cicatrizes devido à produção e acúmulo de matriz extracelular (MEC). Todos esses eventos acarretam em uma perda morfológica e funcional tanto do hepatócito quanto do órgão (Iredale 2007).

3 ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS ESTRELADAS NA FIBROSE HEPÁTICA

As células estreladas foram descritas pela primeira vez por Kupffer em 1876, chamadas de "sternzellen" (célula estrelada). Após muitos anos de várias caracterizações histológicas sob diversos nomes como: células perisinusoidais, células parasinusoidais, pericitos hepáticos, lipócitos, células armazenadoras de gordura, célula de Ito, vários pesquisadores concordaram em chamá-la de células estreladas hepáticas, cuja principal característica é a presença de gotículas de vitamina A, palmitato de retinol (Atzori, Poli et al. 2009).

Em resposta a uma lesão, as CEH liberam gotículas de vitamina A, sofrendo assim alterações morfológicas e funcionais, num processo de ativação que leva ao seu fenótipo de miofibroblasto e à produção excessiva de colágeno tipo I, estando envolvida na produção excessiva de MEC. Além disso, adquirem várias novas características, tais como migração celular e adesão, expressão α -SMA, aumento da proliferação, produção de substâncias quimiotáticas capazes de recrutar células inflamatórias, bem como outras CEHs, contratilidade, perda da capacidade de armazenamento de retinóide normal, aumento das cisternas do retículo endoplasmático rugoso, mudanças no citoesqueleto, organização e morfologia celular e, mais importante, a aquisição de capacidade fibrogênicas (esquema 4) (Moreira 2007).

O processo de ativação das CEHs foi dividido em duas fases distintas. Na primeira fase, ou fase de iniciação, as CEHs sofrem diferenciação em miofibroblastos e tornam-se mais proliferativas e fibrogênicas pelo aumento da regulação dos receptores de membrana para citocinas. Essa superexpressão de receptores para citocinas inflamatórias induz a fibrogênese, a proliferação celular e outras características do fenótipo ativado. Esse fenótipo é perpetuado pela liberação contínua de mediadores crônicos da inflamação pelo tecido lesionado. Esta segunda fase do processo de ativação foi denominada a fase de perpetuação. Vários tipos de células presentes no fígado normal, tais como hepatócitos, células de Kupffer, células endoteliais sinusoidais e CEHs, têm sido implicados na produção de mediadores da inflamação e citocinas neste processo. Uma vez ativadas, as CEHs passam a regular positivamente a expressão gênica de componentes da matriz extracelular, enzimas de degradação da matriz (MMPs) e seus respectivos

inibidores (TIMPs), resultando no remodelamento da matriz em locais com grande número dessas células (esquema 4) (Moreira 2007). Portanto, as CEHs ativadas participam de um processo dinâmico de contínua produção de matriz extracelular durante o estabelecimento de uma lesão crônica do fígado, o que leva a um acúmulo excessivo de várias proteínas, proteoglicanos e carboidratos. Entretanto, a apoptose das CEH ativadas levam a resolução da fibrose hepática (Moreira 2007; Malhi e Gores 2008; Atzori, Poli et al. 2009).



Esquema 4: Alterações fenotípicas das células estreladas hepáticas (CEHs) durante a ativação na lesão do fígado. Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); Endotelina (ET); Fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF-β1); Metaloproteinases de matriz (MMP-2); Proteína quimiotática de monócitos (MCP) e glóbulos brancos (WBC) (Moreira 2007).

4 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são células indiferenciadas com ilimitada capacidade proliferativa. Há dois tipos de células-tronco que apresentam grande potencial terapêutico: as células-tronco embrionárias (CTE) e as células-tronco adultas. As CTE são células pluripotentes, ou seja, capazes de se diferenciar em qualquer tipo celular do corpo humano, exceto em células da linhagem germinal primordial. Em relação as células-tronco adultas são muitas as fontes de células-tronco tecido-específicas, incluindo as derivadas da medula óssea, as do sangue de cordão umbilical, placenta e líquido amniótico, as quais representam substratos potenciais na terapia com células-tronco, devido à capacidade de se diferenciarem em inúmeras linhagens celulares (Gilchrist e Plevris 2010).

4.1 Células tronco de medula óssea (CTMO)

Existem duas populações de células-tronco na medula óssea que coexistem de maneira funcionalmente interdependente: as células tronco hematopoiéticas – CTHs e as células-tronco mesenquimais – CTMs, do estroma da medula óssea (Gilchrist e Plevris 2010; Mendez-Otero, Valle et al. 2007).

Entre o grande número de células-tronco adultas, a célula-tronco hematopoiética (CTH) foi a primeira a ser descrita, sendo ainda a melhor compreendida e a mais amplamente aplicada em protocolos clínicos. O tecido hematopoiético é considerado de fácil acesso – sangue periférico, medula óssea e sangue de cordão umbilical – tanto em indivíduos normais quanto nos afetados por doenças como anemias e leucemias. A fácil coleta dessas células propiciou seu estudo *in vitro* muito precocemente (Gilchrist e Plevris 2010; Cantz, Bleidissel et al. 2008; Sancho-Bru, Najimi et al. 2009).

A CTH pode ser definida funcionalmente pela sua capacidade de regenerar e manter todas as células linfóides e mielóides maduras do tecido sanguíneo, medula óssea, baço e timo. Além disso, a CTH possui três características típicas de células-

tronco: (1) são multipotentes, pois geram progenitores de pelo menos oito das hematopoiéticas: linfócitos Т Β, principais linhagens е eritrócitos, megacariócitos/plaquetas, basófilos/mastócitos, eosinófilos, neutrófilos/granulócitos e monócitos/macrófagos; (2) possuem um potencial muito alto de proliferação; (3) são capazes de proliferar sem sofrer diferenciação, fenômeno chamado de autorenovação. A sua capacidade de se auto-renovar é de extrema importância para a manutenção do número normal de CTHs em cada indivíduo, uma vez que elas são constantemente recrutadas para a diferenciação após estresses fisiológicos (como na hipóxia, onde as CTHs devem aumentar os números de eritrócitos) ou patológicos (como em infecções, para amplificar granulócitos e macrófagos) (Szilvassy 2003; Bellantuono 2004; Wilson, Oser et al. 2007).

4.2 CTMO na regeneração hepática

A regeneração hepática constitui um mecanismo fisiológico frente a uma lesão ou intoxicação. Nesta situação, as células do fígado sofrem um estímulo mitogênico efetuado por citocinas como HGF (fatores de crescimento do hepatócito), produzidas por células-tronco intra-hepáticas (células ovais), se tornam ativadas, expressando receptores para citocinas pró-inflamatórias e liberando diversos fatores quimiotáticos que participam direta ou indiretamente na migração das CTHs para esse órgão, como interleucinas, TGF-β1 e metaloproteinases de matriz (MMPs) (Eroglu, Demirci et al. 2002).

Estudos demonstraram que as CTHs regeneram um fígado lesionado, basicamente de duas formas: fusionando-as a hepatócitos pré-existentes e ou, transdiferenciando-se totalmente em hepatócitos (Thorgeirsson e Grisham 2006).

