NELSON ELIAS MENDES GIBELLI

Fibrose portal e periportal na obstrução extra-hepática experimental em ratos jovens e adultos: contribuição para o estudo da atresia das vias biliares

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Clínica Cirúrgica
Orientador: Prof. Dr. João Gilberto Maksoud

SÃO PAULO
2003

A minha esposa e companheira Maria Augusta,

A minha filha Maria Carolina,

Aos meus pais.

“PARA SER GRANDE, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

Ricardo Reis

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Gilberto Maksoud, por mais esta oportunidade em minha formação acadêmica e profissional. Por sua orientação primorosa na elaboração desta tese. Por sua paciência, estímulo, ensinamentos e convivência. Sua determinação e atuação ética e profissional foram sempre estímulos e exemplos a serem seguidos.

Ao Prof. Dr. Uenis Tannuri, por sua amizade, paciência, estímulo, enorme capacidade de síntese, por seu exemplo profissional e contagiante espírito pesquisador, por sua ajuda e sugestões em todas as fases da construção desta tese.

À Profa. Dra. Consuelo Junqueira Rodrigues, por sua valiosa colaboração e orientação na análise histomorfométrica do material.

Ao Dr. Evandro Sobroza de Mello, por sua amizade, estímulo, sugestões e avaliação anatomopatológica do material.

Ao Prof. Dr. Cláudio Leone, por suas sugestões e seu auxílio na análise estatística do material.

À Srta. Dulcinéia Aparecida da Silva, pela amizade, paciência, dedicação, organização e auxílio durante toda a fase dos experimentos no Laboratório de Cirurgia Experimental.

À Sra. Neide Rosendo dos Santos, por sua dedicação e paciência no preparo histológico do material.

À Srta. Cássia Arruda, por sua amizade, dedicação, competência e presteza no preparo do material.

Aos colegas e amigos da Disciplina de Cirurgia Pediátrica do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP, Dr. Arthur Loghetti Mathias, Dr. Manoel Carlos Prieto Velhote, Dra. Maria Mercês Santos, Dr. Ali Abdul Rahman Ayoub, Dr. Marcos Marques da Silva, Dr. João Gilberto Maksoud Filho, por minha formação em cirurgia pediátrica, e também aos colegas Dr. André Ribeiro Morrone, Dra. Maria Lúcia de Pinho, Dr. Luis Ricardo Longo dos Santos, Dr. Wagner Castro Andrade, Dra. Ana Cristina Aoun Tannuri, Dr. Rodrigo Luiz Pinto Romão, Dr. Manoel Ernesto P. Gonçalves, Dra. Sílvia Regina Cardoso e Dr. Francisco César Carnevalle, pela paciência, apoio e incentivo.

À Sra. Gina Camillo Rocha, pelo auxílio na análise histomorfométrica deste estudo.

À Srta. Ana Lúcia Garippo e Sra. Ângela Batista Gomes dos Santos, pela competência, eficiência e presteza no preparo das lâminas para imuno-histoquímica.

Ao Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, pela sugestão de estudo da fibrose e fibrogênese no modelo experimental.

Ao Dr. Wagner C. Marujo, pelas sugestões iniciais na construção do modelo experimental.

Às enfermeiras e auxiliares da Enfermaria e do Centro Cirúrgico do Instituto da Criança, pela colaboração durante a experimentação.

Às funcionárias da Biblioteca do Instituto da Criança, pela ajuda na busca das referências bibliográficas.

À Profª. Luciana Soldi, pelas correções do texto final.

À Fundação Maksoud para o Desenvolvimento da Cirurgia Pediátrica, pelo apoio financeiro.

À Fundação Faculdade de Medicina, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVO.....	10
3	MATERIAL E MÉTODO.....	12
	3.1. Animal de experimentação.....	13
	3.2. Plano piloto.....	14
	3.3. Estudo experimental.....	15
	3.3.1. Procedimento cirúrgico.....	15
	3.3.2. Grupos experimentais.....	16
	3.3.3. Macroscopia.....	17
	3.3.4. Estudo histológico.....	17
	A. Hematoxilina-eosina (HE).....	18
	B. Picrosírius.....	18
	3.3.5. Estudo imuno-histoquímico.....	21
	A. Desmina.....	21
	B. Alfa-actina de músculo liso (a-AML).....	22
	3.4. Análise estatística.....	22
4	RESULTADO.....	23
	4.1. Avaliação macroscópica.....	24
	4.2. Avaliação histológica.....	25
	4.2.1. Hematoxilina-eosina.....	26
	4.2.2. Picrosírius.....	30
	A. Descrição qualitativa.....	30
	B. Quantificação da fibrose portal e periportal.....	31
	4.3. Avaliação imuno-histoquímica.....	39
	4.3.1. Desmina.....	39
	4.3.2. Alfa-actina de músculo liso (a-AML).....	43
5	DISCUSSÃO.....	50
6	CONCLUSÃO.....	59
7	ANEXO.....	61
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
9	APÊNDICE	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Aspecto macroscópico da dilatação do ducto biliar comum e de seus ramos lobares no 3.º dia após ligadura do ducto biliar comum a) rato jovem e b) rato adulto.....	25
FIGURA 2. Aspecto macroscópico da dilatação do ducto biliar comum e de seus ramos lobares no 28.º dia após ligadura do ducto biliar comum a) rato jovem e b) rato adulto.....	25
FIGURA 3. a) Fígado de rato jovem no 3.º dia após ligadura do ducto biliar comum, com discreta proliferação ductular e poucas células inflamatórias; b) rato adulto no 3.º dia após ligadura, com proliferação ductular e presença de infiltrado inflamatório neutrofílico e linfocítico no espaço-porta.(HE, 200x).....	26
FIGURA 4. a) Fígado de rato jovem no 28.º dia após ligadura do ducto biliar comum e b) fígado de rato adulto no 28.º dia após ligadura. Ambos com acentuada proliferação ductular e desarranjo do lóbulo hepático.(HE, 100x).....	27
FIGURA 5. Evolução temporal da proliferação ductular após ligadura do ducto biliar comum em animais jovens e adultos.....	28
FIGURA 6. Evolução temporal da inflamação após ligadura do ducto biliar comum em animais jovens e adultos.....	28
FIGURA 7. Evolução temporal do infiltrado neutrofílico após ligadura do ducto biliar comum em animais jovens e adultos.....	29
FIGURA 8. Evolução temporal do infiltrado linfocítico após ligadura do ducto biliar comum em animais jovens e adultos.....	29
FIGURA 9. a) Fígado de rato jovem normal e b) de rato adulto normal. Notar pequena quantidade de fibras colágenas coradas (em vermelho) no espaço-porta. (picrosírius, 200x).....	31
FIGURA 10. a) Fígado de rato jovem e b) de rato adulto no 3.º dia após ligadura do ducto biliar comum. Notar pequena quantidade de fibras colágenas (em vermelho) no espaço-porta e ao redor dos ductulos proliferados. (picrosírius, 200x).....	31
FIGURA 11. a) Fígado de rato jovem e b) de rato adulto no 28.º dia após ligadura do ducto biliar comum. Notar grande quantidade de fibras colágenas (em vermelho) no espaço-porta e ao redor dos ductulos proliferados (picrosírius, 200x).....	31

FIGURA 12. Fígado de rato jovem no 14.º dia após ligadura do ducto biliar comum: a) sem marcação; b) as setas indicam a delimitação da área do espaço-porta e região periportal, e em verde tem-se a marcação das fibras colágenas a serem quantificadas. (picrosírius, 200 x).....	32
FIGURA 13. Gráfico de caixa (Box plot) da porcentagem de colágeno (fração de área) no espaço-porta / região periportal de ratos jovem (RJ normal) e adulto normais (RA normal) ($p = 0,473$).....	33
FIGURA 14. Gráfico de caixa (Box plot) da porcentagem de colágeno acumulada no espaço-porta e região periportal após ligadura do ducto biliar comum em rato jovem (RJ após LDBC), em comparação com a porcentagem de colágeno de rato jovem normal (RJ normal) ($p < 0,01$).....	34
FIGURA 15. Gráfico de caixa (Box plot) da porcentagem de colágeno acumulada no espaço-porta e região periportal após ligadura do ducto biliar comum em rato adulto (RA após LDBC), em comparação com a porcentagem de colágeno de rato adulto normal (RA normal). ($p < 0,01$).....	35
FIGURA 16. Diagrama de dispersão de pontos ilustrando a correlação entre a porcentagem de colágeno acumulada em rato jovem após ligadura do ducto biliar comum (RJ após LDBC) e o tempo após cirurgia (dias) ($r = 0,655$ e $p < 0,01$).....	36
FIGURA 17. Diagrama de dispersão de pontos ilustrando a correlação entre a porcentagem de colágeno acumulada em rato adulto após ligadura do ducto biliar comum (RA após LDBC) e o tempo após cirurgia (dias) ($r = 0,441$ e $p = 0,015$).....	36
FIGURA 18. Gráfico de caixa (Box plot) da porcentagem de colágeno no espaço-porta / região periportal de rato jovem (RJ após LDBC) e adulto após ligadura do ducto biliar comum (RA após LDBC) ($p < 0,05$).....	37
FIGURA 19. Gráfico de barras mostrando a porcentagem de colágeno em cada fase do experimento em animais jovens (RJ) e adultos (RA). Valores expressos pelas medianas.....	38
FIGURA 20. Evolução temporal da expressão de desmina no fígado de rato jovem após ligadura do ducto biliar comum: a) fígado normal com expressão em algumas células no espaço-porta (100x); b) 3.º dia (100x) e c) 5.º dia com aumento discreto da marcação no espaço-porta (40x); d) 7.º dia com aumento da expressão na interface (40x); e) 21.º dia (100x) e f) 28.º dia com aumento	

significativo da expressão de desmina pelas células estreladas no lóbulo (100x).(imuno-histoquímica, desmina).....	40
FIGURA 21. Evolução temporal da expressão de desmina no fígado de rato adulto após ligadura do ducto biliar comum: a) fígado normal; b) 3.º dia, c) 5.º dia e d) 7.º dia com discreto aumento da expressão no espaço-porta; e) 21.º dia com aumento da expressão na interface e no lóbulo e f) 28.º dia demonstrando aumento da expressão pelas células estreladas no lóbulo (imuno-histoquímica, desmina, 200x).....	41
FIGURA 22. Expressão de desmina pela célula estrelada, ao longo do tempo após ligadura do ducto biliar comum.....	42
FIGURA 23. Expressão de desmina pelo miofibroblasto portal, ao longo do tempo após ligadura do ducto biliar comum.....	42
FIGURA 24. Expressão de desmina pelo miofibroblasto da interface, ao longo do tempo após ligadura do ducto biliar comum.....	43
FIGURA 25. Evolução temporal da expressão de a-actina de músculo liso (a- AML) no fígado de rato jovem após ligadura do ducto biliar comum: a) fígado normal com expressão de a-AML ao redor da arteríola e veia no espaço-porta (setas; 40x); b) 3.º dia (100x), c) 5.º dia (200x) e d) 7.º dia com aumento expressivo da marcação de a-AML pelos miofibroblastos portais (40x); e) 21.º dia e f) 28.º dia com aumento da expressão pelos miofibroblastos da interface e células estreladas (imuno-histoquímica, a-AML, 100x).....	45
FIGURA 26. Evolução temporal da expressão de a-actina de músculo liso (a- AML) no fígado de rato adulto após ligadura do ducto biliar comum: a) fígado normal com expressão de a-AML ao redor dos vasos no espaço-porta (200x); b) 3.º dia (100x), c) 5.º dia e d) 7.º dia com aumento expressivo da marcação de a-AML pelos miofibroblastos portais (200x); e) 21.º dia (100x) e f) 28.º dia com grande aumento da expressão pelos miofibroblastos da interface e células estreladas, especialmente na figura f. (imuno- histoquímica, a-AML, 40x).....	46
FIGURA 27. Fígado de rato jovem no 5.º dia após ligadura do ducto biliar comum. Notar intenso aumento na expressão de a-actina de músculo liso (a-AML) em miofibroblastos no espaço-porta, na região de interface e nas células estreladas (setas) localizadas na zona 1 do lóbulo hepático. (imuno-histoquímica, a-AML,100x)....	47
FIGURA 28. Expressão de a-actina de músculo liso (a-AML) pela célula estrelada, ao longo do tempo após ligadura do ducto biliar	

comum. Notar que apenas no 28.º dia há diferença entre o animal jovem e o adulto.....	48
FIGURA 29. Expressão de α -actina de músculo liso (α -AML) pelo miofibroblasto portal, ao longo do tempo após ligadura do ducto biliar comum. Apenas no 5.º dia houve diferença entre o rato jovem e o adulto.....	48
FIGURA 30. Expressão de α -actina de músculo liso (α -AML) pelo miofibroblasto interface, ao longo do tempo após ligadura do ducto biliar comum.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

LDBC		ligadura do ducto biliar comum
RJ		rato jovem
RA		rato adulto
HE		hematoxilina-eosina
% colágeno		porcentagem de colágeno (fração de área)
IHQ		imuno-histoquímica
a-AML		a-actina de músculo liso

RESUMO

GIBELLI, N.E.M. **Fibrose portal e periportal na obstrução extra-hepática experimental em ratos jovens e adultos: contribuição para o estudo da atresia das vias biliares.** São Paulo, 2003. 81p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

