JOSIANE DE OLIVEIRA GONÇALVES

Comparação entre os resultados da expressão gênica da desmina, alfa-actina e TGF-beta1 obtidos a partir dos métodos da reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) semiquantitativa e em tempo real (qRT-PCR) no modelo de ligadura seletiva das vias biliares em animais em crescimento

> Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Aoun Tannuri

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gonçalves, Josiane de Oliveira

Comparação entre os resultados da expressão gênica da desmina, alfa-actina e TGF-beta1 obtidos a partir dos métodos da reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) semiquantitativa e em tempo real (qRT-PCR) no modelo de ligadura seletiva das vias biliares em animais em crescimento / Josiane de Oliveira Gonçalves. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Pediatria.

Orientadora: Ana Cristina Aoun Tannuri.

Descritores: 1.Desmina 2.Actina-alfa 3.Fator de crescimento transformador beta 1 4.Fibrose 5.Células estreladas do fígado 6.Colestase 7.Reação em cadeia da polimerase em tempo real 8.Ductos biliares 9.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-005/14

Este trabalho foi desenvolvido no Setor de Cirurgia Experimental do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP, no Laboratório de Cirurgia Pediátrica da FMUSP (LIM 30) e no Setor de Biologia Tumoral do Serviço de Hematologia do HC-FMUSP.

O projeto foi aprovado na Comissão de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 20/10/2010, sob número 269/10.

Os recursos financeiros da presente linha de pesquisa foram obtidos do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) por meio do projeto número 478407/2008-4.

À minha família por todo amor e apoio incondicional. Hoje apenas sou o que sou, sei o que sei e sonho o que sonho, porque vocês permitiram que isso acontecesse.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ana Cristina Aoun Tannuri, orientadora e amiga, que com grande sabedoria me ajudou a trilhar o caminho do pensamento científico. Pesquisadora brilhante que me contagiou com seu entusiasmo pela ciência e pela vida, e que cujo conhecimento e dedicação estimula todos a sua volta. Dinâmica e exigente soube extrair o meu melhor, sem deixar de ser atenciosa e companheira. Profissional exemplar que com responsabilidade primou pela qualidade deste trabalho. Como orientadora cumpriu com zelo a tarefa de ensinar, e como amiga jamais terei como agradecer todo o apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Uenis Tannuri, Titular da Disciplina de Cirurgia Pediátrica e Transplante Hepático. Notório e renomado Cirurgião que generosamente me recebeu em seu laboratório, e possibilitou a realização deste trabalho. Grande humanista de profissionalismo inspirador tem contribuído grandemente com meu crescimento científico e pessoal. Muito obrigada pela confiança.

À bióloga Maria Cecília de Mendonça Coelho, Pesquisadora Científica do Laboratório de Cirurgia Pediátrica (LIM-30), responsável pela minha vinda a este laboratório. Sua dedicação expressa pelas inúmeras horas aplicadas às análises moleculares tornou possível à execução deste trabalho. Muito obrigada pela confiança, pelos inúmeros ensinamentos, e principalmente por sua valiosa amizade.

Ao Prof. Dr. Israel Bendit, chefe do Laboratório de Biologia Tumoral do Serviço de Hematologia do HC-FMUSP, pelas sugestões construtivas e colaboração do seu laboratório. À Mafalda e Luciana, funcionárias do Laboratório de Biologia Tumoral do Serviço de Hematologia do HC-FMUSP, por partilharem comigo seus conhecimentos e pela gentileza na disponibilização do uso do aparelho de PCR *real time* no início deste projeto.

Aos professores da Banca do Exame de Qualificação: Profa. Dra. Maria Esther Jurfest Rivero Ceccon, Prof. Dr. Luís Marcelo Inaco Cirino e Prof. Dr. Wagner de Castro Andrade, pelas valiosas sugestões que muito contribuíram para a finalização deste trabalho.

Ao biólogo Cleiton Alves do Laboratório de Imunodeficiências (LIM-56), a quem representa grande parte do meu aprendizado acadêmico e desenvolvimento profissional. Foi ele que durante meus primeiros passos em um laboratório de pesquisa, me despertou a curiosidade e o entusiasmo pela ciência, por compartilhar generosamente seus conhecimentos e suas experiências, valorizando meus primeiros experimentos de bancada e possibilitando minha primeira experiência com o método do PCR *real time*. Muito obrigada por me fazer enxergar mais longe, e por ter contribuindo grandemente com meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À Sra. Mônica Alves de Souza, secretária da Comissão de Pós-Graduação do Departamento de Pediatria da FMUSP, que com disposição e simpatia, me ajudou a resolver com eficiência as questões burocráticas.

A bibliotecária Valéria de Vilhena Lombardi, do Serviço de Biblioteca e Documentação da FMUSP, pela atenção na elaboração da ficha catalográfica.