Quando ocorre uma perda de hepatócitos anormais, o fígado regenera, restabelecendo juntamente a funçao hepática. Em lesões hepáticas graves (hepatite crônica viral) ou senescência replicativa (esteatose hepática), ocorre a ativação facultativa de células-tronco localizadas na árvore intra-hepática biliar, que podem se diferenciar em hepatócitos e células epiteliais biliares. As células-tronco derivadas da medula óssea contribuem para a regeneração ao se fusionar com hepatócitos

com defeitos inatos do metabolismo, contribuindo para o restabelecimento da função hepática (Alison, Islam et al. 2009).

Diferentes estudos demonstram que a metaloproteinase 9 (MMP-9) atua na liberação das células-tronco progenitoras endógenas da medula óssea para a circulação ao clivar moléculas de adesão que participam das interações das CTHs com células estromais da medula. Sabe-se que a MMP-9 tem sua expressão aumentada e papel ativo na remodelação hepática em uma situação de fibrose, cirrose ou inflamação (Jin, Zhai et al. 2008).

5 **APOPTOSE**

5.1 Características

A morte celular ocorre por necrose ou por apoptose sob condições fisiológicas normais (esquema 5). A necrose ocorre geralmente em resposta a uma injúria severa às células e é caracterizada morfologicamente por turgidez citoplasmática e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo intracelular, levando a uma resposta inflamatória, que causa uma lesão e até morte de células vizinhas, condensação da cromatina nuclear (picnose) e a fragmentação do núcleo picnótico (cariorréxis). Nesta condição um grande número de células é afetado e lesado ao mesmo tempo, e devido ao desencadeamento do processo inflamatório há alterações irreversíveis no tecido ou órgão afetado (Curtin, Donovan et al. 2002; Elmore 2007).

As células privadas de fatores mantenedores da sobrevivência, danificadas, ou senescentes, iniciam um processo de morte celular programada ordenadamente regulado chamado apoptose (do grego, *apo*, desligar; *ptosis*, queda) que participa da homeostase dos tecidos (Kierszenbaum, 2008). A apoptose apresenta características morfológicas e bioquímicas específicas como o rompimento do citoesqueleto, retração celular, perda de contato com células adjacentes, brotamentos da membrana plasmática (*Blebs*), condensação da cromatina (picnose), fragmentação do DNA internucleossomal e mitocondrial e formação de corpos apoptóticos (Kroemer e Martin 2005; Elmore 2007).





Existem duas vias principais intracelulares que podem levar a apoptose: a via extrínseca, que envolve o receptor de morte celular da família TNF/Fas (Fator de Necrose Tumoral/ Fatty acid synthetase - Ácido Graxo sintetase), e a via intrínseca, que envolve a mitocôndria (Kroemer e Martin, 2005; Jourdain e Martinou, 2009). A via extrínseca é iniciada pela ligação de FasL (Fatty acid synthetase ligand /Ligante de ácido graxo sintetase) ou TNF-α (Tumor necrosis factor alpha / Fator de necrose tumoral-alfa) aos respectivos receptores de morte transmembranares, levando a ativação da caspase-8, a qual ativa as caspases efetoras 3 e 7, responsáveis pela morte da célula. Por sua vez, a via intrínseca é ativada por diversos fatores que levam ao estresse ou dano celular, que recrutem um ou mais membros da família de proteínas BH3-only, como BID (BH3 interacting domain death agonist / Agonista de morte com domínio de interação BH3). Essas proteínas ativam e promovem a homodimerização de proteínas pró-apoptóticas, com a formação do complexo Bax (BCL2 associated X protein / Proteína X associada à BCL-2) / Bak (BCL2 antagonist

killer 1/ Antagonista de BCL-2 ou fator de morte 1) na membrana mitocondrial externa. Esse complexo forma poros que prejudicam a permeabilidade dessa membrana, possibilitando a saída de fatores pró-apoptóticos adicionais, como o citcromo c, do espaço intermembrana mitocondrial para o citosol. O citocromo c no citosol ativa a caspase-9, que se associa a APAF-1 (Apoptosis protease activating factor-1 / Fator ativador de protease da apoptose 1) para formar o apoptossomo, que ativa as caspases efetoras 3 e 7, provocando a morte da célula. Além disso, existem fatores anti-apoptóticos, como a proteína Bcl-2 (B-cell lymphoma protein 2 / Proteína do linfoma de células B 2), que formam heterodímeros com proteínas pró-apoptóticas como Bax, que impedem a formação de poros na membrana mitocondrial e inibem a apoptose. Pode ocorrer ativação da via intrínseca pela via extrínseca, quando a caspase-8 ativa a proteólise da proteína BH3-only (esquema 6) (Parone e Martinou 2006; Elmore 2007; Taylor, Cullen et al. 2008; Clarke e Allan 2009).



Esquema 6: Vias extrínseca e intrínseca da apoptose (Petros, Olejniczak et al. 2004).

Bioquimicamente a apoptose é iniciada e executada pela ativação de enzimas intracelulares chamadas caspases, as quais são um grupo de proteases com um resíduo de cisteína capazes de clivar outras proteínas depois de um resíduo de ácido aspártico. O nome "caspase" é derivado dessa função molecular característica: **c**ysteine-**asp**artic-acid-prote**ases**. As caspases são sintetizadas como precursores inativos (zimogênios), e são ativadas após clivagem específica dos resíduos de aspartato. Caspases iniciadoras, incluindo -8, -9 e -10, são recrutadas para grandes complexos de proteína, como o DISC (death inducing signaling complex / complexo de sinalização indutor de morte) ou o apoptossomo após a ativação das vias de morte extrínseca ou intrínsea. Estas caspases clivam e ativam, principalmente, as caspases efetoras -3, -6 e -7 (Malhi, Guicciardi et al. 2010; Schulze-Bergkamen, Schuchmann et al. 2006; Pop e Salvesen 2009).

Uma característica importante da apoptose é a ausência de uma resposta inflamatória devido à manutenção da integridade dos fragmentos subcelulares, evitando assim a liberação do conteúdo tóxico intercelular (Kanzler e Galle 2000). Entretanto, sabe-se que a apoptose é freqüentemente desregulada em patologias como câncer, doenças degenerativas ou infecções virais (Jourdain e Martinou 2009).

5.2 Apoptose das células hepáticas na fibrose hepática

Os primeiros estudos sobre apoptose abordavam a atrofia do fígado após a restrição do fornecimento de sangue através da ligadura da veia porta, quando se percebeu a capacidade regenerativa do fígado. Esse experimento permitiu demonstrar que a população de células hepáticas poderia manter o equilíbrio, não só pela proliferação, mas por algum tipo de morte controlada, participando da manutenção da homeostase celular, controle do tamanho do órgão, regeneração e reparo celular. Provavelmente as células teriam desenvolvido capacidade genética para a apoptose espontânea (Afford e Randhawa 2000).