A atresia das vias biliares (AVB) constitui uma das principais afecções hepáticas da infância. É responsável por cerca de 60% das indicações de transplante hepático pediátrico. Nos últimos anos, ocorreu grande progresso em vários aspectos dessa afecção, incluindo maior facilidade de diagnóstico, novas táticas operatórias e melhor compreensão do manuseio pós-operatório. Porém, muito pouco foi acrescentado à compreensão da etiopatogenia da doença. Qualquer que seja sua causa ? genética, imunológica, viral ou outra ? , a doença se caracteriza pelo aparecimento de processo inflamatório que atinge as vias biliares intra e extra-hepática, tendo como resultado final cirrose colestática. O diagnóstico da AVB baseia-se fundamentalmente na história clínica e exame físico associados à biópsia hepática percutânea. Uma das principais características histológicas observadas na AVB e em outras formas de obstrução biliar é a proliferação ductular. A ligadura do ducto biliar comum (LDBC) em ratos é modelo clássico e prático de obstrução biliar, cuja principal repercussão histológica inicial é a proliferação ductular. A sequência de alterações histopatológicas decorrentes da obstrução biliar no modelo de LDBC no animal adulto já foi bem estabelecida por vários autores. No entanto, a obstrução biliar nos animais jovens ainda não foi suficientemente estudada e os poucos trabalhos existentes na literatura apresentam resultados conflitantes. A extrapolação dos resultados obtidos em animais adultos para os recém-nascidos e jovens pode não traduzir com fidelidade a patogênese das doenças colestáticas da infância. A proposta deste trabalho foi estudar, em modelo experimental de obstrução extra-hepática, a sequência de alterações histológicas hepáticas decorrentes da obstrução biliar em animais jovens e comparar os resultados com aqueles observados em animal adulto. Foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos. Os animais foram submetidos à cirurgia de LDBC sob anestesia com éter, sendo 90 ratos adultos (RA) e 90 ratos jovens (RJ) no 6.º dia de vida. Os animais foram divididos e mortos com 3, 5, 7, 14, 21 e 28 dias após LDBC. O grupo-controle constituiu em 10 RJ e 10 RA. Foram avaliadas as respostas dos animais jovens e adultos frente à obstrução biliar pelos seguintes métodos: 1) avaliação histológica com semiquantificação da proliferação ductular e da inflamação pela coloração pela hematoxilina-eosina; 2) quantificação automatizada da fibrose portal e periportal coradas pelo picrosírius; e 3) avaliação imuno-histoquímica com semiquantificação da expressão de desmina e a-actina de músculo liso (a-AML) pelas células estreladas, miofibroblastos portais e os da interface. Nos animais jovens, apesar de serem observadas respostas iniciais de inflamação e de proliferação ductular mais lentas, a fibrose portal e a periportal foram mais intensas ao final do período de observação do experimento. Os animais jovens apresentaram também expressão de desmina pelos miofibroblastos e células estreladas mais intensa que os adultos, fato que parece ser compatível com o achado de fibrose mais acentuada. Os resultados poderiam explicar a razão pela qual as crianças portadoras de AVB operadas mais precocemente apresentam melhores resultados quanto ao restabelecimento do fluxo biliar.

SUMMARY

GIBELLI, N.E.M. **Portal and periportal fibrosis in experimental extra-hepatic biliary obstruction in young and adult rats: contribution to biliary atresia study.** São Paulo, 2003. 81p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Biliary atresia (BA) is one of the most common hepatic diseases of infancy. It is responsible for more than 60% of pediatric liver transplantations. In spite of improvements in the diagnosis, surgical techniques and post operative care in the last years, almost nothing was added to the comprehension of the pathophysiology of the disease. It is well known that BA is a cholestatic disease of the neonatal period that results in cholestatic cirrhosis. Nevertheless, its cause ? genetics, immunologic, virus or others ? , the disease is characterized by an inflammatory process that affects the whole biliary tree. The diagnosis is made by the association of clinical examination to percutaneous liver biopsy, and ductular proliferation is one of the main histological features in the initial phases. Bile duct ligation (BDL) in rats is a classic and extremely useful experimental model of biliary obstruction, which leads to ductular proliferation and portal fibrosis. The sequence of histological alterations in this experimental model of BDL in the adult rat was well described by several authors. However, biliary obstruction in young animals was not sufficiently studied, and the few publications in the literature were not in agreement. Extrapolation of data obtained from BDL in adults to young and newborn rats may not accurately represent the pathophysiology of pediatric cholestatic diseases. The aim of this experimental study of extra-hepatic cholestasis was to analyse the sequence of hepatic histological alterations resulting from total biliary obstruction in young rats compared to that of the adult animals. Ninety *Wistar* adult rats (AR) of both sexes and 90 young rats on the 6th day (YR) were submitted to BDL under ether anesthesia. The animals were divided and killed at 3, 5, 7, 14, 21 and 28 days after surgery, being 10 to 15 adults and young rats for each day. Ten YR and 10 AR were the control groups. The responses of the two groups to BDL were studied by three methods: 1st) semiquantification of ductular proliferation and inflammatory infiltrated by hematoxiline-eosine (HE) stain; 2nd) automatic quantification of portal and periportal fibrosis with the sirius-red stain; 3rd) semiquantification of the expression of desmin and α -smooth muscle actin (α -SMA) by the hepatic stellated cells (HSC) and myofibroblasts cells populations from the portal and the interface, by immunohistochemistry. In the young animals, despite the very slow inicial response of ductular proliferation and inflammation observed with HE, there was significantly more portal and periportal fibrosis than in the adult group at the end of the observation period. Besides, the expression of desmin by the HSC and myofibroblasts was significantly increased in the group of young animals, which may be in accordance with the finding of more intense fibrosis in this group. These findings may be an explanation to the need to perform the Kasai's procedure as soon as possible in children with BA, in order to achieve better results of biliary drainage.

1

INTRODUÇÃO

A atresia das vias biliares (AVB) constitui uma das principais afecções hepáticas da infância. É responsável por cerca de 60% das indicações de transplante hepático pediátrico. Nos últimos anos ocorreu grande progresso em vários aspectos dessa afecção, incluindo maior facilidade de diagnóstico, novas táticas operatórias e melhor compreensão do manuseio pós-operatório¹⁻⁴.

Embora se tenha obtido progresso no diagnóstico e tratamento da AVB, notadamente com a introdução do transplante hepático, muito pouco foi acrescentado à compreensão da etiopatogenia da doença⁵⁻⁷. Sabe-se apenas que a AVB é doença colestática, não-congênita, de início no período neonatal precoce, tendo como resultado final cirrose hepática. Qualquer que seja sua causa, genética, imunológica, viral ou outra, a doença caracteriza-se por processo inflamatório que agride as vias biliares intra e extra-hepática, levando-as a um progressivo desaparecimento e resultando em colestase crônica progressiva, expressão anatomopatológica da obstrução biliar no parênquima hepático^{8,9}.

A consequência final é o desenvolvimento de fibrose e cirrose hepática, com maior ou menor velocidade e intensidade, dependendo do grau e características da obstrução biliar^{10,11}. Não se conhece a razão das diferenças observadas entre a colestase decorrente da obstrução biliar no organismo adulto e a presente no recém-nascido (RN). Não se conhece também a razão das sabidas diferenças clínicas

habitualmente observadas na AVB de início muito precoce relativamente às formas clínicas de surgimento mais tardio. Tais diferenças clínicas e de prognóstico são tão evidentes que se pode conjecturar que, no período neonatal precoce, devem ocorrer alterações teciduais mais rápidas frente à obstrução biliar, e que estas devem alterar-se de acordo com a idade.

A evolução natural da AVB não operada leva inexoravelmente ao óbito por volta de 1 ano e meio a 2 anos de idade, por cirrose colestática. Praticamente nenhum avanço no conhecimento da etiopatogenia desta doença ocorreu nos últimos 20 anos, e o enfoque atual baseia-se no diagnóstico precoce, com possibilidade de melhores resultados nas crianças operadas até as primeiras 8 semanas de vida^{1,4}.

Existem duas formas clínicas de AVB: 1) tipo embrionário ou fetal e 2) tipo perinatal. O tipo embrionário ou fetal é responsável por aproximadamente 10 a 35% de todos os casos de AVB. Caracteriza-se por início precoce de colestase neonatal, com continuação da icterícia após o quadro inicial de icterícia fisiológica, sem um período de normalização dos níveis de bilirrubinas. Essa modalidade de AVB é associada a outras anomalias congênitas em 10 a 20% dos casos, entre elas a poliesplenia, asplenia, defeitos cardiovasculares, *situs inversus* abdominal, má rotação intestinal, veia porta pré-duodenal e anomalias da veia cava retro-hepática e artéria hepática. Não são encontrados remanescentes de ductos biliares no ligamento hepatoduodenal à laparotomia e os resultados do tratamento cirúrgico são piores. O tipo perinatal ocorre em 65 a 90% dos casos e tem início mais tardio, ao redor de 4 a 8 semanas. Não apresenta malformações associadas. Remanescentes de estruturas de ductos biliares são encontrados à cirurgia, possibilitando melhores resultados cirúrgicos¹.

A ligadura do ducto biliar comum (LDBC) em ratos, conforme descrito inicialmente em 1932 por Cameron e Oakley¹² *apud* Chou e Gibson¹³, é um dos modelos experimentais mais utilizados para o estudo das doenças colestáticas do adulto. A sequência de alterações histopatológicas e bioquímicas decorrentes da obstrução biliar no modelo de LDBC no animal adulto já foi bem estabelecida por vários autores¹³⁻¹⁹. Porém, as diferenças de respostas nos organismos jovens à obstrução biliar ainda não foram completamente estudadas. A extrapolação dos resultados obtidos em animais adultos para os recém-nascidos e jovens pode não traduzir com fidelidade a patogênese das doenças colestáticas da infância.

Medeiros *et al.*²⁰ estudaram as diferenças histológicas secundárias à obstrução do ducto biliar comum em ratos jovens e adultos, e observaram resposta inflamatória inicial e proliferação ductular menos intensas nos animais jovens em relação aos adultos. Porém, ao final de 40 dias de observação, houve evolução mais rápida para fibrose com a formação de nódulos de regeneração e cirrose nos animais jovens. Zimmermann *et al.*²¹, utilizando modelo de LDBC em ratos jovens de diferentes idades e adultos, demonstraram que o desenvolvimento de cirrose biliar secundária à obstrução biliar é idade-dependente durante o período de desenvolvimento. Os animais adultos apresentaram aumento da fibrogênese relativamente aos animais jovens. Por sua vez, Omori *et al.*²², utilizando o mesmo modelo experimental de obstrução biliar em ratos jovens e adultos, obtiveram resultados diferentes. Observaram que a expressão de alfa-feto proteína, a intensidade de proliferação ductular e a formação de fibrose foram mais acentuadas no rato jovem em relação ao adulto. Como se percebe, os poucos trabalhos existentes na literatura apresentam

resultados conflitantes no que se refere à diferença de resposta entre os animais jovens e adultos.

Alguns mecanismos foram propostos para tentar explicar a etiologia e a patogênese da AVB. Em qualquer doença com início nas primeiras semanas de vida é essencial considerar a possibilidade de fatores genéticos contribuindo para o seu estabelecimento, especialmente nas formas com outras anomalias associadas. Porém, não foram descritos casos familiares e existem casos de discordância entre gêmeos idênticos^{23,24}. Por outro lado, também não foram descritos casos em natimortos, fato que sugere uma origem pós-natal do processo inflamatório²⁵.

Estudos recentes têm pesquisado eventuais distúrbios na morfogênese do ducto biliar e o papel de vários fatores agressivos (infecciosos, tóxicos, metabólicos) isolados ou em combinação com uma possível suscetibilidade genética e / ou imunológica²⁶⁻³⁰. Desmet *et al.*³¹ realizaram estudos da morfogênese e diferenciação dos ductos biliares intra-hepáticos em fígados humanos de fetos em diferentes estágios de evolução, utilizando métodos de imuno-histoquímica com anticorpos anticitoqueratina específicos para células epiteliais dos ductos biliares. Demonstraram que os ductos biliares se originam do mesênquima que envolve os ramos portais em formação – a placa ductal. No fígado de alguns portadores de AVB existem evidências de interrupção do processo de formação/remodelagem dos ductos biliares, fazendo que estes não sejam formados, condição denominada “malformação da placa ductal”. Uma outra teoria suscita a hipótese de uma infecção viral oculta. Alguns vírus como o reovírus tipo 3 e o rotavírus grupo A podem causar um quadro de colangiopatia obliterativa em ratos semelhante à AVB^{32,33}.

Porém, estudos recentes não estabeleceram uma relação bem definida entre esses vírus e as crianças com AVB^{34,35}.

Anormalidade do sistema imunológico e / ou da resposta inflamatória nas crianças com AVB também tem sido alvo de discussões. A frequência maior de alguns tipos de HLA (B-12) nos pacientes com esta doença sem malformações associadas suscita a hipótese de a AVB ser um fenômeno imunologicamente modulado³⁶⁻³⁹. Acredita-se que, em pacientes predispostos, um estímulo lesivo inicial à célula ductular biliar leve à expressão anormal de antígenos de superfície HLA classe II, bem como de moléculas de adesão intercelulares (ICAM-1)⁴⁰⁻⁴². Estes facilitam a identificação dessas células como “células-alvo”, sendo reconhecidas e processadas por macrófagos no espaço-porta e apresentadas ao linfócito T. Ocorre, desta forma, ativação e diferenciação dos linfócitos T citotóxicos com liberação de citocinas e outros fatores estimuladores, resultando em ativação de toda a cadeia inflamatória com conseqüente destruição biliar⁴³⁻⁴⁸.

A liberação de citocinas levaria também à ativação das células estreladas (células perisinusoidais ou células de Ito), com sua diferenciação em miofibroblastos, interagindo com a matriz extracelular e levando à alteração de sua composição, produção de colágeno e início do processo de fibrose⁴⁹⁻⁵⁴. Vários autores demonstraram que a célula estrelada de ratos apresenta reação imuno-histoquímica positiva para desmina e, quando ativada, também para alfa-actina de músculo liso (α -AML)⁵⁵⁻⁵⁹.