À Dra. Maria Mercês Santos, pela amizade, incentivo e apoio desde o início da minha trajetória no Laboratório de Cirurgia Pediátrica.

Às colegas do Laboratório de Cirurgia Pediátrica (LIM-30) Patrícia Lopes Pereira, por ser sempre prestativa na resolução dos tramites burocráticos, e a Suellen Serafini pelo convívio diário e por todos os momentos de descontração.

À Sra. Denize Costa, secretária da Comissão de Pesquisa e Ética do Departamento de Pediatria da FMUSP, pelo apoio e presteza no encaminhamento do projeto de pesquisa junto a CAPPesq.

Ao Programa de Pediatria do Instituto da Criança do HC-FMUSP, pela oportunidade de realização do mestrado.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	
	LISTA DE GRÁFICOS	
	LISTA DE TABELAS	
	LISTA DE SIGLAS	
	RESUMO	
	SUMMARY	
1.	. INTRODUÇÃO	1
2.	. OBJETIVOS	12
3.	. MÉTODOS	14
	3.1. Aspectos Éticos	15
	3.2. Animal de experimentação	15
	3.3. Método cirúrgico da ligadura seletiva dos ductos biliares	16
	3.4. Obtenção do material	19
	3.5. Extração de RNA	20
	3.6. Síntese de cDNA através da Transcrição Reversa	22
	3.7. Genes de refêrencia (housekeeper genes)	22
	3.8. Escolha dos <i>primers</i>	23
	3.9. PCR semiquantitativa (RT-PCR)	24
	3.10. PCR quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)	26
	3.11. Análise da eficiência da amplificação	32
	3.12. Limites de detecção entre os métodos do RT-PCR e qRT-PCR	37
	3.13. Análise Estatística	38
4.	. RESULTADOS	39
	4.1. Perfil de expressão dos genes responsáveis pela fibrogênese hep	ática
	pelos métodos do RT-PCR (semiquantitativo) e qRT-PCR	40
	4.2. Comparação dos limites de detecção entre as metodologias do RT-	PCR
	semiquantitativo e do qRT-PCR em tempo real	47
5.	. DISCUSSÃO	49
6.	. CONCLUSÕES	62
7.	. ANEXOS	64
8.	. REFERÊNCIAS	71

LISTA DE FIGURAS

- Figura 7. Curva de amplificação de qRT-PCR. O traço horizontal representa o limiar de detecção da fluorescência (*threshold*). A quantidade da fluorescência obtida durante a reação de PCR produz uma curva de

amplificação que na fase exponencial ultrapassa o limiar de detecção Ct, permitindo a quantificação do material genético 30

- Figura 9. Curva de eficiência de amplificação do gene da alfa actina de músculo liso, gerada na padronização da reação do qRT-PCR. A) Curva de amplificação das diluições seriadas de cDNA. B) Gráfico de regressão linear estabelecido pelo software do aparelho de PCR em tempo real. No eixo "x" encontram-se os valores de "Cts" de cada diluição das amostras de cDNA.
- Figura 10. Curva de eficiência de amplificação do gene do TGF-beta 1, gerada na padronização da reação do qRT-PCR. A) Curva de amplificação das diluições seriadas de cDNA. B) Gráfico de regressão linear estabelecido pelo software do aparelho de PCR em tempo real. No eixo "x" encontram-se os valores de "Cts" de cada diluição das amostras de cDNA.
- Figura 11. Curva de eficiência de amplificação do gene da hipoxantinafosforibosil transferase (HPRT), gerada na padronização da reação do qRT-PCR. A) Curva de amplificação das diluições seriadas de cDNA. B) Gráfico de regressão linear estabelecido pelo software do

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Valores de expressão gênica da desmina, 7 dias após a ligadura
seletiva do ducto biliar41
Gráfico 2. Valores de expressão gênica da desmina, 60 dias após a ligadura
seletiva do ducto biliar42
Gráfico 3. Valores de expressão gênica da alfa-actina de músculo liso, 7 dias
após a ligadura seletiva do ducto biliar43
Gráfico 4. Valores de expressão gênica da alfa-actina de músculo liso, 60 dias
após a ligadura seletiva do ducto biliar44
Gráfico 5. Valores de expressão gênica do TGF-β1, 7 dias após a ligadura
seletiva do ducto biliar45
Gráfico 6. Valores de expressão gênica do TGF-β1, 60 dias após a ligadura
seletiva do ducto biliar46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos utilizados na PCR para detecção d	а		
expressão gênica2	4		
Tabela 2: Condições utilizadas para a amplificação dos genes pelo PCR 2	5		
Tabela 3: Condições utilizadas para a amplificação dos genes pelo método do			
qRT-PCR em tempo real2	8		
Tabela 4: Valores obtidos pela curva de eficiência na padronização da	S		
reações de qRT-PCR3	3		