A morte celular programada no fígado permite o *turnover* fisiológico dos hepatócitos e eficiente remoção de células indesejáveis, tais como células velhas ou infectadas com vírus. Nas diferentes doenças hepáticas, observa-se comportamento distinto com relação a apoptose. Doenças hepáticas agudas, como insuficiência

hepática fulminante (IHF) apresentam apoptose maciça e descontrolada, enquanto que doenças crônicas apresentam apoptose persistente, e, por sua vez, o carcinoma hepatocelular caracteriza-se pela resistência das células tumorais à apoptose (Schulze-Bergkamen, Schuchmann et al. 2006).

No fígado, os corpos apoptóticos são removidos por fagocitose, principalmente por células de Kupffer e pelas CEHs. Esse processo não é acompanhado por reações inflamatórias em condições fisiológicas. No entanto, em condições patológicas, esses corpos apoptóticos não são removidos de maneira eficiente, e a apoptose pode acompanhar reações inflamatórias, com a infiltração de neutrófilos resultando na ativação de CEH e na fibrose hepática. Além disso, a eliminação insuficiente de corpos apoptóticos pode disparar os mecanismos de necrose (Schulze-Bergkamen, Schuchmann et al. 2006).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que a apoptose dos hepatócitos é uma característica proeminente da doença hepática colestática. As estratégias terapêuticas para essa doença visam inibir a apoptose dos hepatócitos com o objetivo de diminuir a inflamação e fibrose, e promover a apoptose de CEH com o objetivo de impedir a fibrogênese (Malhi e Gores 2008).

No fígado sob estresse ou lesão, a apoptose de hepatócitos vulneráveis pode ser iniciada através de células de Kupffer pela liberação de TNF- α , levando a ativação de proteínas JNK (C-jun N-terminal kinase / quinase de C-jun N-terminal). A ativação das células Natural Killer (NK) e Natural killer T (NKT) liberam proteína Fas e IFN- γ (interferon-gama), que aumentam a liberação de FasL, levando à apoptose mediada por receptor de morte dos hepatócitos. Por sua vez, os corpos apoptóticos desses hepatócitos, ao serem fagocitados propagam a ativação de células de Kupffer, que passam a secretar mais TNF- α , interleucinas e IFN- γ , promovendo uma resposta inflamatória cíclica. Além disso, as células de Kupffer ativadas também secretam TGF- β que ativa as CEHs (esquema 7) (Malhi, Guicciardi et al. 2010; Schulze-Bergkamen, Schuchmann et al. 2006; Malhi e Gores 2008).



Esquema 7: Gênese da fibrose hepática, destacando a apoptose do hepatócito, a ativação das CEHs e as células de Kupffer (Malhi e Gores, 2008).

A lesão do fígado pode ser expressa pela atividade das caspases. Por exemplo, o aumento na ativação das caspases pode ser encontrado em biópsias de fígados e soros de pacientes com hepatite C. Além disso, a atividade das caspases está correlacionada com o grau de esteatose e da progressão da fibrose hepática (Malhi, Guicciardi et al. 2010; Schulze-Bergkamen, Schuchmann et al. 2006; Pop e Salvesen 2009). No entanto, a interferência com vias de morte celular nas doenças hepáticas, por exemplo, a inibição de caspases, pode não ser eficaz em condições fisiopatológicas crônicas mais complexas. Além disso, a supressão de uma única caspase pode ter efeito apenas localizado e parcial na morte celular, enquanto inibidores de caspases de largo espectro podem inibir proteases independentes, cuja atividade pode ser necessária para a sobrevivência. O bloqueio de morte celular no fígado pode não só promover a sobrevivência de hepatócitos, mas também de células potencialmente prejudiciais e inflamatórias, incluindo as células

NKT hepáticas. Um esquema de terapia anti-apoptótica também pode desencadear a fibrose do fígado, impedindo morte celular das CEH ativadas (Schulze-Bergkamen, Schuchmann et al. 2006).

Finalmente, a promoção de sobrevivência das células em lesões hepáticas pode favorecer a carcinogênese do carcinoma hepatocelular, uma vez que a morte de células anormais do fígado é um processo importante para evitar a expansão clonal e formação de tumores (esquema 8) (Schulze-Bergkamen, Schuchmann et al. 2006).



Esquema 8: Consequências de terapias anti-apoptóticas nas doenças hepáticas. Detecção de vias de morte no fígado representa uma poderosa ferramenta para o tratamento de doenças hepáticas. No entanto, alguns efeitos colaterais devem ser considerados. Senescência: um programa de transdução de sinal levando ao ciclo celular irreversível das células estreladas hepáticas (CEHs) (Schulze-Bergkamen, Schuchmann et al. 2006).

A matriz extracelular é um reconhecido mediador da sobrevivência e proliferação celular. Moléculas de colágeno tipo I intactas promovem a persistência de CEH ativadas *in vivo*. Da mesma forma, estudos mostraram que a degradação do colágeno-1 é fundamental para a indução de apoptose das CEH durante a recuperação da fibrose hepática. O tratamento de CEH *in vitro* com

metaloproteinase-9 (MMP-9) recombinante estimula a apoptose dessas células. Portanto, a degradação da matriz parece promover a apoptose da CEH (Elsharkawy, Oakley et al. 2005).

Há evidências da importância de TIMP-1 na sobrevivência de CEH. TIMP-1 tem se mostrado ser um inibidor de apoptose de muitas células de mamíferos ativando cinases de adesão focal, fosfatidilinositol 3-quinase, ERKs (extracellular signal-regulated kinases / quinases reguladas por sinal extracelular) e resultando em regulação diminuída das vias de morte caspase-dependente de células. Dessa forma, o tratamento *in vitro* de CEH em apoptose com TIMP-1 resultou em um efeito antiapoptótico com atividade reduzida de caspase 3, acrescentando novas provas da importância da matriz extracelular para a sobrevivência de CEH (Elsharkawy, Oakley et al. 2005).

Em conjunto, esses estudos sugerem que, com a lesão hepática, as CEHs são ativadas e estimuladas a secretar grandes quantidades de colágeno tipo 1 e TIMP-1. Estes agem para proteger a célula da apoptose e manter o ambiente fibrogênico através da ação com as integrinas. Com a resolução da fibrose, os sinais de sobrevivência das CEHs são removidos e as CEHs sofrem apoptose. Isso, então remove a fonte de TIMP, com o consequente aumento da atividade de MMP e posterior remoção de sinais de sobrevivência das CEH, levando-as à apoptose e à regeneração do fígado (Elsharkawy, Oakley et al. 2005).

As integrinas também têm se mostrado importantes para sobrevivência das CEHs. Após a ativação, as CEHs expressam quantidades crescentes de integrinas $\alpha\nu\beta$ 3. A inibição dessa integrina por anticorpo específico ou RNA de interferência resultou na apoptose das CEHs associadas a uma redução na razão Bcl-2/Bax, bem como um aumento na atividade de caspase 3 (Elsharkawy, Oakley et al. 2005).