Desmina e α -AML são proteínas estruturais dos filamentos intermediários presentes no citoesqueleto das células da musculatura lisa e de outros tipos celulares. A célula estrelada é considerada a principal produtora de proteínas da matriz

extracelular no parênquima hepático⁶⁰⁻⁶⁴. Entretanto, Cassiman *et al.*⁶⁵ descreveram a presença no parênquima hepático de subpopulações de miofibroblastos envolvidas no processo de fibrogênese, as quais se localizam em três setores principais: a própria célula estrelada no lóbulo, os miofibroblastos presentes no espaço-porta, e aqueles localizados na região de interface, ou seja, entre o espaço-porta e o lóbulo hepático. No modelo experimental de LDBC com a indução de fibrose portal do tipo biliar, estas outras populações de miofibroblastos também podem estar envolvidas nos estágios iniciais de desenvolvimento da fibrose, especialmente aquelas localizadas no espaço-porta e na zona de interface^{66,67}.

A matriz extracelular (MEC) deixou de ser apenas o tecido de sustentação celular, sendo considerada tecido metabolicamente ativo que interage com as células e participa da manutenção estrutural do órgão⁶⁸⁻⁷⁰. Os componentes da MEC do fígado são o colágeno, os proteoglicanos e as glicoproteínas. O colágeno representa o componente mais abundante da MEC, com mais de 15 diferentes tipos descritos, constituindo excitante capítulo da patologia moderna⁷¹⁻⁷⁴. O processo de fibrogênese decorre, em última análise, de uma perda dos mecanismos regulatórios das células entre si e das células com a matriz extracelular, resultando em maior síntese e / ou menor degradação do colágeno^{75,76}.

O diagnóstico da AVB baseia-se fundamentalmente na história clínica e exame físico associado à biópsia hepática percutânea. Uma das principais características histológicas observadas na AVB e em outras formas de obstrução biliar é a proliferação ductular^{1,77}. A ligadura do ducto biliar comum em ratos é modelo extremamente prático de obtenção de proliferação ductular⁷⁸⁻⁸⁰. Isto sugere que a obstrução biliar em ratos recém-nascidos e jovens possa ser utilizada como

modelo de estudo das doenças colestáticas na infância⁸¹. A origem das células epiteliais na proliferação ductular ainda é assunto controverso^{82,83}. Slott *et al.*⁸⁴, em estudos experimentais de ligadura do ducto biliar comum em ratos, sugerem que a hiperplasia dos ductos biliares seja principalmente consequência do desenvolvimento de ductos biliares preexistentes (canais de Hering), e não originada de metaplasia ductular de hepatócitos ou das células totipotentes (“stem cells”). Van Eyken *et al.*⁸⁵, com base em estudo imuno-histoquímico de citoqueratinas, relataram que a metaplasia ductular de hepatócitos contribui de forma significativa para a proliferação dos ductos biliares na obstrução biliar em humanos.

Alguns fatos não explicados merecem investigação nesta doença tão enigmática e de etiologia ainda desconhecida:

1.º) A AVB é um fenômeno exclusivo extra-hepático com repercussão intra-hepática ou um fenômeno intra e extra-hepático simultâneo?

2.º) A semelhança histológica entre a AVB e a hepatite neonatal suscita a possibilidade de ambas terem etiologia comum e de serem apenas diferentes formas clínicas de uma mesma afecção?

3.º) Por qual razão a cirurgia precocemente realizada pode impedir a progressão da doença em alguns casos e em outros não?

4.º) Quais os fatores envolvidos na manutenção ou progressão deste processo?

Embora avanços nos conhecimentos sobre lesão celular e indução de fibrose nas doenças hepáticas sejam substanciais, alguns aspectos continuam obscuros como as diferenças observadas entre os recém-nascidos (RN) e as crianças maiores e adultos. Como o RN responde à lesão da célula epitelial ductal comparativamente

com o adulto? As células estreladas (perisinusoidais) e os miofibroblastos do RN respondem da mesma maneira que os presentes no adulto, frente à obstrução biliar?

Em resumo, a maior parte das informações atuais sobre AVB sugere que seja uma doença de manifestação heterogênea e de origem multifatorial. Portanto, a proposta deste trabalho é estudar, em modelo experimental de colestase extra-hepática, a seqüência de alterações histológicas hepáticas decorrentes da obstrução biliar em animais jovens e comparar os resultados com aqueles observados no animal adulto.

2

OBJETIVO

O objetivo da presente pesquisa foi esclarecer se há diferenças de resposta do parênquima hepático entre o animal jovem e o adulto frente à obstrução biliar completa em modelo experimental de ligadura de ducto biliar comum, por meio do estudo das seguintes características histológicas:

- 1- Semiquantificação da proliferação ductular e do infiltrado inflamatório;
- 2- Quantificação da fibrose portal e periportal;
- 3- Resposta da célula estrelada e dos miofibroblastos no tecido hepático.

3

MATERIAL E MÉTODO

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Cirurgia Experimental do Serviço de Cirurgia Pediátrica do Instituto da Criança (HC-FMUSP) e no Laboratório de Cirurgia Pediátrica ? LIM ? 30 da Faculdade de Medicina da USP. O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPEsq (protocolo n.º 559/99), e foi realizado em respeito às normas internacionais de utilização de animais de laboratórios.

3.1. Animal de experimentação

Como animal de experimentação foi utilizado o rato *Wistar* de ambos os sexos. O modelo experimental de colestase foi realizado por meio de ligadura do ducto biliar comum (LDBC), como abaixo descrito. Animais adultos foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP. Ao serem recebidos no Laboratório de Cirurgia Experimental do Instituto da Criança, os animais foram aclimatados por período de 24 a 48 horas e, a seguir, mantidos em gaiolas com ciclos alternados de 12 horas de noite / dia e alimentados com ração e água *ad libitum*. A obtenção de ratos jovens foi realizada por meio de acasalamento no próprio laboratório. A duração média da gestação foi de 22 dias e o número de filhotes por gestação variou de 6 a 10. O desmame dos filhotes ocorreu com 21 dias de vida, e os

animais tornavam-se aptos para o acasalamento entre a 10.^a e a 12.^a semanas. A vida média dos ratos de linhagem *Wistar* variou de 1 ano e meio a 2 anos. Considerou-se como rato recém-nascido (RN) os animais de até 3 dias de vida⁸⁶.

3.2. Plano piloto

Na fase de plano piloto foram operados 18 ratos adultos utilizados para a obtenção de experiência no que se refere à indução e manutenção anestésica e à padronização dos procedimentos cirúrgicos. Após ligadura do ducto biliar comum, grupos de 3 animais foram mortos respectivamente com 3, 5, 7, 14, 21 e 28 dias após ligadura para observação das alterações macroscópicas dos ductos biliares. O procedimento cirúrgico foi considerado eficaz quando ocorria dilatação macroscópica do ducto biliar. Após adquirir-se experiência no manuseio de animais adultos, passou-se para a etapa subsequente, com a manipulação de ratos jovens.

Numa primeira fase procurou-se definir a melhor idade para a realização da ligadura cirúrgica das vias biliares. Inicialmente foram operados 30 ratos no 3.º dia de vida, com peso médio de 5,4 gramas variando de 4,8 a 7 gramas. Nesta idade a mortalidade foi acima de 70%, decorrente desde complicações anestésicas, tais como depressão respiratória e cardiocirculatória, a problemas técnicos da manipulação cirúrgica de ductos biliares de dimensões muito reduzidas. Mesmo quando superadas essas dificuldades técnicas iniciais, os ratos recém-nascidos eram devorados pelas mães (canibalismo). Passou-se a realizar o procedimento nos ratos de 6 dias de vida e constatou-se que, logo após o procedimento cirúrgico, era necessário efetuar procedimentos adicionais para proteção dos animais: lavá-los com água morna, rolá-

los na serragem (maravalha) e mantê-los separados da mãe por período de 30 a 40 minutos, com a finalidade de eliminar qualquer cheiro do gás anestésico e sangue. Com estes procedimentos, conseguiu-se manter os animais vivos e concluir o plano piloto. Da mesma forma que no animal adulto, o critério de sucesso do procedimento cirúrgico no rato jovem foi presença de dilatação do ducto biliar.

3.3. Estudo experimental

3.3.1. Procedimento cirúrgico

Em ambos os grupos experimentais, os animais foram anestesiados com éter e a cirurgia foi realizada por meio de laparotomia mediana em ratos adultos e ratos de 6 dias de vida⁸⁷. No rato adulto, a incisão mediana era de tamanho suficiente (1,5 cm) para se identificar e exteriorizar delicadamente o duodeno, permitindo a visualização direta do ducto biliar comum, seu isolamento, ligadura dupla com fio de sutura inabsorvível monofilamentar de polipropileno 6-0 imediatamente acima do tecido pancreático e secção entre ligaduras. No rato jovem, a incisão mediana também era de 1,5 cm, comparativamente maior, e devido à fragilidade de suas estruturas, era necessária a evisceração de todo o intestino delgado até a identificação do duodeno e sua exteriorização. A LDBC no rato jovem foi feita utilizando-se lupas cirúrgicas, instrumental de microcirurgia e fios 8-0, e foi realizada no mesmo local descrito para o animal adulto. A parede abdominal foi fechada com sutura contínua em 2 planos, utilizando-se fio de polipropileno 5-0 no rato adulto, e 6-0 no rato jovem.

3.3.2 Grupos experimentais

Foram operados 90 animais adultos com peso entre 199,7 e 357 gramas (média de 257,9 gramas $\pm$ 1,58). O mesmo número de animais jovens foi submetido à cirurgia. O peso médio destes ratos foi de 11,4 gramas, variando de 8 a 13,9 gramas ($\pm$ 0,038).

Os animais foram divididos em 2 grupos:

1- Ratos jovens de 6 dias de vida submetidos à ligadura do ducto biliar comum (n = 90).

2- Ratos adultos submetidos à ligadura do ducto biliar comum (n = 90).

O grupo-controle foi constituído por 10 ratos adultos e 10 ratos jovens no 6.º dia de vida, os quais foram submetidos aos mesmos procedimentos anestésicos e coleta de biópsia hepática sem, no entanto, realizar-se a ligadura do ducto biliar comum. Os animais jovens e adultos operados foram divididos aleatoriamente e mortos com 3, 5, 7, 14, 21 e 28 dias após a cirurgia de LDBC. O número final de ratos jovens e adultos incluídos no estudo está descrito na tabela 1.

Tabela 1: Número final de ratos jovens e adultos incluídos no estudo em cada fase do experimento.

<i>Dias Pós-operat.</i>	3	5	7	14	21	28
Rato jovem	13	14	14	12	13	10
Rato adulto	12	15	15	12	15	14

3.3.3. Macroscopia

Nos períodos pós-operatórios previamente definidos, os animais eram submetidos à eutanásia por meio de anestesia com éter e, logo após a morte dos animais, realizava-se a laparotomia mediana extensa e observavam-se os aspectos macroscópicos decorrentes do procedimento cirúrgico. A cirurgia era considerada eficaz quando havia a dilatação do ducto biliar comum e de seus ramos lobares.

Foi realizada também avaliação qualitativa da superfície, coloração, textura e consistência hepática no momento da coleta do fragmento de fígado para exame.

3.3.4. Estudo histológico

Foram colhidas biópsias em cunha do lobo hepático esquerdo dos animais jovens e adultos submetidos a LDBC e dos ratos-controle. O fígado do rato é dividido em quatro lobos: lobo médio ou cístico, lobo direito, esquerdo e caudado. O lobo esquerdo foi escolhido por ser o maior lobo do fígado do rato⁸⁸. O fragmento foi mantido em solução tamponada de formaldeído a 10% por período de 24 a 48 horas, sendo então realizada a inclusão em parafina. Foram colhidos cortes histológicos com espessura de 3 μ m dos blocos de parafina dos animais mortos com 3, 5, 7, 14, 21 e 28 dias após LDBC e dos fragmentos de fígado dos animais-controle. Foram submetidos à coloração pela hematoxilina-eosina (HE) e picrossírius. As lâminas foram analisadas utilizando-se microscópio Nikon Optiphol® e fotografadas com máquina Nikon® FX 35 WA.

A. Hematoxilina-eosina (HE)

As lâminas coradas pelo HE foram analisadas sob microscopia de luz para avaliação da morfologia geral do fígado do rato e da sequência de alterações histológicas, como o grau e a característica da inflamação, decorrentes da ligadura do ducto biliar comum.

As características histológicas analisadas em cada fase do experimento foram:

1. Proliferação ductular.
2. Infiltrado inflamatório no espaço-porta e sua característica (neutrofílico e linfocítico).

Estas características foram avaliadas de modo semiquantitativo, com análise global de toda a lâmina. As medidas semiquantitativas foram realizadas por meio de pontuações de zero a quatro, sendo zero a ausência do achado; 1, alteração leve (+); 2, alteração moderada (++); 3, intensa (+++) e 4, como resposta muito intensa / máxima (++++).

B. Picrosírius

A evolução para fibrose nas várias etapas do experimento nos animais jovens e adultos foi estudada pela técnica de coloração pelo picrosírius. Foi realizada avaliação inicial qualitativa da deposição de colágeno após LDBC, seguida de quantificação da fibrose portal e periportal. A quantificação do colágeno foi realizada utilizando-se o Sistema Analisador de Imagem Kontron Eletronic® 300 no Laboratório de Investigação Médica – LIM 02 – da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A estação de trabalho consistiu em microscópio de luz Zeiss® biocular, uma videocâmera colorida (Sony® CCD-Íris), uma placa digitalizadora de imagens, um microcomputador com processador Pentium 133 MHz, IBM®-PC compatível, operando em ambiente Windows 98® -32 bits.