Uma vez que foi demonstrado que as células-tronco e células mononucleares totais de medula óssea podem contribuir para a regeneração e diminuição da fibrose hepática (Carvalho, Lira et al. 2010), esse estudo visou investigar as CEHs ativadas e a apoptose das células hepáticas nas etapas de progressão da fibrose induzida por ligadura de ducto biliar, bem como na regeneração da fibrose hepática após transplante de células mononucleares de medula óssea. A quantificação dessas CEHs e a apoptose das células do fígado nessas fases foram analisadas a fim de elucidar os efeitos do transplante de células de medula óssea no fígado com fibrose.

6 JUSTIFICATIVA

Atualmente, o único tratamento efetivo disponível para a cirrose é o transplante de fígado. Entretanto, a carência de órgãos, dentre outros fatores, limita esse tratamento e leva à necessidade iminente do desenvolvimento de novas terapias anti-fibróticas. Recentemente, o transplante de células-tronco de medula óssea tem sido empregado como terapia celular em diferentes patologias, incluindo as doenças hepáticas. Dessa forma, compreender os mecanismos de atuação dessas células-tronco na regeneração do fígado fibrótico é de extrema importância.

Já está bem estabelecido que as CEHs ativadas são peças-chave no desenvolvimento da fibrose hepática. Portanto, a quantificação dessas CEHs bem como o estudo da apoptose das células do fígado é de grande interesse uma vez que pretende avançar na compreensão dos mecanismos de interação e modulação das células mononucleares de medula óssea sobre as células hepáticas durante a terapia celular em ratos com fibrose hepática induzida por ligadura do ducto biliar.

7 **OBJETIVOS**

1- Quantificar as CEHs ativadas no fígado com fibrose após o transplante de células mononucleares de medula óssea por microscopia de luz.

2- Analisar o processo de apoptose no fígado com fibrose após o transplante de células mononucleares de medula óssea por microscopia de luz, microscopia confocal e western blotting.

8 METODOLOGIA

O protocolo de manuseio e experimentação dos animais foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (n.º do protocolo: 239/2008). Todos os procedimentos seguiram a regulamentação existente sobre experimentação com animais (Marques, Morales et al. 2009)

8.1 Indução por ligadura do ducto biliar e transplante de células mononucleares da medula óssea

Ratos Wistar adultos (3 meses de idade) pesando cerca de 300g foram anestesiados com halotano volátil e, após a assepsia do campo cirúrgico, foi feita uma incisão na cavidade peritoneal, com o isolamento do duodeno e do ducto colédoco (esquema 9: A, B e C). Em seguida foi realizada a ligadura seguida de ressecção do colédoco com fio de poliglactina 5-0 (Vycril[®], Ethicon -Johnson & Johnson) (esquema 9: D, E e F).

Após 14 dias de ligadura do ducto biliar a fibrose hepática está estabelecida, e os ratos receberam transplante de células mononucleares de medula óssea previamente isoladas, através de injeção pela veia jugular.



Esquema 9: Cirurgia de ligadura do ducto biliar (LDB).

8.2 Isolamento de CMMO de ratos

Os fêmures e tíbias de ratos Wistar machos de 2 meses de idade foram dissecados e as epífises, cortadas. Em seguida foi injetado meio de cultura DMEM (Sigma) com uma agulha de 20G nas extremidades medulares expostas para coleta das células (esquema 10: A, B, C e D). Após centrifugação a 1.500 RPM por 15 min, as células foram ressuspendidas em 5 mL de DMEM e submetidas a um gradiente de centrifugação com Ficoll-Hystopaque 1077 (Sigma) a 2.000 RPM por 30 min (esquema 10: E, F e G). O anel contendo células mononucleares foi coletado e lavado 6 vezes com DMEM a 1.500 RPM por 8 min. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer e transplantadas nos ratos receptores (Carvalho, Cortez et al. 2008) com fibrose hepática em um número de 2 x 10^7 células.



Esquema 10: Isolamento de CMMO de ratos (Carvalho 2008).

8.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos como se segue (n = 5 em cada grupo) (esquema 11):

Grupo 1 – ratos Wistar normais com 4 meses de idade.

Grupo 2 - ratos que foram submetidos à cirurgia de LDB para indução de fibrose hepática e sacrificados após 14 dias.

Grupo 3 - ratos que foram submetidos à cirurgia de LDB para indução de fibrose hepática e sacrificados após 21 dias.

Grupo 4 - ratos que foram submetidos à cirurgia de LDB para indução de fibrose hepática, receberam injeção de células mononucleares de medula óssea (CMMO) pela veia jugular no 14º dia após a cirurgia, e foram sacrificados 7 dias após o transplante de células, totalizando 21 dias de fibrose hepática. Esse grupo foi comparado diretamente com o grupo 3.



Esquema 11: Organização dos grupos controle e com fibrose hepática.

8.4 Expressão e quantificação de α-SMA

Após o sacrifício dos animais, os fígados foram coletados, fixados em paraformaldeído a 4% durante 3 dias, lavados em água corrente por 1h e incubados em séries crescentes de álcool para desidratação por 30 min cada (30%, 50%, 70%, 90% e duas séries de 100%). A clarificação foi realizada em duas séries de xilol por 30 min, seguida de imersão no primeiro banho de parafina por 30 min, segundo banho de parafina por 1h e finalmente a inclusão em parafina. Após a microtomia dos blocos, os cortes de 5 μm foram aderidos em lâminas silanizadas.

Os cortes do tecido hepático foram processados para imunoperoxidase, iniciando com incubação com o anticorpo primário monoclonal anti- α -SMA de rato obtido em camundongo (Santa Cruz Biotechnology) por 2h. A reação antígeno-anticorpo foi revelada através do kit DAKO LSAB (Labelled Streptavidin-Biotin), que fornece o anticorpo biotinilado, estreptavidina peroxidase e o cromógeno diaminobenzidina (DAB). Em seguida, as lâminas foram coradas com hematoxilina, montadas com Entellan (Sigma) e observadas ao microscópio de luz (esquema 12 A). As imagens foram capturadas mostrando as CEH ativadas e miofibroblastos, positivos para α -SMA em castanho (esquema 12 B) e os grupos experimentais foram quantificados com o auxílio do software Image-Pro Plus, que identifica e quantificam as áreas positivas para α -SMA em preto e branco, os pontos brancos representam a marcação de α -SMA (esquema 12 C). Os números foram expressos como porcentagem de área marcada para α -SMA, e as diferenças entre os grupos foram analisadas com o programa Graph Pad Prism 5.0.



Esquema 12: Quantificação de α -SMA. Imagem obtida no microscópio de luz (A), fotografada e mostrando positivo para α -SMA em castanho (B) e analisada no programa Image-Pro Plus que identifica e quantifica as áreas positivas para α -SMA em preto e branco (C).

8.5 Detecção de apoptose

8.5.1 Por imunoperoxidase

Para a avaliação de apoptose, os cortes do tecido hepático previamente incluído em parafina foram imunomarcados com o anticorpo primário policional anti-Caspase-3 (fator apoptótico) de rato obtido em cabra (Santa Cruz Biotechnology). A reação antígeno-anticorpo foi revelada através do kit DAKO LSAB (Labelled Streptavidin-Biotin), que fornece o anticorpo biotinilado, estreptavidina peroxidase e o cromógeno diaminobenzidina (DAB). Em seguida, as lâminas foram coradas com hematoxilina, montadas com Entellan (Sigma) e observadas ao microscópio de luz.

8.5.2 Por imunofluorescência com dupla marcação

Para a análise da apoptose em CEH ativadas e miofibroblastos, foi realizada a imunofluorescência com dupla marcação para α -SMA e Caspase-3. Após o sacrifício dos animais, os fígados foram coletados, congelados e preservados em nitrogênio líquido. Após inclusão com resina hidrofílica Tissue Tek, foram realizados cortes de 10 µm no criostato, aderidos em lâminas silanizadas e fixados em acetona PA por 10 min. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS-BSA (albumina de soro bovino) 1% por 3 vezes, incubados com PBS-BSA 5% por 1 hora, e incubados com anticorpos primários anti- α -SMA de rato obtido em camundongo e anti-Caspase-3 de rato obtido em cabra (ambos Santa Cruz Biotechnology) overnight. Após incubação com PBS-BSA 5%, foram adicionados os anticorpos secundários anti-camundongo conjugado com Alexa 488 (verde) e anti-cabra conjugado com Alexa 555 (vermelho) por 1h. Após a lavagem com PBS, os núcleos foram corados com DAPI e as lâminas foram montadas com SlowFade (Invitrogen). Os cortes foram observados no microscópio confocal de varredura a laser LSM META (Zeiss).

8.5.3 Processamento para Western blotting

Fragmentos de fígado (100 mg) dos grupos experimentais foram lisados em Tampão de Lise contendo 1% triton x-100, 100mM tris (pH 7,4), 100mM pirofosfato de sódio, 10mM EDTA, 10mM vanadato de sódio, e inibidores de proteases PMSF e aprotinina. Os fragmentos foram macerados mecanicamente e depois dissociados em sonicador. Após centrifugação a 10.000 RPM por 10 min, o sobrenadante foi coletado. Após dosagem de proteínas totais pelo método BCA, foi adicionado o tampão de amostra e as amostras foram mantidas a -20°C até a análise.

As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida a 12% por 1h a 150V. Após a corrida, as proteínas foram transferidas a uma membrana de PVDF (Bio-Rad) por 1h a 15V. Após a transferência, a membrana foi bloqueada overnight com solução de PBS e Tween 20 a 0,1% (TBS) contendo albumina a 5%. Em seguida, a membrana foi incubada overnight com o anticorpo primário policlonal anti-caspase 3 de rato obtido em cabra (Santa Cruz Biotechnology) 1:500 diluído em TBS. Após lavagem da membrana com TBS 3x, foi adicionado o anticorpo secundário biotinilado anti-cabra (Invitrogen) 1:10.000 em TBS por 1h. A membrana foi novamente lavada com TBS 3x e incubada com estreptavidina-peroxidase (Invitrogen) 1:10.000 em TBS por 1h. Finalmente, a membrana foi incubada por 5 min com a solução quimioluminescente contendo peróxido de hidrogênio – ECL (Thermo). A membrana foi exposta a um filme fotográfico em câmara escura e, após a revelação, as bandas obtidas pela reação das regiões quimioluminescentes com o filme foram analisadas por densitometria no programa Photoshop CS. Os números obtidos foram definidos como unidades arbitrárias.

8.6 Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como a média ± desvio-padrão. Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste estatístico ANOVA seguido de pós-teste de Tukey no programa GraphPad Prism 5.0, utilizando índice de significância P<0.05.

9 **RESULTADOS**

9.1 Análise quantitativa de células estreladas hepáticas/miofibroblastos

No fígado normal (figura 1a), a expressão de α -SMA é observada somente na túnica média dos vasos portais e das veias centrolobulares. Após 14 dias de LDB são observadas inúmeras células expressando α -SMA, localizadas nos espaços perisinusoidais (células estreladas hepáticas ativadas) e nos espaços porta (miofibroblastos), onde se formam os septos fibrosos ricos em colágeno característicos da fibrose hepática (figura 1b). Já está estabelecido que no modelo de LDB, nessas regiões portais também ocorre intensa proliferação de colangiócitos dos ductos biliares, juntamente com a deposição de matriz extracelular nos septos. Essas características continuam a progredir nos fígados obtidos 21 dias após a LDB (figura 1c), que apresentam também aumento da expressão de α -SMA em torno dos ductos biliares nas áreas portais. Entretanto, os fígados de animais que receberam transplante de CMMO (figura 1d), apresentaram menor expressão de α -SMA que os de animais com 14 e 21 dias de LDB, com aspecto semelhante ao fígado normal.

A quantificação no programa Image Pro Plus demonstrou que os fígados com fibrose obtidos após 14 dias da LDB apresentaram níveis significativamente mais elevados de α -SMA (3,66 ± 1,08) em comparação com fígados normais (0,26 ± 0,12) (figura 2). Entretanto, os fígados de ratos com fibrose tratados com CMMO exibiram significativamente menos α -SMA (0,43 ± 0,38) do que os de ratos com fibrose de 21 dias (4,23 ± 1,15), p <0,05.



Imunoperoxidase para expressão de α-SMA

Figura 1: Imunoperoxidase para expressão de α -SMA. No grupo de animais de fígado normal (a), a expressão de α -SMA é observada somente na túnica média dos vasos portais e das veias centrolobulares. No grupo de animais de 14 dias de LDB (b), aumento da expressão de α -SMA é observada nos espaços perisinusoidais (CEHs ativadas/setas). No grupo de animais de 21 dias após a LDB (c), é observado aumento da expressão de α -SMA nas áreas portais (miofibroblastos/setas). No grupo de animais que receberam transplante de CMMO (d), observou-se menor expressão de α -SMA, semelhante ao fígado normal. Objetiva 40X.

Quantificação de α-SMA



Figura 2: O grupo de animais após 14 dias da LDB apresentaram níveis significativamente mais elevados de α -SMA (3,66 ± 1,08) em comparação com o grupo de animais normais (0,26 ± 0,12). No grupo de animais com fibrose tratados com CMMO exibiram significativamente menos α -SMA (0,43 ± 0,38) em comparação com o grupo de animais após 21 dias da LDB (4,23 ± 1,15), p <0,05.

9.2 Imunoperoxidase para Caspase-3

No fígado normal (figura 3a), há pouca expressão de caspase-3, distribuída pelo parênquima hepático organizado. No fígado com fibrose obtida 14 dias após a LDB (figura 3b), ocorre maior expressão de caspase 3 em hepatócitos e em células sinusoidais, acompanhada da desorganização do parênquima hepático e de região com fibrose. No fígado com fibrose obtido 21 dias após a LDB (figura 3c), observase marcação de caspase semelhante ao fígado obtido 14 dias após a LDB. No entanto, o fígado dos animais com 14 dias de fibrose hepática que receberam CMMO e foram sacrificados após 7 dias apresentou aumento da expressão de caspase-3 em hepatócitos, em comparação com os grupos anteriores (figura 3d). Objetiva 40X.