As imagens foram digitalizadas com auxílio de programa específico para análise de imagem (Kontron 300®), permitindo compartilhamento de dados com o processador de textos (Microsoft Word®) e planilha eletrônica (Microsoft Excel®). A utilização desses programas determinou a análise, tratamento, interpretação, obtenção de valores de mensuração das estruturas com todas as variáveis e a distribuição automática dos dados, gerados pela estação de análise de imagens, para planilhas eletrônicas e processadores de texto, de maneira automática.

A transmissão óptica foi calibrada e quantificada, a fim de se processar e analisar a imagem, de forma a ser quantificada no monitor segundo suas medidas originais. Para obtenção de dados em valores absolutos, foi utilizada lâmina de calibração de 1 mm com 100 divisões (Nikon), correspondendo cada divisão a 10µm. A calibração das imagens foi realizada para imagens obtidas em aumentos de 10, 20, 40 e 100 vezes. Esta quantificação foi realizada na menor unidade espacial, chamada “pixel”. O fator de calibração (FC) foi calculado automaticamente em “pixels” e foi utilizado pelo programa para os cálculos correspondentes em micrômetros (µm) conforme a calibração. As imagens foram analisadas pelo programa Kontron 300® (Zeiss) com recurso para determinação de área, volume, comprimento e contagem de partículas. Esta ferramenta permitiu identificar determinada estrutura, marcá-la e automatizar sua identificação para

futuras leituras, assim como permitiu a utilização de filtros e emprego de diversos macros para automatização de variadas e múltiplas tarefas.

Os cortes histológicos foram processados no sistema analisador de imagem utilizando-se objetiva de 20 aumentos e ocular de 10 aumentos. As imagens foram captadas pela videocâmera e processadas em placas especiais de digitalização de imagens por computador, otimizando o resultado. Após obtenção da imagem, utilizou-se recurso gráfico para marcar as estruturas a serem quantificadas (fibras colágenas). Com auxílio do “mouse”, delineou-se a área do espaço-porta e a região periportal a ser mensurada em micrômetros quadrados (μm^2). Os espaços-porta e regiões periportais avaliados foram selecionados de forma aleatória. Foram excluídos os espaços-porta com área superior a 70.000 μm^2 . Subseqüentemente, os procedimentos foram repetidos de forma que a quantificação do colágeno nos espaços-porta / periportais de cada fragmento pudesse ser mensurada^{89,90}. Foram mensurados 15 campos por lâmina de cada animal em cada fase do experimento. A soma da área de colágeno dos 15 campos analisados foi dividida pela soma das áreas das regiões demarcadas dos espaços-porta e regiões periportais, e os valores obtidos, expressos em porcentagem de colágeno, ou seja, fração de área. Todas as medidas foram arquivadas em programa específico de computador para subseqüente análise estatística. Do número total de animais jovens e adultos incluídos no estudo foram selecionados, de forma aleatória, para avaliação da porcentagem de colágeno: cinco animais jovens normais; cinco adultos normais; cinco animais jovens e cinco adultos após cirurgia de LDBC em cada fase do experimento. Em cada lâmina foram demarcados e analisados 15 espaços-porta e regiões periportais adjacentes. Desta

forma, foram estudados 450 espaços-porta / periportais de animais jovens e igual quantidade proveniente de animais adultos.

3.3.5. Estudo imuno-histoquímico

A. Desmina

A reação de imuno-histoquímica (IHQ) para desmina foi realizada com a utilização de anticorpo antidesmina humana obtido em camundongos, preparado na diluição de 1 / 200 (DAKO® Corporation A/S Denmark, clone D33). A recuperação antigênica do material foi realizada pela técnica de alta temperatura (95° Celsius) com tampão citrato em pH 6. O kit secundário utilizado foi Vectastain® ABC kit (Vector® laboratories). O cromógeno utilizado foi 3,3-diamino benzidine (Sigma®, código D-8001), e a contracoloração foi feita com hematoxilina Harris. O objetivo foi identificar as populações de células miofibroblásticas e de células estreladas; verificar suas localizações no fígado normal do rato jovem e adulto; avaliar o grau de expressão de desmina e realizar sua semiquantificação no decorrer do tempo após ligadura nos animais de diferentes idades, utilizando-se a mesma pontuação descrita para a análise semiquantitativa da coloração pelo HE. A semiquantificação foi feita por análise global de toda a lâmina, realizando-se uma estimativa do número de células positivas para a desmina nos diferentes setores estudados: lóbulo hepático, região portal e zona de interface.

B. Alfa-actina de músculo liso (a-AML)

A reação de imuno-histoquímica para alfa-actina de músculo liso (a-AML) foi obtida com o emprego de anticorpo antiactina humana extraído de camundongos, preparado na diluição de 1 / 500 (DAKO® Cooperation A/S Denmark, clone 1A4). A recuperação antigênica do material foi realizada pela técnica de alta temperatura (95° Celsius) com tampão citrato em pH 6. O kit secundário usado foi Vectastain® ABC kit (Vector® laboratories). O cromógeno utilizado foi 3,3-diamino benzidine (Sigma®, código D-8001) e a contracoloração foi feita com hematoxilina Harris. O objetivo foi identificar a célula estrelada ativada no lóbulo hepático, as populações de miofibroblastos do espaço-porta e da interface; verificar as áreas de localização; avaliar o grau de expressão de a-AML e realizar sua semiquantificação no decorrer do tempo após ligadura nos animais de diferentes idades, utilizando-se os mesmos critérios descritos para a expressão de desmina.

3.4. Análise estatística

Os dados histológicos foram comparados em cada fase do experimento entre os animais adultos e jovens. Para a análise estatística utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney Rank Sum Test, aplicado pelo software Sigmastat® para microcomputadores pessoais. A hipótese de igualdade das amostras foi rejeitada para $p < 0,05$. Foram, também, calculados os coeficientes de correlação (Spearman Rank Order Correlation) na avaliação da quantificação do colágeno e o tempo de pós-operatório.

4

RESULTADO

4.1. Avaliação macroscópica

Três dias após a LDBC, observou-se dilatação do ducto biliar comum nos animais jovens e adultos. A dilatação acentuou-se no decorrer do tempo (figuras 1 e 2). Formaram-se grandes dilatações císticas do ducto biliar comum dos animais mortos com 28 dias após LDBC, e o conteúdo destes cistos era de um líquido claro. O fígado apresentou mudança de coloração, passando de vinhosa normal para um tom marrom inicialmente claro e, com 28 dias, tornando-se mais escurecida. O aspecto da superfície hepática, que se apresentava lisa, passou a ser rugosa e a consistência aumentada, tornando-se endurecida. Este fato foi particularmente perceptível à secção do parênquima para a coleta do fragmento. Já no 3.º dia após a cirurgia notou-se coloração escurecida da urina (colúria) que geralmente impregnava os pêlos ao redor da genitália externa dos animais adultos. Notou-se, também, leve coloração ictérica das orelhas e região axilar, especialmente no animal jovem, fato que não se acentuou até o final do período de observação do experimento.

Figura 1. Aspecto macroscópico da dilatação do ducto biliar comum e de seus ramos lobares no 3.º dia após ligadura do ducto biliar comum a) rato jovem e b) rato adulto.

Figura 2. Aspecto macroscópico da dilatação do ducto biliar comum e de seus ramos lobares no 28.º dia após ligadura do ducto biliar comum a) rato jovem e b) rato adulto.

4.2. Avaliação histológica

Os resultados serão apresentados sob a forma de descrições histológicas segundo os métodos de coloração utilizados nos diferentes grupos experimentais e comparados com o padrão histológico do fígado normal de ratos jovens e adultos.

4.2.1. Hematoxilina-eosina

À microscopia de luz, a alteração mais precoce observada nos animais jovens foi presença de leve proliferação ductular, constatada já no 3.º dia após ligadura (figura 3-a). A intensidade desta alteração foi exacerbada no decorrer do período pós-operatório. A proliferação ductular no rato jovem atingiu grau máximo / muito intenso (nota 4) apenas no 21.º dia de pós-operatório, e a partir deste período se manteve constante. Após a 3.ª semana, a proliferação ductular se fazia de forma radiada em direção ao parênquima, formando finos septos (figura 4-a). O animal adulto já apresentava no 3.º dia proliferação ductular intensa (nota 3), atingindo grau máximo no 5.º dia, e mantendo-se desta maneira até o final do período de observação do experimento (figura 3-b). Na 4.ª semana (28 dias), a arquitetura do parênquima hepático do animal adulto alterava-se devido a crescimento infiltrativo desordenado dos ductulos biliares proliferados. Havia uma grande desorganização do lóbulo sem, no entanto, formação de nódulos de regeneração ao final de 28 dias (figura 4-b).

Figura 3. a) Fígado de rato jovem no 3.º dia após ligadura do ducto biliar comum, com discreta proliferação ductular e poucas células inflamatórias; b) rato adulto no 3.º dia após ligadura, com proliferação ductular e presença de infiltrado inflamatório neutrofílico e linfocítico no espaço-porta. (HE, 200x)

Figura 4. a) Fígado de rato jovem no 28.º dia após ligadura do ducto biliar comum e b) fígado de rato adulto no 28.º dia após ligadura. Ambos com acentuada proliferação ductular e desarranjo do lóbulo hepático.(HE, 100x)

O grau de inflamação presente no espaço-porta e a característica do infiltrado inflamatório também variaram nos animais de diferentes idades, sendo sempre de intensidade menor no rato jovem. Neste, três dias após a LDBC notava-se um grau leve (nota 1) de inflamação, infiltrado neutrofílico e linfocítico, alterações que atingiram graduação moderada (nota 2) no 14.º dia, e intensa (nota 3) no 21.º dia (exceto infiltrado neutrofílico), mantendo este valor de pontuação também no 28.º dia. No rato adulto, tanto a inflamação quanto o infiltrado linfocítico apresentavam grau moderado (nota 2) no 3.º dia após ligadura e atingiram grau intenso (nota 3) no 14.º pós-operatório, mantendo-se assim até o final do período de observação. O infiltrado neutrofílico manteve-se como moderado (nota 2) durante todo o período de observação do rato adulto. As pontuações dos animais de diferentes idades nas distintas etapas do experimento foram agrupadas pelas medianas e o resultado final expresso nas figuras 5 – 8.

Figura 6. Evolução temporal da inflamação após ligadura do ducto biliar comum em animais jovens e adultos.

Figura 7. Evolução temporal do infiltrado neutrofílico após ligadura do ducto biliar comum em animais jovens e adultos.

Figura 8. Evolução temporal do infiltrado linfocítico após ligadura do ducto biliar comum em animais jovens e adultos.

Em resumo, a resposta histológica inicial do rato jovem frente à obstrução biliar completa ocorreu de forma menos intensa do que no animal adulto. A proliferação ductular foi mais lenta no animal jovem, atingindo o grau máximo apenas no 21.º dia de pós-operatório. A inflamação, avaliada pela presença de infiltrado inflamatório portal e sua característica (neutrofílico ou linfocítico), também apresentou intensidade menor no animal jovem relativamente ao adulto à microscopia de luz.

4.2.2. Picrosíríus

A. Descrição qualitativa

O fígado normal dos animais jovens e adultos à coloração pelo picrosíríus demonstrou pequena quantidade de fibras colágenas localizadas no espaço-porta e principalmente ao redor de vasos sanguíneos e de grandes ductos (figura 9). Com 3 dias após ligadura notou-se aumento da quantidade de fibras colágenas localizadas ao redor dos dúctulos neoformados nos animais de diferentes idades (figura 10). Esse aumento de fibras colágenas no espaço-porta se intensificou no decorrer do tempo após ligadura, até o final do período de observação de 28 dias (figura 11). Ocorreu também deposição de fibras colágenas ao redor da veia centrolobular, interface e no interior dos lóbulos hepáticos que sofreram desarranjo de sua arquitetura com a expansão portal de dúctulos proliferados.

Figura 9. a) Fígado de rato jovem normal e b) de rato adulto normal. Notar pequena quantidade de fibras colágenas coradas (em vermelho) no espaço-porta. (picrosíríus, 200x)

Figura 10. a) Fígado de rato jovem e b) de rato adulto no 3.º dia após ligadura do ducto biliar comum. Notar pequena quantidade de fibras colágenas (em vermelho) no espaço-porta e ao redor dos ductúlos proliferados. (picrossírius, 200x)

Figura 11. a) Fígado de rato jovem e b) de rato adulto no 28.º dia após ligadura do ducto biliar comum. Notar grande quantidade de fibras colágenas (em vermelho) no espaço-porta e ao redor dos ductúlos proliferados (picrossírius, 200x)

B. Quantificação da fibrose portal e periportal

A figura 12 ilustra a marcação da fibra colágena e a delimitação do espaço-porta / região periportal no animal jovem para a quantificação da fibrose.

Figura 12. Fígado de rato jovem no 14.º dia após ligadura do ducto biliar comum: a) sem marcação; b) as setas indicam a delimitação da área do espaço-porta e região periportal, e em verde tem-se a marcação das fibras colágenas a serem quantificadas. (picrossírius, 200 x)

Os fragmentos de fígados normais de animais jovens e adultos não apresentaram diferenças significantes ($p = 0,421$) na quantidade de colágeno nos espaços-porta e regiões periportais (figura 13).

Figura 13. Gráfico de caixa (Box plot) da porcentagem de colágeno (fração de área) no espaço-porta / região periportal de ratos jovem (RJ normal) e adulto normais (RA normal). ($p = 0,473$)

Analizou-se a porcentagem de colágeno acumulada nos espaços-porta / região periportal dos animais jovens submetidos à cirurgia de ligadura e comparou-se o resultado com o valor obtido nos fígados dos animais jovens normais. Ocorreu aumento significativo ($p < 0,01$) da fibrose portal e periportal nos animais operados (figura 14). A mesma comparação, realizada entre os animais adultos submetidos a

LDBC e os do grupo-controle de ratos adultos, demonstrou aumento significativo ($p < 0,01$) de fibrose nos animais adultos operados em relação aos normais (figura 15).

Figura 14. Gráfico de caixa (Box plot) da porcentagem de colágeno acumulada no espaço-porta e região periportal após ligadura do ducto biliar comum em rato jovem (RJ após LDBC), em comparação com a porcentagem de colágeno de rato jovem normal (RJ normal). ($p < 0,01$)

Figura 15. Gráfico de caixa (Box plot) da porcentagem de colágeno acumulada no espaço-porta e região periportal após ligadura do ducto biliar comum em rato adulto (RA após LDBC), em comparação com a porcentagem de colágeno de rato adulto normal (RA normal). ($p < 0,01$)

O cálculo do coeficiente de correlação de Spearman demonstrou correlação positiva entre a porcentagem de colágeno e os dias após LDBC em ambos os grupos de animais. Para o animal jovem, o coeficiente de correlação r foi de 0,655, e o valor de $p < 0,01$ (figura 16). O coeficiente de correlação r para os animais adultos foi de 0,441, e o valor de $p = 0,015$ (figura 17).

Figura 16. Diagrama de dispersão de pontos ilustrando a correlação entre a porcentagem de colágeno acumulada em rato jovem após ligadura do ducto biliar comum (RJ após LDBC) e o tempo após cirurgia (dias). ($r = 0,655$ e $p < 0,01$)

Figura 17. Diagrama de dispersão de pontos ilustrando a correlação entre a porcentagem de colágeno acumulada em rato adulto após ligadura do ducto biliar comum (RA após LDBC) e o tempo após cirurgia (dias) ($r = 0,441$ e $p = 0,015$)

A comparação entre as frações de área (% de colágeno) acumulada nos espaços-porta / regiões periportais dos animais de ambos os grupos experimentais demonstrou diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Observou-se maior quantidade de fibrose portal e periportal no animal jovem (figura 18) em relação ao animal adulto.

Figura 18. Gráfico de caixa (Box plot) da porcentagem de colágeno no espaço-porta / região periportal de rato jovem (RJ após LDBC) e adulto após ligadura do ducto biliar comum (RA após LDBC). ($p < 0,05$)

A comparação da porcentagem de acúmulo de colágeno nos animais jovens e adultos em cada etapa do experimento também revelou aumento significativo na porcentagem de colágeno acumulada nos animais jovens entre o 21.º e o 28.º dias de pós-operatório ($p < 0,05$ e $p = 0,016$, respectivamente). Os resultados estão expressos na figura 19.

Figura 19. Gráfico de barras mostrando a porcentagem de colágeno em cada fase do experimento em animais jovens (RJ) e adultos (RA). Valores expressos pelas medianas.

Em resumo, apesar da resposta inicial de proliferação ductular e inflamação de intensidade menor no animal jovem, a porcentagem de colágeno acumulada nos espaços-porta / periportais dos animais jovens foi maior do que a encontrada nos adultos, ou seja, a fibrose portal e a periportal foram mais intensas no rato jovem.

4.3. Avaliação imuno-histoquímica

4.3.1. Desmina

No fígado normal dos animais de diferentes idades, houve expressão de desmina nas células musculares lisas das paredes dos vasos sangüíneos, em alguns poucos miofibroblastos do estroma portal e em determinadas células localizadas nas zonas 1 e 3 dos lóbulos hepáticos (figuras 20-a, 21-a). Estas células foram identificadas como células estreladas (perisinusoidais ou células de Ito) devido à sua localização e seu formato estrelado característico, com seus prolongamentos citoplasmáticos.

Após LDBC, a expressão de desmina aumenta de maneira significativa quer nos animais jovens como nos adultos, em relação ao grupo-controle. Este aumento ocorreu principalmente no interior dos lóbulos hepáticos onde a população de células estreladas aumentou significativamente em ambos os grupos de animais.

Até o 5.º dia de pós-operatório (figuras 20-b, 21-b, 20-c, 21-c), a intensidade de expressão de desmina aumentou de maneira semelhante nos dois grupos e, a partir do 7.º dia (figuras 20-d, 21-d), houve uma maior expressão no animal jovem, o qual atingiu pontuação máxima no 14.º dia de pós-operatório, enquanto o rato adulto atingiu nota 4 (máxima) no 28.º dia (figuras 20 e-f, 21 e-f). Houve, ainda, expressão de desmina nos miofibroblastos localizados na zona de interface entre o espaço-porta e o lóbulo, com intensidade maior, bem como mais precoce nos animais jovens em relação aos animais adultos. No entanto, os miofibroblastos portais apresentaram reação muito fraca e constante ao longo do tempo após LDBC. A expressão de desmina nos miofibroblastos portais foi mais intensa nos animais jovens. Os

resultados finais das pontuações dos animais de diferentes idades e em todas as etapas do experimento foram agrupados pelas medianas e foram expressos nas figuras 22, 23 e 24.

Figura 20. Evolução temporal da expressão de desmina no fígado de rato jovem após ligadura do ducto biliar comum: a) fígado normal com expressão em algumas células no espaço-porta (100x); b) 3.º dia (100x) e c) 5.º dia com aumento discreto da marcação no espaço-porta (40x); d) 7.º dia com aumento da expressão na interface (40x); e) 21.º dia (100x) e f) 28.º dia com aumento significativo da expressão de desmina pelas células estreladas no lóbulo (100x).(imuno-histoquímica, desmina)

Figura 21. Evolução temporal da expressão de desmina no fígado de rato adulto após ligadura do ducto biliar comum: a) fígado normal; b) 3.º dia, c) 5.º dia e d) 7.º dia com discreto aumento da expressão no espaço-porta; e) 21.º dia com aumento da expressão na interface e no lóbulo e f) 28.º dia demonstrando aumento da expressão pelas células estreladas no lóbulo (imuno-histoquímica, desmina, 200x)

Figura 22. Expressão de desmina pela célula estrelada, ao longo do tempo após ligadura do ducto biliar comum.

Figura 23. Expressão de desmina pelo miofibroblasto portal, ao longo do tempo após ligadura do ducto biliar comum.

Figura 24. Expressão de desmina pelo miofibroblasto da interface, ao longo do tempo após ligadura do ducto biliar comum.

4.3.2. Alfa-actina de músculo liso (a-AML)

A reação para a-AML no fígado normal foi positiva na camada média dos vasos dos tratos portaes e em algumas células ao redor das vênulas hepáticas terminais (figuras 25-a, 26-a). Ocasionalmente, células positivas para a-AML foram encontradas no estroma fibroso de ductos biliares e nos sinusóides hepáticos. Após três dias de LDBC, miofibroblastos com reação intensa para a-AML foram facilmente identificados formando verdadeiras camadas ao redor dos ductulos biliares proliferados, à semelhança de uma “cebola” (figuras 25-b, 26-b). A população de células positivas para a-AML continuou a aumentar no decorrer do período pós-operatório até o 7.º dia (figuras 25-c, 25-d, 26-c, 26-d), mantendo a mesma intensidade de expressão até o fim do período de observação do experimento

nos dois grupos etários (figuras 25-e, 25-f, 26-e, 26-f). A expressão de a-AML pela população de miofibroblastos portais foi muito diferente daquela observada pela reação de imuno-histoquímica para desmina, o que determina um fenótipo diferente de expressão de marcadores nesta população celular. Ou seja, enquanto os miofibroblastos localizados no lóbulo e na interface expressam desmina, os miofibroblastos localizados no espaço-porta expressam a-AML de modo intenso.

A expressão de a-AML pelas células estreladas começa a aparecer a partir do 5.º dia após LDBC e mantém-se em um mesmo padrão até o 14.º dia nos animais jovens e adultos. A partir do 21.º dia sua expressão aumenta atingindo maior intensidade (máxima) no 28.º dia no rato adulto em comparação ao jovem (figuras 25-e, 25-f, 26-e, 26-f). Um achado constante nos animais no 5.º dia de pós-operatório é a presença de células estreladas com expressão de a-AML distribuídas ao longo da zona 1 do lóbulo ? a zona mais distal da veia centrolobular (zona 3) ? , formando verdadeiras “pontes” de células miofibroblásticas unindo os espaços-porta (figura 27). Com o decorrer do tempo as células estreladas passam a ocupar todas as zonas do lóbulo hepático.

Figura 25. Evolução temporal da expressão de α -actina de músculo liso (α -AML) no fígado de rato jovem após ligadura do ducto biliar comum: a) fígado normal com expressão de α -AML ao redor da arteríola e veia no espaço-porta (setas; 40x); b) 3.º dia (100x), c) 5.º dia (200x) e d) 7.º dia com aumento expressivo da marcação de α -AML pelos miofibroblastos portais (40x); e) 21.º dia e f) 28.º dia com aumento da expressão pelos miofibroblastos da interface e células estreladas (imunohistoquímica, α -AML, 100x)

Figura 26. Evolução temporal da expressão de α -actina de músculo liso (α -AML) no fígado de rato adulto após ligadura do ducto biliar comum: a) fígado normal com expressão de α -AML ao redor dos vasos no espaço-porta (200x); b) 3.º dia (100x), c) 5.º dia e d) 7.º dia com aumento expressivo da marcação de α -AML pelos miofibroblastos portais (200x); e) 21.º dia (100x) e f) 28.º dia com grande aumento da expressão pelos miofibroblastos da interface e células estreladas, especialmente na figura f. (imuno-histoquímica, α -AML, 40x)

Figura 27. Fígado de rato jovem no 5.º dia após ligadura do ducto biliar comum. Notar intenso aumento na expressão de a-actina de músculo liso (a-AML) em miofibroblastos no espaço-porta, na região de interface e nas células estreladas (setas) localizadas na zona 1 do lóbulo hepático. (imuno-histoquímica, a-AML, 100x)

A população de miofibroblastos localizados na interface entre o espaço-porta e o lóbulo também apresentou reação para a-AML de intensidade progressiva e semelhante nos animais de diferentes idades (figuras 25, 26). Os miofibroblastos da interface apresentaram expressão de a-AML mais intensa do que a reação para desmina ao final do período de observação. Os resultados finais das pontuações dos animais de diferentes idades e nas distintas etapas do experimento foram agrupados pelas medianas e foram expressos nas figuras 28, 29 e 30.

Figura 28. Expressão de a-actina de músculo liso (a-AML) pela célula estrelada, ao longo do tempo após ligadura do ducto biliar comum. Notar que apenas no 28.º dia há diferença entre o animal jovem e o adulto.

Figura 29. Expressão de a-actina de músculo liso (a-AML) pelo miofibroblasto portal, ao longo do tempo após ligadura do ducto biliar comum. Apenas no 5.º dia houve diferença entre o rato jovem e o adulto.

Miofibroblasto da interface ? a-AML

Figura 30. Expressão de a-actina de músculo liso (a-AML) pelo miofibroblasto interface, ao longo do tempo após ligadura do ducto biliar comum.

Em resumo, a expressão de desmina pelas células miofibroblásticas após LDBC foi maior no rato jovem, atingindo seu maior grau em tempo inferior ao alcançado pelo animal adulto. Isto demonstra aumento real de células miofibroblásticas produtoras de colágeno nos animais jovens, fato em consonância com o achado de fibrose mais intensa no rato jovem. Já quanto à expressão de a-AML, a qual traduz a ativação destas células, as diferenças entre os grupos etários foram menores e, em alguns períodos, a expressão de a-AML especialmente pelas células estreladas, foi maior no animal adulto.

5

DISCUSSÃO

O principal objetivo desta pesquisa foi estudar eventuais diferenças da resposta do fígado frente à obstrução biliar completa entre o organismo jovem e o adulto, visando trazer subsídios histopatológicos à compreensão da atresia das vias biliares, afecção própria do período neonatal precoce. O modelo experimental de ligadura do ducto biliar comum no rato jovem envolve apenas um dos aspectos implicados na fisiopatologia da atresia das vias biliares: o fator obstrutivo, sem, no entanto, evocar o processo inflamatório inicial que antecede a destruição e obliteração dos ductos biliares nesta doença.

Os trabalhos sobre colestase experimental obtida por meio de LDBC foram, na maioria, realizados em animais adultos. As pesquisas com animais recém-nascidos e jovens encontram dificuldades técnicas intra-operatórias devidas às dimensões das estruturas anatômicas; procedimentos anestésicos especiais; necessidade de material de microcirurgia de custo mais alto; problemas em manter os animais vivos pelo tempo de duração da experiência, entre outros fatores que contribuem para que a utilização de animais jovens como animais de experimentação seja mais difícil e, por isso, mais esporádica. Some-se a isso o fato de que os poucos trabalhos realizados em animais jovens apresentam resultados conflitantes. Especificamente, trabalhos referentes à obstrução biliar experimental em animais jovens ainda não foram suficientemente explorados na literatura.

A extrapolação dos resultados obtidos em animais adultos para os recém-nascidos e jovens pode, por sua vez, não traduzir com fidelidade a patogênese das doenças colestáticas da infância. Por isso, o primeiro passo foi a obtenção de um modelo experimental em animal jovem que pudesse trazer as informações desejadas e de forma reprodutível.

Foram realizadas análises descritivas e semiquantitativas das alterações histológicas à microscopia de luz com a coloração pela hematoxilina-eosina. Pôde-se observar que a proliferação ductular foi o achado mais marcante nas fases iniciais após a ligadura, fato amplamente relatado na literatura e também coincidente com o encontrado nas biópsias hepáticas em fases iniciais de lactentes portadores de AVB^{1,77}.