Imunoperoxidase para caspase-3



Figura 3: Imunoperoxidase para caspase-3 por microscopia de luz (comparação entre os grupos). O grupo normal mostrou pouca expressão de caspase-3 (a). No grupo obtido 14 dias após a LDB, ocorreu expressão de caspase 3 em hepatócitos e em algumas células sinusoidais, acompanhada da desorganização do parênquima hepático próximo a área de fibrose (b/seta). No grupo obtido 21 dias após a LDB, observou-se marcação de caspase-3 no parênquima hepático (c). No grupo de animais de 14 dias de LDB que receberam transplante de CMMO (d), foi observado aumento acentuado da expressão de caspase-3 principalmente em hepatócitos em comparação com os grupos anteriores (a e b). Objetiva 40X.

9.3 Western blotting para caspase 3

A análise das proteínas no fígado normal demonstrou pouca expressão de caspase-3, conforme observado em microscopia de luz e fluorescência. No fígado com fibrose obtido 14 dias após a LDB ocorreu aumento no conteúdo de caspase-3. Entretanto, no fígado fibrótico obtido após 21 dias de LDB o conteúdo para caspase-3 está diminuída. O fígado de ratos com 14 dias de fibrose hepática que receberam CMMO e foram sacrificados após 7 dias demonstrou aumento significativo no conteúdo de caspase-3 em comparação com o grupo de 21 dias de LDB (figura 4).

No gráfico podemos corroborar os resultados do western blotting, onde o fígado normal apresentou níveis baixos de caspase-3 (0,045 ± 0,012), os fígados de ratos com fibrose hepática após 14 dias de LDB apresentaram um aumento no nível de caspase-3 (0,096 ± 0,019), os fígados de ratos com fibrose hepática após 21 dias de LDB apresentaram diminuição do nível de caspase-3 (0,064 ± 0,036) e os fígados de ratos com fibrose tratados CMMO exibiram significativamente maior conteúdo de caspase-3 (0,222 ± 0,070) (figura 4).

Western blotting para caspase 3



Figura 4: Western blotting para caspase 3. O grupo de animais após 14 dias da LDB apresentaram níveis significativamente mais elevados de caspase-3 (0,096 \pm 0,019) em comparação com o grupo de animais normais (0,045 \pm 0,012). No grupo de animais com fibrose tratados com CMMO exibiram níveis significativamente mais elevados de caspase-3 (0,222 \pm 0,070) em comparação com o grupo de animais após 21 dias da LDB (0,064 \pm 0,036), p <0,05.

9.4 Imunofluorescência com dupla marcação para α-SMA e caspase-3

O fígado normal (figura 5a) mostrou pouca expressão de caspase-3 (vermelho). No fígado fibrótico obtido após 14 dias de LDB (figura 5b), observa-se o aumento da expressão de caspase-3, semelhante ao fígado fibrótico após 21 dias da LDB (figura 5c). No fígado dos animais com 14 dias de fibrose hepática que receberam CMMO e foram sacrificados após 7 dias foi observado aumento acentuado da expressão de caspase-3 (figura 5d).

No fígado normal (figura 6a), há pouca expressão de α -SMA (verde), em vasos portais e veias centrolobulares, bem como de Caspase-3 (vermelho). No fígado fibrótico obtido após 14 dias de LDB (figura 6b), observa-se aumento da expressão de α -SMA e da expressão de caspase-3, semelhante ao fígado fibrótico após 21 dias da LDB (figura 6c). No fígado dos animais com 14 dias de fibrose hepática que receberam CMMO e foram sacrificados após 7 dias foi observado aumento acentuado da expressão de caspase-3 (figura 6d), conforme observado na microscopia de luz, e coexpressão de α -SMA e caspase-3 em algumas células das regiões perisinusoidais e portais, indicando apoptose de células estreladas hepáticas e miofibroblastos (figuras 7 a e b). Esses resultados da expressão de α -SMA e caspase-3 podem ser comparados entre os grupos experimentais nas figuras 6 e 7.

Imunofluorescência para expressão de caspase-3



Figura 5: Imunofluorescência para expressão de caspase-3 (vermelho) observada no microscópio confocal, para comparação entre os grupos. Os núcleos foram corados com DAPI (azul). O grupo normal mostrou pouca expressão de caspase-3 (a). O grupo obtido 14 dias após a LDB (b), mostrou aumento da expressão de caspase 3, semelhante ao grupo obtido 21 dias após a LDB (c). No grupo de animais de 14 dias de LDB que receberam transplante de CMMO (d), foi observado aumento acentuado da expressão de caspase-3 em hepatócitos em comparação com os grupos anteriores.



Figura 6: Imunofluorescência para expressão de α -SMA (verde) e caspase-3 (vermelho) observada no microscópio confocal, para comparação entre os grupos. Os núcleos foram corados com DAPI (azul). O grupo normal mostrou expressão de α -SMA apenas em vasos (a). No grupo obtido 14 dias após a LDB (b), observa-se aumento da expressão de α -SMA no parênquima hepático e pouca expressão de caspase-3, semelhante ao fígado fibrótico obtido após 21 dias de LDB (c). No grupo de animais de 14 dias de LDB que receberam transplante de CMMO (d), foi observado expressão de α -SMA e aumento acentuado da expressão de caspase-3 em hepatócitos em comparação com os grupos anteriores.



Imunofluorescência mostrando a coexpressão de α-SMA e caspase-3

Figura 7: Imunofluorescência mostrando a coexpressão de α -SMA (verde) e caspase-3 (vermelho) observada no microscópio confocal no grupo de animais com 14 dias de fibrose hepática que receberam CMMO e foram analisados após 7 dias. Os núcleos foram corados com DAPI (azul). Os insets de cada imagem mostram a coexpressão de α -SMA e caspase-3 em algumas células das regiões portais e perisinusoidais, indicando apoptose de miofibroblastos / células estreladas hepáticas ativadas (a e b).

10 DISCUSSÃO

No estudo realizado, nós estabelecemos a fibrose hepática através do modelo de cirurgia de ligadura do ducto biliar (LDB) em ratos. Essa técnica tem sido empregada nos estudos de patologias hepáticas, devido à fácil obtenção da fibrose por uma rápida e simples intervenção cirúrgica, sendo uma excelente ferramenta que mantém o quadro patológico induzido sem o uso crônico de drogas hepatotóxicas (Glaser, Gaudio et al. 2009).