No presente estudo houve diferenças estatisticamente significantes entre as respostas dos animais de diferentes idades no que se refere à proliferação ductular. Embora ambos os grupos atingissem o mesmo grau de proliferação ductular, a intensidade de resposta do animal jovem foi menor que a do adulto, só alcançando o grau observado neste, no 21.º dia de pós-operatório. No rato adulto, entretanto, a proliferação ductular atingiu grau máximo já no 5.º dia após a cirurgia.

A inflamação presente no espaço-porta, caracterizada por infiltrado neutrofílico e linfocítico, também apresentou evolução menos intensa e mais lenta nos animais jovens.

Resultados semelhantes foram obtidos por Medeiros *et al.*²⁰, estudando as diferenças histológicas secundárias à obstrução do ducto biliar comum em ratos adultos e jovens com peso médio de 20 gramas durante período de quatro a quarenta dias de obstrução. Os autores observaram resposta inflamatória inicial mais lenta nos

animais jovens em relação aos adultos e, ao final do período de observação, houve evolução mais rápida para formação de nódulos de regeneração e cirrose nos animais jovens. Omori *et al.*²², utilizando modelo de obstrução biliar por meio de LDBC em ratos jovens com duas, quatro e seis semanas de vida e comparando com ratos adultos, estudaram a expressão tecidual hepática de alfa-feto proteína. Verificaram que a proliferação ductular e a fibrogênese foram mais intensas no rato jovem em relação ao adulto. Observaram, também, diferenças na expressão tecidual de alfa-feto proteína durante o processo evolutivo, sendo mais intensa nos animais mais jovens e ausente nos animais adultos. Zimmermann *et al.*²¹, utilizando o modelo de LDBC em ratos por período de quatro semanas, estudaram animais de quatro, sete, catorze e vinte e duas semanas de vida e compararam-nos com animais adultos. O estudo demonstrou que o desenvolvimento de cirrose biliar secundária à obstrução biliar em ratos é idade-dependente durante o período de desenvolvimento e que os animais adultos apresentaram maior fibrogênese em relação aos animais jovens.

Como se pode observar, a literatura mostra resultados conflitantes em relação às diferenças de intensidade de resposta dos animais de determinadas idades à microscopia de luz.

O estudo da fibrose decorrente da obstrução biliar completa nos animais jovens e adultos revelou que a formação e deposição inicial de colágeno ocorrem ao redor dos ductulos biliares neoformados no espaço-porta e que, com o tempo, há formação de septos fibrosos. A análise quantitativa do colágeno particularmente nessa região do espaço-porta e região periportal (fibrose portal e periportal), realizada com o auxílio de programa de computador, trouxe informações adicionais de relevância^{89,90}.

Notou-se correlação entre o tempo de ligadura e a deposição de colágeno nos espaços-porta em ambos os grupos de animais. No entanto, a porcentagem de colágeno acumulada nos espaços-porta / periportais dos animais jovens foi maior do que a do adulto, ou seja, a fibrose portal e a periportal foram mais intensas no rato jovem. A deposição de colágeno em cada etapa do experimento foi também diferente no animal jovem relativamente ao adulto. Observou-se que até o 14.º dia a porcentagem de colágeno acumulada nos espaços-porta foi semelhante nos dois grupos etários. Porém, a partir do 21.º dia, houve aumento mais acentuado na porcentagem de colágeno acumulada nos animais jovens relativamente aos adultos. É interessante notar que o aumento da deposição de colágeno observado no rato jovem no 21.º dia coincidiu com o grau mais intenso de proliferação ductular.

Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Medeiros *et al.*²⁰ e por Omori *et al.*²², embora em nenhum desses estudos tenha sido realizada a quantificação propriamente dita da fibrose. Esses achados divergem daqueles obtidos por Zimmermann *et al.*²¹, em cujo estudo os animais adultos apresentaram aumento da fibrogênese com diminuição da massa de parênquima hepático em relação aos animais jovens. Nesse estudo, o método de quantificação utilizado foi a relação entre o peso da massa hepática e o dos animais, o que pode ter influenciado a discrepância dos resultados.

Até então verificou-se resposta inflamatória e proliferação ductular de evolução temporal diferente no animal jovem em comparação ao adulto. Inicialmente ambas alterações histológicas foram de evolução menos intensa nos animais jovens, mas, ao final do experimento, observou-se maior formação de fibrose portal e periportal, cujos valores foram até superiores aos obtidos nos animais

adultos. Diante desses resultados surgiu uma questão: a proliferação ductular e a deposição de colágeno no espaço-porta no organismo jovem seriam fenômenos temporais distintos e independentes entre si?

Estudou-se, então, por meio da reação de imuno-histoquímica, a principal família de células envolvidas na síntese das proteínas da matriz extracelular: as células mesenquimais miofibroblásticas. Destas, a célula estrelada tem sido o foco de vários estudos como sendo a principal fonte produtora de colágeno⁶⁰⁻⁶⁴. Entretanto, no modelo de ligadura de ducto biliar, outras populações de células de miofibroblastos podem estar envolvidas com os estágios iniciais da fibrogênese, especialmente os miofibroblastos portais e aqueles localizados na zona de interface, entre o espaço-porta e o lóbulo⁶⁶⁻⁶⁷. Neste modelo experimental, bem como em diversas formas clínicas de doenças colestáticas, a fibrose é chamada portal ou de padrão biliar.

Após um estímulo lesivo inicial (obstrução biliar) à célula ductular biliar, ocorre uma seqüência de eventos imunológicos e inflamatórios que acarretam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico, eicosanóides, proteinases e fatores de estimulação e de crescimento celular, entre outros, os quais promovem ativação das células estreladas e dos miofibroblastos, desencadeando a produção de colágeno⁵³. As células estreladas e os miofibroblastos interagem com o sistema imunológico de maneira bidirecional, promovendo a quimiotaxia e aderência de leucócitos, assim como sua ativação⁵⁴.

Vários autores demonstraram que as células estreladas de ratos apresentam reação imuno-histoquímica para desmina e, quando ativadas, também para alfa-actina de músculo liso (α -AML)⁵⁵⁻⁵⁹. No presente estudo, avaliou-se a expressão

“setorial” semiquantitativa de desmina e α -actina de músculo liso pelas células estreladas, miofibroblastos portais e miofibroblastos da interface. Os resultados obtidos demonstraram divergência na expressão dos marcadores nas diferentes populações de miofibroblastos, especialmente os localizados no espaço-porta, com uma reação fraca para desmina e intensa para α -AML, o que sugere um fenótipo diferente de expressão de marcadores nesta população celular. Cassiman *et al.*⁶⁵, utilizando modelo de lesão hepática em ratos adultos por tetracloreto de carbono e ligadura do ducto biliar, estudaram as populações de miofibroblastos no fígado e obtiveram resultados semelhantes com relação à expressão de desmina e α -AML por essas células portais. Nesta pesquisa, a intensidade da expressão de desmina após LDBC foi maior no rato jovem, em todas as populações de células miofibroblásticas, atingindo seu maior grau em tempo inferior àquele alcançado pelo animal adulto. Isto parece demonstrar aumento real de células miofibroblásticas nos animais jovens, fato consoante com o achado de maior fibrose observada.

Quanto à expressão de α -AML, as diferenças entre os grupos etários de animais não foram tão evidentes. Em alguns períodos, a expressão de α -AML foi maior no rato adulto, especialmente pelas células estreladas (28.º dia). Uma explicação possível seria o fato de que, neste modelo de fibrose portal de padrão biliar, as células mais importantes nas etapas iniciais da fibrogênese devam ser os miofibroblastos portais e os da interface, e não as células estreladas localizadas no lóbulo hepático. Não ocorreram diferenças estatísticas na ativação (expressão de α -AML) dos miofibroblastos da interface nos animais de diferentes idades.

Em resumo, apesar das respostas iniciais de inflamação e de proliferação ductular menos intensas observadas nos animais jovens, a fibrose portal e a periportal

foram mais intensas no rato jovem ao final do período de observação do experimento. Os animais jovens apresentaram também expressão de desmina mais intensa e mais precoce que os adultos, fato que parece ser compatível com o achado de maior fibrose no rato jovem.

Desta maneira, cumpriram-se os objetivos inicialmente propostos para esta pesquisa. Cabe, porém, uma possível explicação dos resultados obtidos.

Seria possível supor que, apesar da repercussão histológica inicial menos intensa, o sistema imunológico imaturo do animal jovem seja ativado de maneira mais desordenada e com menor capacidade de auto-regulação, com maior produção de citocinas e outros mediadores envolvidos no processo de ativação dos miofibroblastos. Estes, por sua vez também imaturos, não seriam capazes de interagir com o sistema imunológico sob a persistência do estímulo lesivo. O estudo da expressão tecidual de citocinas pró-inflamatórias e de outros fatores estimuladores e de crescimento pode ser um caminho interessante para explicar as diferenças evolutivas observadas nos dois grupos etários, utilizando-se o mesmo modelo experimental⁹¹⁻⁹⁵.

Outra explicação possível poderia ser a de que a proliferação ductular e a formação de fibrose ocorram de forma temporalmente independente nos animais jovens. A proliferação ductular poderia ser mais bem estudada por meio de marcadores de imuno-histoquímica, especialmente as citoqueratinas 7 e 19, entre outros⁹⁶⁻¹⁰⁰. A utilização destes marcadores no animal jovem poderia ser útil para se tentar determinar a origem das células epiteliais na proliferação ductular e sua relação com o processo de fibrogênese¹⁰¹. Esta também é uma nova linha de investigação que pode ser realizada com o mesmo modelo experimental.

Finalmente, uma terceira explicação poderia basear-se no fato de que o processo de fibrogênese resulte, em última análise, de uma perda dos mecanismos regulatórios das células entre si e das células com a matriz extracelular, com uma maior síntese e / ou menor degradação do colágeno⁷⁵. O animal jovem poderia apresentar deficiência de collagenases e metaloproteases responsáveis pela degradação do tecido fibrótico. A observação de o rato jovem apresentar evolução mais intensa para fibrose pode ser transposta para a prática clínica, indicando a necessidade de intervenção a mais precoce possível para as crianças portadoras de AVB. Esta linha de pesquisa pode ser utilizada também para avaliar o papel de eventuais opções terapêuticas medicamentosas nos animais jovens e adultos, e para se tentar determinar o ponto no qual a evolução da fibrose para cirrose se torna irreversível, por meio de desobstrução cirúrgica seriada dos animais previamente submetidos à ligadura do ducto biliar comum¹⁰²⁻¹⁰⁶. Esta é uma investigação interessante, pois poderá esclarecer uma situação freqüente na prática clínica, na qual a criança operada de AVB evolui inexoravelmente para a cirrose hepática, mesmo após a retirada do estímulo lesivo de obstrução biliar¹⁰⁷.

6

CONCLUSÃO

Nas condições do presente trabalho experimental, pôde-se concluir que houve diferenças de respostas entre os animais jovens e adultos frente à obstrução biliar completa, fato que pôde ser deduzido a partir dos seguintes resultados:

1. A resposta inicial do rato jovem após LDBC ocorreu de forma menos intensa que a do animal adulto:
 - 1a. A proliferação ductular foi menos intensa inicialmente no animal jovem, atingindo o mesmo grau da observada no adulto apenas no 21.º dia de pós-operatório.
 - 1b. A resposta inflamatória inicial, avaliada pela presença de infiltrado inflamatório portal (neutrófilico ou linfocítico), também apresentou intensidade menor no animal jovem relativamente ao adulto.
2. Apesar desta resposta inicial menor, a fibrogênese foi mais intensa nos animais jovens em comparação aos animais adultos, o que foi demonstrado pela quantificação da fibrose portal e periportal.
3. A resposta das células estreladas e dos miofibroblastos à obstrução biliar completa também apresentou diferenças, com expressão de desmina maior e mais precoce nos animais jovens em relação aos adultos.

7

ANEXO

Tabela 1: Número total de animais em cada fase incluídos no experimento

Tempo (dias)	Ratos jovens (RJ)		Ratos adultos (RA)		Sobrevida (%)	
	Operados (n)	Vivos (n)	Operados (n)	Vivos (n)	RJ	RA
3	15	13	15	12	86,6	80
5	15	14	15	15	93,3	100
7	15	14	15	15	93,3	100
14	15	12	15	12	80	80
21	15	13	15	15	86,6	100
28	15	10	15	14	66,6	93,3
<i>Total</i>	90	76	90	83	84,4	92,2

Tabela 2: Resultados finais da semiquantificação da proliferação ductular, inflamação, infiltrados neutrofílico e linfocítico, realizada pela coloração hematoxilina-eosina, em cada fase do experimento (3, 5, 7, 14, 21 e 28 dias) em rato adulto (RA) e rato jovem (RJ):

	Proliferação ductular	Inflamação	Infiltrado Neutrofílico	Infiltrado Linfocítico
nota	0 a 4	0 a 4	0 a 4	0 a 4
RA3				
mediana	3	2	2	2
RA5				
mediana	4	2	2	2
RA7				
mediana	4	2	2	2
RA14				
mediana	4	3	2	3
RA21				
mediana	4	3	2	3
RA28				
mediana	4	3	2	3
RJ3				
mediana	1	1	1	1
RJ5				
mediana	2	1	1	1
RJ7				
mediana	2	1	1	1
RJ14				
mediana	3	2	2	2
RJ21				
mediana	4	3	2	3
RJ28				
mediana	4	3	2	3

Tabela 3: Valores obtidos pela quantificação automatizada do colágeno – fibrose portal / periportal (picrossírius) – em cada fase do experimento (3, 5, 7, 14, 21, 28 dias) em rato jovem (RJ) e rato adulto (RA), e também nos fragmentos de fígado normal dos animais jovens (FNJ) e adultos (FNA):

		Área colágeno	Área espaço- porta	% colágeno (fração de área)
Rato jovem				
FNJ-1 / 10 campos		964,49	84032,09	1,147764
FNJ-2 / 10 campos		1008,39	31714,31	3,179606
RNJ-3 / 10 campos		1179,51	36898,98	3,196592
RNJ-4 / 10 campos		1011,83	56025,49	1,806017
FNJ-5 / 10 campos		1062,69	51696,55	2,05563
RJ3-3	3	7760,49	117127,5	6,625677
RJ3-1	3	7854,47	152190	5,160963
RJ3-5	3	6716,47	203708,4	3,2971
RJ3-11	3	6951,12	145763,5	4,768766
RJ3-18	3	7550,82	125265,3	6,027862
RJ5-7	5	10519,48	265907	3,956075
RJ5-9	5	10746,7	227853	4,716506
RJ5-10	5	10162,43	259632,8	3,914155
RJ5-11	5	10943,94	216667,7	5,051025
RJ5-13	5	10935,77	249104,5	4,390033
RJ7-17	7	13613,12	321191,5	4,238319
RJ7-18	7	11324,12	314720	3,598157
RJ7-19	7	12139,77	292823,1	4,145769
RJ7-20	7	11016,33	358093,6	3,076383
RJ7-21	7	11181,54	299737,4	3,730445
RJ14-1	14	14723,49	219097	6,720078
RJ14-2	14	15896,05	296925,4	5,35355
RJ14-3	14	17216,68	368856,9	4,667577
RJ14-5	14	14749,93	267752,2	5,508799
RJ14-14	14	14145,32	302790,1	4,671659
RJ21-9	21	18989,31	272884,1	6,553159
RJ21-13	21	17051,4	276845,3	6,85918
RJ21-10	21	16714,5	228935,6	7,300961
RJ21-12	21	18148,69	277292,9	6,544953
RJ21-1	21	18525,48	255981,4	7,237041
RJ28-1	28	20120,38	269170	7,474971
RJ28-2	28	19416,19	219290,2	8,854107
RJ28-3	28	18592,85	263716,5	7,050317
RJ28-4	28	19957,25	261749,3	7,624567
RJ28-5	28	20353,06	306208,7	6,646794

		Área colágeno	Área espaço- porta	% colágeno (fração de área)
Rato adulto				
FNA-4 / 10 campos		1122,23	85740,69	1,308865
FNA-5 / 10 campos		1422,01	80381,64	1,769073
FNA-6 / 10 campos		1084,7	69236,03	1,56667
FNA-7 / 10 campos		1202,97	64717,99	1,858788
FNA-8 / 10 campos		1552,16	51516,39	3,012944
RA3-6	3	5290,92	117217,3	4,513771
RA3-7	3	4362,49	274833,4	1,587322
RA3-8	3	4415,47	112770,9	3,915434
RA3-9	3	3801,06	118201,6	3,215743
RA3-11	3	4981,62	103038,9	4,834698
RA5-3	5	6865,78	144615,4	4,747613
RA5-4	5	7091,2	115027,6	6,164781
RA5-5	5	7316,34	213794,3	3,42214
RA5-6	5	7465,49	109118,9	6,84161
RA5-7	5	6720,19	174944,2	3,841333
RA7-7	7	7673,71	211068,1	3,635656
RA7-8	7	8201,26	170886	4,799258
RA7-9	7	8140,15	261789,5	3,109426
RA7-10	7	8214,63	195329,2	4,205531
RA7-11	7	8428,64	241575,6	3,489028
RA14-4	14	11340,92	221903,4	5,110746
RA14-5	14	10133,22	238273,9	4,252761
RA14-6	14	10080,07	247202,5	4,077657
RA14-7	14	10523,36	180149,8	5,84145
RA14-8	14	11074,7	226857,9	4,881778
RA21-7	21	12288,93	357517,7	3,437293
RA21-8	21	13851,64	222640,8	6,221519
RA21-11	21	11437,7	176009,2	6,498353
RA21-12	21	10096,39	177117,9	5,700378
RA21-13	21	9614,53	199939,3	4,808724
RA28-7	28	14691,72	246159,8	5,968367
RA28-8	28	16082	271845,2	5,915867
RA28-9	28	15231,63	329645,9	4,620604
RA28-10	28	14777,53	334778,2	4,414126
RA28-11	28	14809,29	218327,6	6,783059

Tabela 4: Avaliação semiquantitativa pela imuno-histoquímica da expressão de desmina pela célula estrelada, miofibroblasto portal e miofibroblasto da interface em cada fase do experimento (3, 5, 7, 14, 21, 28 dias após ligadura do ducto biliar comum) em rato adulto (RA) e rato jovem (RJ):

	Cél. estrelada	Miofibr. portal	Miofibr. interface
nota	0 a 4	0 a 4	0 a 4
RA3			
mediana	1	1	1
RA5			
mediana	2	1	2
RA7			
mediana	2	1	2
RA14			
mediana	3	1	3
RA21			
mediana	3	1	3
RA28			
mediana	4	1	3
RJ3			
mediana	1	1	1
RJ5			
mediana	2	2	2
RJ7			
mediana	3	2	3
RJ14			
mediana	4	2	3
RJ21			
mediana	4	2	3
RJ28			
mediana	4	2	3

Tabela 5: Avaliação semiquantitativa pela imuno-histoquímica da expressão de alfa-actina de músculo liso pela célula estrelada, miofibroblasto portal e miofibroblasto da interface em cada fase do experimento (3, 5, 7, 14, 21, 28 dias após ligadura do ducto biliar comum) em rato adulto (RA) e rato jovem (RJ):

número	Célula estrelada	Miofibroblasto portal	Miofibroblasto da interface
nota	0 a 4	0 a 4	0 a 4
RA3			
mediana	0	2	1
RA5			
mediana	2	3	1
RA7			
mediana	2	3	2
RA14			
mediana	2	3	3
RA21			
mediana	3	3	4
RA28			
mediana	4	3	4
RJ3			
mediana	0	2	1
RJ5			
mediana	2	2	1
RJ7			
mediana	2	3	2
RJ14			
mediana	2	3	3
RJ21			
mediana	3	3	4
RJ28			
mediana	3	3	4

Referências bibliográficas

1. Silva MM, Maksoud JG. Atresia das vias biliares. In: Maksoud JG. *Cirurgia pediátrica* 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2003. p.904-22.
2. Balistreri WF, Grand R, Hoofnagle JH, Suchy FJ, Ryckman FC, Perlmutter DH, Sokol RJ. Biliary atresia: current concepts and research directions. *Hepatology* 1996;23:1682-95.
3. Ryckman FC, Alonso MH, Bucuvalas JC, Balistreri WF. Biliary atresia: surgical management and treatment options as they relate to outcome. In: Annual 20th Conference on Pediatric Disease. Pediatric Hepatology and Liver Transplantation. Aspen, Colorado; 1998. p.2-19.
4. Muraji T, Nishijima E, Higashimoto Y, Tsugawa C. Biliary atresia: current management and outcome. *Tohoku J Exp Med* 1997;181:155-60.
5. Maksoud JG, Tannuri U, Santos MM, Ayoub AAR, Silva MM, Maksoud Filho JG, Velhote MCP, Gibelli NEM, Pinho ML. Transplante de fígado. In: Maksoud JG: *Cirurgia pediátrica* 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2003. p.949-69.
6. Saing H, Fan ST, Chan KL, Wei W, Mya GH, Lo CM, Cheng W. Treatment of biliary atresia by portoenterostomy and liver transplantation: the queen Mary hospital, Hong Kong experience. *Tohoku J Exp Med* 1997;181:109-16.
7. Nagral S, Muiesan P, Vilca-Melendez H, Mieli-Vergani G, Baker A, Karani J, Howard E, Rela M, Heaton N. Liver transplantation for extra hepatic biliary atresia. *Tohoku J Exp Med* 1997;181:117-27.

8. Lefkowitz JH. Biliary atresia. *Mayo Clin Proc* 1998;73:90-5.
9. Gayotto LCC, Mello ES, Strauss E. Colestase. In: Gayotto LCC, Alves VAF. Doenças do fígado e vias biliares. São Paulo: Atheneu, 2001. p.753-762.
10. Kullak-Ublick GA, Meier PJ. Pathophysiology of liver disease: mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis* 2000;4:357-85.
11. Crawford JM. The liver and the biliary tract: the liver. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Robbins: pathologic basis of disease*. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 1994. p.831-96.
12. Cameron GR, Oakley CL. Ligation of the common bile duct. *J Pathol Bact* 1932;35:769-98.
13. Chou ST, Gibson JB. A histochemical study of the bile ducts in long-term biliary obstruction in the rat. *J Pathol* 1971;103:163-75.
14. Schaffner F, Bacchin PG, Hutterer F, Scharnbeck HH, Sarkozi LL, Denk H, Popper H. Mechanism of cholestasis: structural and biochemical changes in the liver and rats after bile duct ligation. *Gastroenterology* 1971;60:888-97.
15. Johnstone JMS, Lee EG. A quantitative assessment of the structural changes in the rat's liver following obstruction of the common bile duct. *Br J Exp Pathol* 1976;57:85-94.
16. Jones AL, Schmucker DL, Mooney JS, Adler RD, Ockner RK. Morphometric analysis of rat hepatocytes after total biliary obstruction. *Gastroenterology* 1976;71:1050-60.
17. De Vos R, Desmet VJ. Morphologic changes of the junctional complex of the hepatocytes in rat liver after bile duct ligation. *Br J Exp Pathol* 1978;59:220-7.

18. Vital A, Bioulac-Sage P, Iron A, Balabaud C. Morphologic structure of bile canaliculi after bile duct ligation in the rat. *Arch Pathol Lab Med* 1982;106:464-7.
19. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984;65:305-11.
20. Medeiros MVMJ, Freitas LAR, Andrade ZA. Differences in hepatic pathologic resulting from bile duct obstruction in young and old rats. *Braz J Med Biol Res* 1988;21:75-83.
21. Zimmermann H, Blaser H, Zimmermann A, Reichen J. Effect of development on the functional and histological changes induced by bile-duct ligation in the rat. *J Hepatol* 1994;20:231-9.
22. Omori M, Evarts RP, Omori N, Hu Z, Marsden ER, Thorgerirsson SS. Expression of α -fetoprotein and stem cell factor/c-kit system in bile duct ligated young rats. *Hepatology* 1997;25:1115-22.
23. Hyams JS, Glaser JM, Leichtner AM. Discordance for biliary atresia in two sets of monozygotic twins. *J Pediatr* 1985;107:420-2.
24. Strickland AD, Shannon K, Coln CD. Biliary atresia in two sets of twins. *J Pediatr* 1985;107:418-20.
25. Tan CEL, Driver M, Howard ER, Moscoso GJ. Extrahepatic biliary atresia: a first-trimester event? Clues from light microscopy and immunohistochemistry. *J Pediatr Surg* 1994;29:808-14.
26. Cocjin J, Rosenthal P, Buslon V, Luk L Jr, Barajas L, Geller SA, Ruebner B, French S. Bile ductule formation in fetal, neonatal, and infant livers compared with extrahepatic biliary atresia. *Hepatology* 1996;24:568-74.

-
27. Schreiber RA, Kleinman RE. Genetic, immunology, and biliary atresia: an opening or a diversion? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;16:111-3.
 28. Raweily EA, Gibson AAM, Burt AD. Abnormalities of intrahepatic bile ducts in extrahepatic biliary atresia. *Histopathology* 1990;27:521-7.
 29. Ando K, Miyano T, Fujimoto T, Ohya T, Lane G, Tawa T, Tokita A, Yabuta K. Sibling occurrence of biliary atresia and biliary dilatation. *J Pediatr Surg* 1996;31:1302-4.
 30. Yoon PW, Bresee JS, Olney RS, James LM, Khoury MJ. Epidemiology of biliary atresia: a population-based study. *Pediatrics* 1997;99:376-82.
 31. Desmet VJ. Congenital diseases of intrahepatic bile ducts: variation of the theme "Ductal Plate Malformation". *Hepatology* 1992;16:1069-83.
 32. Tyler KL, Sokol RJ, Oberhaus SM, Le M, Karrer FM, Narkewicz MR, Tyson RW, Murphy JR, Low R, Brown WR. Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts. *Hepatology* 1998;27:1475-82.
 33. Riepenhoff-Talty M, Gouvea V, Evans MJ, Svensson L, Hoffenberg E, Sokol RJ, Uhnou I, Greenberg SJ, Shäkel K, Zhaori G, Fitzgerald J, Chong S, El-Yousef M, Nemeth A, Brown M, Piccoli D, Hyams J, Ruffin D, Rossi T. Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. *J Infect Dis* 1996;174:8-15.
 34. Bobo L, Ojeh C, Chiu D, Machado A, Colombani P, Schwarz K. Lack of evidence for rotavirus by polymerase chain reaction /enzyme immunoassay of hepatobiliary samples from children with biliary atresia. *Pediatr Res* 1997;41:229-34.

35. Ayas MF, Hillemeier C, Olson AD. Lack of evidence for seasonal variation in extrahepatic biliary atresia during infancy. *J Clin Gastroenterol* 1996;22:292-4.
36. Silveira TR, Salzano FM, Donaldson PT, Mieli-Vergani G, Howard ER, Mowat AL. Association between HLA and extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;16:114-7.
37. Broomé U, Nemeth A, Hultcrantz R, Scheynius A. Different expression of HLA-DR and ICAM-1 in livers from patients with biliary atresia and byler's disease. *J Hepatol* 1997;26:857-62.
38. Kobayashi H, Puri P, O'Briain DS, Surana R, Dublin TM. Hepatic overexpression of MHC class II antigens and macrophage-associated antigens (CD68) in patients with biliary atresia of poor prognosis. *J Pediatr Surg* 1997;32:590-3.
39. Lobo-Yeo A, Senaldi G, Portmann B, Mowart AP, Mieli-Vergani G, Vergani D. Class I and class II major histocompatibility complex antigen expression on hepatocytes: a study children with liver disease. *Hepatology* 1990;12:224-32.
40. Minnick KE, Kreisberg R, Dilon PW. Soluble ICAM-1(sICAM 1) in biliary atresia and its relationship to disease activity. *J Surg Res* 1998;76:53-6.
41. Dillon P, Belchis D, Tracy T, Cilley R, Hafer L, Krummel T. Increased expression of intercellular adhesion molecules in biliary atresia. *Am J Pathol* 1994;145:263-7.
42. Kawaguchi T, Sakisaka S, Sata M, Mori M, Tanikawa K. Different lobular distributions of altered hepatocyte tight junctions in rat models of intrahepatic and extrahepatic cholestasis. *Hepatology* 1999;29:205-16.