O modelo de LDB que utilizamos manteve assim a lesão crônica mesmo após o transplante de células mononucleares de medula óssea (CMMO). Nos fígados com fibrose obtidos 14 e 21 dias após a LDB, observamos um aumento evidente na expressão de alfa actina de músculo liso (α -SMA) em áreas de espaços porta e perisinusoidais. Nas regiões de espaço porta, essa expressão de α -SMA acompanhou a matriz extracelular rica em colágeno que forma os septos fibrosos. Como já está descrito anteriormente para o modelo de LDB (Guyot, Lepreux et al. 2006; Lefkowitch 2007; Friedman 2008), também observamos intensa proliferação de ductos biliares nessas regiões portais onde se desenvolvem os septos (Carvalho, Lira et al. 2010).

Sabe-se que as células que expressam α -SMA na fibrose hepática podem ter duas origens: (a) nos espaços perisinusoidais ou de Disse, são as células estreladas hepáticas (CEH) que se tornam ativadas após o estímulo inflamatório; e (b) nos espaços porta, essa expressão ocorre a partir da diferenciação de fibroblastos portais em miofibroblastos. Esse padrão diferencial de expressão de α -SMA pode explicar pequenas diferenças observadas na deposição de matriz nessas duas regiões, bem como diferenças na regeneração hepática (Guyot, Lepreux et al. 2006).

No entanto, observamos que 7 dias após o transplante de CMMO, ocorreu diminuição significativa da expressão de α-SMA nas áreas de espaços porta bem como nos espaços perisinusoidais de fígados fibróticos, acompanhada de melhora da citoarquitetura hepática. Trabalho anterior do nosso grupo demonstrou que o transplante dessas células está relacionado com a diminuição significativa da expressão de colágeno no parênquima hepático, e com a melhora dos níveis plasmáticos de transaminases oxaloacética e pirúvica, e de fosfatase alcalina, resgatando a função hepática comprometida (Carvalho, Lira et al. 2010). Os dados

do presente trabalho demonstraram que CMMO contribuem para a regeneração hepática, uma vez que estão relacionadas com a diminuição significativa da expressão de α-SMA, um marcador de células responsáveis pela fibrose (miofibroblastos e células estreladas hepáticas ativadas).

Nossos resultados sobre a análise da expressão de caspase-3 *por* imunoperoxidase mostraram que no fígado normal, essa expressão é reduzida a alguns hepatócitos, estando relacionada ao *turnover* fisiológico dessas células, o que está de acordo com trabalhos anteriores (Schulze-Bergkamen, Schuchmann et al. 2006). Entretanto, 14 e 21 dias após a LDB, essa expressão parece mais frequente em hepatócitos e em algumas células dos sinusóides de áreas restritas do parênquima hepático. Após o transplante de CMMO, observamos um aumento expressivo de caspase-3 nos hepatócitos e em algumas células dos sinusóides. Essa expressão pode estar relacionada com a apoptose de células responsáveis pela gênese e progressão da fibrose hepática, as CEH ativadas nos espaços perisinusoidais, e os miofibroblastos nos septos fibrosos nas regiões periportais. Conforme trabalho anterior do nosso grupo, foi descrito que o transplante de CMMO também está relacionado com a redução dos ductos biliares, os quais sofreram extensa proliferação anteriormente em resposta a LDB, e com a restauração da arquitetura normal das áreas portais (Carvalho, Lira et al. 2010).

A dupla-marcação para caspase-3 e α -SMA permitiu confirmar por microscopia confocal que as células fibrogênicas apresentaram esse marcador apoptótico no grupo que recebeu transplante de CMMO. A coexpressão de caspase-3 e α -SMA foi observada principalmente em células nas áreas portais dos fígados desses animais, demonstrando que os miofibroblastos dessas regiões podem estar sofrendo apoptose. A apoptose de células fibrogênicas é considerada como um fator decisivo para o início da regeneração hepática (Elsharkawy, Oakley et al. 2005).

A análise por western blotting confirmou os resultados obtidos por imunoperoxidase, onde o fígado normal apresentou conteúdo basal de caspase-3. Após 14 dias de indução da fibrose hepática por LDB, observamos aumento no conteúdo de caspase-3. Esse aumento está relacionado com os estímulos inflamatórios que ocorrem logo após a indução da lesão, que levam à ativação de mecanismos apoptóticos por diferentes células do parênquima hepático, seguida de desorganização da citoarquitetura e substituição por áreas de septos fibrosos nas regiões periportais, e acúmulo de matriz extracelular nos espaços perisinusoidais

(Gieling, Burt et al. 2008; Brenner 2009; Parola e Pinzani 2009). Entretanto, 21 dias após a LDB, observamos que o conteúdo de caspase-3 está diminuído, provavelmente porque a fase inflamatória inicial deu lugar à fase tardia, com estabelecimento de novas populações celulares fibrogênicas como miofibroblastos e CEH ativadas que, com a progressão da fibrose hepática, se tornam resistentes à apoptose. Esse cenário foi invertido no grupo com fibrose hepática que recebeu o transplante de CMMO, no qual foi observado aumento significativo na expressão de caspase-3.

A microscopia confocal demonstrou que parte do aumento da expressão de caspase-3 se deve a apoptose de miofibroblastos, os quais coexpressam α-SMA e caspase-3 no grupo tratado com CMMO. Entretanto, foi observado por microscopia de luz que outras células, como hepatócitos e células sinusoidais, também expressam caspase-3. A apoptose dessas células no grupo tratado pode ser devido a um mecanismo de remodelamento hepático, com a substituição de hepatócitos morfofuncionalmente prejudicados por novos hepatócitos durante a regeneração hepática induzida por CMMO (Alison, Islam et al. 2009).

Portanto, podemos concluir que o transplante de células mononucleares de medula óssea diminuiu significativamente a expressão α-SMA em fígado fibrótico de ratos após a ligadura do ducto biliar. Provavelmente, as CMMO podem secretar fatores que modulam a inflamação no fígado durante a fibrose hepática, levando a uma redução na liberação de citocinas inflamatórias a qual por sua vez pode afetar o ciclo celular de miofibroblastos e células estreladas ativadas, induzindo a apoptose (Marra, Aleffi et al. 2009).

11 CONCLUSÃO

1. O transplante de células mononucleares de medula óssea diminuiu significativamente a expressão de α-SMA no fígado de ratos com fibrose hepática após a ligadura do ducto biliar, contribuindo para a regeneração hepática devido a baixa expressão de células fibrogênicas (células estreladas ativadas / miofibroblastos).

2. Os animais com fibrose hepática e transplantados com células mononucleares de medula óssea apresentaram células coexpressando α-SMA e caspase-3 no fígado, o que está relacionado à morte de células fibrogênicas e consequente remodelamento do parênquima hepático.

REFERÊNCIAS

Afford, S. e S. Randhawa. Apoptosis. Mol Pathol. 2000; 53(2): 55-63.

Alison, M. R., S. Islam, et al. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. J Pathol. 2009; 217(2): 282-98.

Atzori, L., G. Poli, et al. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. Int J Biochem Cell Biol. 2009; 41(8-9): 1639-42.

Bataller, R. e D. A. Brenner. Liver fibrosis. J Clin Invest 2005; 115(2): 209-18.

Bellantuono, I. Haemopoietic stem cells. Int J Biochem Cell Biol. 2004; 36(4): 607-20.

Brenner, D. A. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. Trans Am Clin Climatol Assoc. 2009;120: 361-8.

Cantz, T., M. Bleidissel, et al. In vitro differentiation of reprogrammed murine somatic cells into hepatic precursor cells. Biol Chem 2008; 389(7): 889-96.

Carvalho, S.N. Análise de expressão de laminina durante o transplante de células mononucleares de medula óssea em ratos hepatectomizados [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes; 2008.

Carvalho, S., E. Cortez, et al. Laminin expression during bone marrow mononuclear cell transplantation in hepatectomized rats. Cell Biol Int 2008; 32(8): 1014-8.

Carvalho, S. N., D. C. Lira, et al. Decreased collagen types I and IV, laminin, CK-19 and alpha-SMA expression after bone marrow cell transplantation in rats with liver fibrosis. Histochem Cell Biol 2010; 134(5): 493-502.

Clarke, P. R. e L. A. Allan. Cell-cycle control in the face of damage--a matter of life or death. Trends Cell Biol 2009;19(3): 89-98.

Curtin, J. F., M. Donovan, et al. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. J Immunol Methods 2002; 265(1-2): 49-72.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 35(4): 495-516.

Elsharkawy, A. M., F. Oakley, et al. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. Apoptosis 2005;10(5): 927-39.

Eroglu, A., S. Demirci, et al. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on hepatic regeneration after 70% hepatectomy in normal and cirrhotic rats. HPB (Oxford) 2002; 4(2): 67-73.

Friedman, S. L. Hepatic fibrosis - overview. Toxicology 2008; 254(3): 120-9.

Gartner, L. P. e J. L. Hiatt). Tratado de histologia em cores. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier: 2007. p. 431.

Gieling, R. G., A. D. Burt, et al. Fibrosis and cirrhosis reversibility - molecular mechanisms. Clin Liver Dis 2008; 12(4): 915-37, xi.

Gilchrist, E. S. e J. N. Plevris (2010) "Bone marrow-derived stem cells in liver repair: 10 years down the line." Liver Transpl 16(2): 118-29.

Glaser, S. S., E. Gaudio, et al. Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. Expert Rev Mol Med 2009;11: e7.

Guyot, C., S. Lepreux, et al. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. Int J Biochem Cell Biol 2006; 38(2): 135-51.

Iredale, J. P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. J Clin Invest 2007; 117(3): 539-48.

Jiao, J., S. L. Friedman, et al. Hepatic fibrosis. Curr Opin Gastroenterol 2009; 25(3): 223-9.

Jin, F., Q. Zhai, et al. Degradation of BM SDF-1 by MMP-9: the role in G-CSFinduced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. Bone Marrow Transplant 2008; 42(9): 581-8.

Jourdain, A. e J. C. Martinou Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. Int J Biochem Cell Biol 2009; 41(10): 1884-9.

Junqueira, L. C., J. Carneiro. Histologia básica. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 323-38.

Kanzler, S., P. R. Galle. Apoptosis and the liver. Semin Cancer Biol 2000; 10(3):173-84.

Kierszenbaum, A. L. Histologia e biologia celular. 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Kmiec, Z. Cooperation of liver cells in health and disease. Adv Anat Embryol Cell Biol 2001;161: III-XIII, 1-151.

Kroemer, G. e S. J. Martin. Caspase-independent cell death. Nat Med 2005;11(7): 725-30.

Lefkowitch, J. H. Liver biopsy assessment in chronic hepatitis. Arch Med Res 2007; 38(6): 634-43.

Malarkey, D. E., K. Johnson, et al. New insights into functional aspects of liver morphology. Toxicol Pathol 2005; 33(1): 27-34.

Malhi, H. e G. J. Gores. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. Gastroenterology 2008;134(6): 1641-54.

Malhi, H., M. E. Guicciardi, et al. Hepatocyte death: a clear and present danger. Physiol Rev 2010; 90(3): 1165-94.

Marques, R. G., M. M. Morales, et al. Brazilian law for scientific use of animals. Acta Cir Bras 2009; 24(1): 69-74.

Marra, F., S. Aleffi, et al. Mononuclear cells in liver fibrosis. Semin Immunopathol 2009; 31(3): 345-58.

Mendez-Otero, R., C. Z. Valle, et al. (2007). In: Morales M. Terapias Avançadas. Células-tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde. , Ed. Atheneu.

Moreira, R. K. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. Arch Pathol Lab Med 2007;131(11): 1728-34.

Parola, M. e M. Pinzani. Hepatic wound repair. Fibrogenesis Tissue Repair 2009; 2(1): 4.

Parone, P. A. e J. C. Martinou. Mitochondrial fission and apoptosis: an ongoing trial. Biochim Biophys Acta 2006;1763(5-6): 522-30.

Petros, A. M., E. T. Olejniczak, et al. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. Biochim Biophys Acta 2004;1644(2-3): 83-94.

Pop, C. e G. S. Salvesen Human caspases: activation, specificity, and regulation. J Biol Chem 2009; 284(33): 21777-81.

Sancho-Bru, P., M. Najimi, et al. Stem and progenitor cells for liver repopulation: can we standardise the process from bench to bedside? Gut 2009; 58(4): 594-603.

Schulze-Bergkamen, H., M. Schuchmann, et al. The role of apoptosis versus oncotic necrosis in liver injury: facts or faith? J Hepatol 2006; 44(5): 984-93.

Szilvassy, S. J. The biology of hematopoietic stem cells. Arch Med Res 2003; 34(6): 446-60.

Taylor, R. C., S. P. Cullen, et al. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." Nat Rev Mol Cell Biol 2008; 9(3): 231-41.

Thorgeirsson, S. S. e J. W. Grisham. Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. Hepatology 2006; 43(1): 2-8.

Wilson, A., G. M. Oser, et al. Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. Ann N Y Acad Sci 2007;1106: 64-75.

ANEXO – Carta de submissão do artigo científico

	1						
Т •				Edit Accour	nt Instructions & Forms	Log Out	Get Help Now
177 A r						SCHO	
I V I INTERNAT	IONAL					N	
OFFICIAL JOURNAL OF THE INTERNATIONAL ASS	OCIATION FOR THE STUDY OF THE	LIVER					lanuscripts
<u>Main Menu</u> → <u>Author Dashboard</u> → Subm	ission Confirmation						
					You are I	ogged in a	as Lais Carvalho
Submission							
Confirmation							
	Thank you for submitting yo	ur manuscript to Liver Ir	nternational.				
		100 1 44 00000					
	Manuscript ID:	LIVINT-11-00638					
	Title:	Bone marrow cell trans during hepatic regenera	plantation is assoc ation in cholestatic	iated with f rats	fibrogenic cells apoptosis		
		Lira, Dalvaci					
		Carvalho, Simone Andrade, Daniela					
	Authors:	Thole, Alessandra					
		Stumbo, Ana Carvalho, Lais					
	Data Submittadu	26 Jul 2011					
	Date Submitted:	20-301-2011					
				📙 Print	D Return to Dashboard	t	