-
43. Leon MP, Bassendine MF, Wilson JL, Ali S, Thick M, Kirby JA. Immunogenicity of biliary epithelium: investigation of antigen presentation to CD4⁺ T cells. *Hepatology* 1996;24:561-7.
 44. Adkins B. T-cell function in newborn mice and humans. *Immunol Today* 1999;20:330-5.
 45. Tracy TF, Dillon P, Fox ES, Minnick K, Vogler C. The inflammatory response in pediatric biliary disease: macrophage phenotype and distribution. *J Pediatr Surg* 1996;31:121-6.
 46. Shimizu Y, Miyazaki M, Ito H, Nakagawa K, Ambiru S, Shimizu H, Nakajima N. Enhanced endothelial cell injury by activated neutrophils in patients with obstructive jaundice. *J Hepatol* 1997;27:803-9.
 47. Crawford JM, Boyer JL. Clinicopathology conferences: inflammation-induced cholestasis. *Hepatology* 1998;28:253-60.
 48. Rosensweig JN, Omori M, Page K, Potter CJ, Perlman EJ, Thorgeirsson SS, Schwarz KB. Transforming growth factor- β 1 in plasma and liver of children with liver disease. *Pediatr Res* 1998;44:402-9.
 49. Hautekeete ML, Geerts A. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Virchows Arch* 1997;430:195-207.
 50. Tao LH, Toi M, Naruse K, Kuroda N, Hiroi M, Enzan H. Ito cell's migration into fibrous areas is an essential prerequisite to their myofibroblastic transformation. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):F59.
 51. Hellerbrand C, Wang SC, Tsukamoto H, Brenner DA, Rippe RA. Expression of intercellular adhesion molecule 1 by activated hepatic stellate cells. *Hepatology* 1996;24:670-6.

52. Kinnman N, Gorla O, Wendum D, Gendron MC, Rey C, Poupon R, Housset C. Hepatic stellate cell proliferation is an early platelet-derived growth factor-mediated cellular event in rat cholestatic liver injury. *Lab Invest* 2001;81:1709-16.
53. Marra F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *J Hepatol* 1999;31:1120-30.
54. Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis* 2001;21:417-26.
55. Yokoi Y, Namihisa T, Hiroyuki K, Komatsu I, Miyazaki A, Watanabe S, Usui K. Immunocytochemical detection of desmin in fat-storing cells (Ito cells). *Hepatology* 1984;4:709-14.
56. Ballardini G, Groff P, De Giorgi LB, Schuppan D, Bianchi FB. Ito cell heterogeneity: desmin-negative Ito cells in normal rat liver. *Hepatology* 1994;19:440-6.
57. Ballardini G, Fallani M, Biagini G, Bianchi FB, Pisi E. Desmin and actin in the identification of Ito cells and monitoring their evolution to myofibroblasts in experimental liver fibrosis. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1988;56:45-9.
58. Burt AD, Robertson JL, Heir J, Macsween RNM. Desmin-containing stellate cells in rat liver; distribution in normal animals and response to experimental acute liver injury. *J Pathol* 1986;150:29-35.
59. Schmitt-Gräff A, Krüger S, Bochar F, Gabbiani G, Denk H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and disease human livers. *Am J Pathol* 1991;138:1233-42.

60. Gaça MDA, Zhou X, Benyon RC. Regulation of hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis by proteinase-activated receptors. *J Hepatol* 2002;36:362-9.
61. Bataller R, Brenner DA. Hepatic Stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2001;21:437-51.
62. Abdel-Aziz G, Rescan PY, Clement B, Lebeau G, Rissel M, Grimaud JA, Campion JP, Guillouzo A. Cellular sources of matrix proteins in experimentally induced cholestatic rat liver. *J Hepatol* 1991;164:167-74.
63. Ramm GA, Nair VG, Bridle KR, Shepherd RW, Crawford DHG. Contribution of hepatic parenchymal and nonparenchymal cells to hepatic fibrogenesis in biliary atresia. *Am J Pathol* 1998;153:527-35.
64. Maher JJ, McGuire R. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. *J Clin Invest* 1990;86:1641-8.
65. Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Deneef C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol* 2002;36:200-9.
66. Tuchweber B, Desmoulière A, Bochaton-Piallat ML, Rubbia-Brandt L, Gabbiani G. Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest* 1996;74:265-78.
67. Desmoulière A, Darby I, Costa AMA, Raccourt M, Tuchweber B, Sommer P, Gabbiani G. Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest* 1997;76:765-78.

68. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The hepatic extracellular matrix: components and distribution and normal liver. *Virchows Arch A Pathol Anat* 1993;423:1-11.
69. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The hepatic extracellular matrix: ontogenesis, regeneration and cirrhosis. *Virchows Arch A Pathol Anat* 1993;423:77-84.
70. Scott JE, Bosworth TR, Cribb AM, Gressner AM. The chemical morphology of extracellular matrix in experimental rat liver fibrosis resembles that of normal developing connective tissue. *Virchows Arch* 1994;424:89-98.
71. Murata K, Kudo M, Motoyama OT. Changes of collagen types at various stages of human liver cirrhosis. *Hepato-gastroenterol* 1984;31:158-61.
72. Geerts A, Schuppan D, Lazeroms S, Zanger R, Wisse E. Collagen type I and III occur together in hybrid fibrils in the space of disse of normal rat liver. *Hepatology* 1990;12:233-41.
73. Shirahase I, Ooshima A, Tanaka K, Yamabe H, Inomata Y, Ozawa K. Immunohistochemical demonstration of collagen types III and IV and myofibroblasts in the liver of patients with biliary atresia. *J Pediatr Surg* 1994;29:639-44.
74. Toppa NH, Raso P. Distribuição do colágeno I e III na cirrose hepática pelo método picrosirius polarização. *Arq Gastroent S Paulo* 1984;21:116-8.
75. Parise ER. Matriz extracelular – fibrogênese. In: Gayotto LCC, Alves VAF. *Doenças do fígado e vias biliares*. São Paulo: Atheneu, 2001. p.41-50.
76. Albanis E, Friedman SL. Hepatic fibrosis: pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 2001;5:315-34.

-
77. Kinugasa Y, Nakashima Y, Matsuo S, Shono K, Suita S, Sueishi K. Bile ductular proliferation as a prognostic factor in biliary atresia: an immunohistochemical assessment. *J Pediatr Surg* 1999;34:1715-20.
 78. Lichtman SN, Sartor RB. Duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology* 1991;100:1785-7.
 79. Grapone C, Pinzani M, Parola M, Pellegrini G, Caligiuri A, DeFranco R, Marra F, Herbst H, Alpini G, Milani S. Expression of platelet-derived growth factor in newly formed cholangiocytes during experimental biliary fibrosis in rats. *J Hepatol* 1999;31:100-9.
 80. LeSage G, Glaser S, Alpini G. Regulation of cholangiocyte proliferation. *Liver* 2001;21:73-80.
 81. Petersen C, Grasshoff S, Luciano L. Diverse morphology of biliary atresia in an animal model. *J Hepatol* 1998;28:603-7.
 82. Paku S, Schnur J, Nagy P, Thorgeirsson SS. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am J Pathol* 2001;158:1313-23.
 83. Zajicek G. Hepatocytes and intrahepatic bile duct epithelium originate from a common stem cell. *Gastroenterology* 1991;100:582-3.
 84. Slott PA, Liu MH, Tavoloni N. Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology* 1990;99:466-77.
 85. Van Eyken P, Sciot R, Desmet V. Intrahepatic bile duct development in the rat: a cytokeratin-immunohistochemical study. *Lab Invest* 1988;59:52-59.
 86. Kraus AL. Research Methodology. In: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH. *The laboratory rat*. San Diego: Academic Press, Inc., 1979. v.2,p.14.

-
87. Danneman PJ, Mandrell TD. Evaluation of five agents/methods for anesthesia of neonatal rats. *Lab Anim Sci* 1997;47:386-95.
 88. Greene EC. Digestive tract and associated glands. In: Greene EC: *Anatomy of the rat*. New York: Hafner Publishing Co.,1955. p.90-101.
 89. James J, Bosch KS, Aronson DC, Houtkooper JM. Sirius red histophotometry and spectrophotometry of sections in the assessment of the collagen content of liver tissue and its application in growing rat liver. *Liver* 1990;10:1-5.
 90. Masseroli M, Caballero T, O'Valle F, Del Moral RMG, Pérez-Milena A, Del Moral RG. Automatic quantification of liver fibrosis: design and validation of a new image analysis method: comparison with semi-quantitative indexes of fibrosis. *J Hepatol* 2000;32:453-64.
 91. Ueno Y, Phillips JO, Ludwig J, Lichtman SN, LaRusso NF. Development and characterization of a rodent model of immune-mediated cholangitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:216-20.
 92. Roulot D, Sevcsik AM, Coste T, Strosberg D, Marullo S. Role of transforming growth factor β type II receptor in hepatic fibrosis: studies of human chronic hepatitis C and experimental fibrosis in rats. *Hepatology* 1999;29:1730-8.
 93. Liu Z, Sakamoto T, Ezure T, Yokomuro S, Murase N, Michalopoulos G, Demetris AJ. Interleukin-6, hepatocyte growth factor, and their receptors in biliary epithelial cells during a type I ductular reaction in mice: interactions between the periductal inflammatory and stromal cells and the biliary epithelium. *Hepatology* 1998;28:1260-8.
 94. O'Neil S, Hunt J, Filkins J, Gamelli R. Obstructive jaundice in rats results in exaggerated hepatic production of tumor necrosis factor-alpha and systemic

- and tissue tumor necrosis factor-alpha levels after endotoxin. *Surgery* 1997;122:281-6.
95. Lin M, Rippe RA, Niemela O, Brittenham G, Tsukamoto H. Role of iron in NF-kB activation and cytokine gene expression by rat hepatic macrophages. *Am J Physiol* 1997;272:G1355-64.
96. Thung SN. The development of proliferating ductular structures in liver disease: an immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114:407-11.
97. Carthew P, Edwards RE, Hill RJ, Evans JG. Cytokeratin expression in cells of rodent bile duct developing under normal and pathological conditions. *Br J Exp Path* 1989;70:717-25.
98. Katsuma Y, Swierenga SHH, Khettry U, Marceau N, French SW. Changes in the cytokeratin intermediate filament cytoskeleton associated with mallory body formation in mouse and human liver. *Hepatology* 1987;7:1215-23.
99. Marucci L, Baroni GS, Mancini R, Benedetti A, Jezequel AM, Orlandi F. Cell proliferation following extrahepatic biliary obstruction: evaluation b immunohistochemical methods. *J Hepatol* 1993;17:163-9.
100. Roskams T, De Vos R, Van Eyken P, Myazaki H, Van Damme B, Desmet V. Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man. *J Hepatol* 1998; 29:455-63.
101. Al Adnani MS. Differential immunohistochemical localization of cytokeratins and collagen types I and III in experimentally-induced cirrhosis. *J Pathol* 1989;159:151-8.

102. Nagy P, Kiss A, Schnur J, Thorgeirsson SS. Dexamethasone inhibits the proliferation of hepatocytes and oval cells but not bile duct cells in rat liver. *Hepatology* 1998;28:423-9.
103. Frezza EE, Gerunda GE, Plebani M, Galligioni A, Giacomini A, Neri D, Faccioli AM, Tiribelli C. Effect of ursodeoxycholic acid administration on bile duct proliferation and cholestasis in bile duct ligated rat. *Dig Dis Sci* 1993;38:1291-6.
104. Petersen C, Bruns E, Kuske M, Wussow PV. Treatment of extrahepatic biliary atresia with interferon- α in a murine infectious model. *Pediatr Res* 1997;42:623-8.
105. Abdel-Aziz G, Lebeau G, Roscan PY, Clement B, Rissel M, Dugnier I, Champion JP, Guillouzo A. Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat. *Am J Hepatol* 1990;137:1333-42.
106. Aronson DC, Chamuleau RAFM, Fredericks WM, Gooszen HG, Heijmans HAS, James J. Reversibility of cholestatic changes following experimental common bile duct obstruction: fact or fantasy? *J Hepatol* 1993;18:85-95.
107. Nietgen GW, Vacanti JP, Perez-Atayde AR. Intrahepatic bile duct loss in biliary atresia despite portoenterostomy: a consequence of ongoing obstruction? *Gastroenterology* 1992;102:2126-33.

9

APÊNDICE

CÉLULA ESTRELADA ? célula localizada na região perisinusoidal, no espaço de Disse, no lóbulo hepático. Também conhecida como célula perisinusoidal ou célula de Ito, está envolvida no processo de fibrogênese no fígado.

α -ACTINA DE MÚSCULO LISO ? proteína de músculo liso presente no citoesqueleto.

DESMINA ? proteína de músculo liso presente no filamento intermediário do citoesqueleto.

INTERFACE, ZONA DE ? zona localizada entre o espaço-porta e o lóbulo hepático.

ZONA 1 ? zona mais periférica do lóbulo hepático e mais distal da veia centrolobular. Os hepatócitos da zona 1 estão mais próximos do espaço-porta.