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Analysis of variance
AVB	Atresia das vias biliares
Вр	Base pair
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
	Tecnológico
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Ct	Cycle threshold
DEPC	Dietilpirocarbonato
DL	Ducto ligado
DNL	Ducto não ligado
DNA	Deoxyribonucleic acid
EGF	Epidermal growth factor
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
	Universidade de São Paulo
HPRT	Hipoxantina-fosforibosil transferase
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LIM-30	Laboratório de Investigação Médica – Unidade 30
mRNA	Messenger ribonucleic acid

- NF-kB Nuclear factor kappa B
- Oligo(dt) Oligonucleotídeos de desoxitimidina
- PCR Polymerase chain reaction
- PDGF Platelet-derived growth factor
- qRT-PCR Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction
- RQ Relative quantification
- RT-PCR Reverse transcriptase polymerase chain reaction
- TGF-α Transforming growth factor-alpha
- TGF-β Transforming growth factor -beta
- TNF-α Tumoral necrosis factor- alpha

RESUMO

Gonçalves JO. Comparação entre os resultados da expressão gênica da desmina, alfa-actina e TGF-beta1 obtidos a partir dos métodos da reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) semiquantitativa e em tempo real (qRT-PCR) no modelo de ligadura seletiva das vias biliares em animais em crescimento [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014. 85p.

Os mecanismos responsáveis pela fibrose hepática na infância são pouco conhecidos. Crianças com atresia das vias biliares, guando submetidas a portoenterostomia a Kasai com sucesso, se tornam anictéricas mas mesmo assim desenvolvem cirrose a longo prazo. Da mesma forma, a ocorrência de estenoses biliares segmentares intra-hepáticas no pós-operatório de transplante hepático podem levar ao desenvolvimento de cirrose em todo o órgão. Tais fatos sugerem que mecanismos endócrinos ou parácrinos estejam envolvidos na fibrogênese hepática. Para elucidar este processo o modelo de ligadura seletiva das vias biliares em ratos jovens foi desenvolvido em nosso laboratório. Usando este modelo, identificamos mudanças na expressão do gene da alfa-actina de músculo liso, tanto no parênquima hepático obstruído como no parênquima hepático adjacente à obstrução. No entanto, o perfil de expressão gênica da desmina, uma proteína presente em níveis elevados durante a ativação das células estreladas hepáticas e o TGF-beta1, principal citocina pró-fibrogênica, não demonstraram diferenças significantes quando analisados pelo método do RT-PCR semiguantitativo. Assim, os mecanismos

moleculares envolvidos na modulação da fibrogênese hepática nesse modelo experimental não estão totalmente compreendidos. A metodologia do qRT-PCR (PCR em tempo real), tem sido previamente descrita como um método mais preciso e sensível, possibilitando a detecção do aumento do número de cópias do gene à medida que ocorre a amplificação, enquanto que pelo método do RT-PCR semiguantitativo a análise dos transcritos só é realizada após a etapa da amplificação. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações moleculares no modelo experimental de ligadura seletiva das vias biliares e comparar os resultados obtidos entre os métodos do RT-PCR semiguantitativo e do qRT-PCR em tempo real. Foi realizada a ligadura seletiva do ducto biliar em ratos Wistar com 21 dias de vida, os grupos foram separados de acordo com o momento da morte: 7 ou 60 dias após a cirurgia. A expressão da desmina, alfa actina de músculo liso e TGF-beta1 foi avaliada no tecido do parênquima hepático com obstrução biliar (ducto ligado - DL) e no parênquima hepático adjacente à obstrução biliar (ducto não ligado - DNL) usando o RT-PCR semiquantitativo e o qRT-PCR em tempo real. A metodologia do qRT-PCR em tempo real permitiu identificar mudanças no perfil de expressão gênica que não foram demonstrados pelo método semiquantitativo. O parênguima DL mostrou reação fibrogênica mais intensa, com aumento na expressão da alfa actina de músculo liso e TGF-beta1 após 7 dias. O parênquima DNL apresentou resposta fibrogênica tardia, com aumento da expressão da desmina 7 dias e 60 dias após a cirurgia, além de aumento da alfa-actina de músculo liso 60 dias após a cirurgia. O qRT-PCR em tempo real apresentou maior sensibilidade para identificar mudanças no perfil de expressão gênica em relação ao método convencional do RT-PCR

semiquantitativo. Nossos resultados ajudam a esclarecer a dinâmica das alterações moleculares envolvidas na modulação da fibrogênese hepática no modelo experimental de ligadura seletiva do ducto biliar e pode ser diretamente aplicado para o estudo de estenoses biliares intra-hepáticas e atresia das vias biliares.

Descritores: Desmina; Actina-alfa; Fator de crescimento transformador beta 1; Fibrose; Células estreladas do fígado; Colestase; Reação em cadeia da polimerase em tempo real; Ductos biliares; Ratos Wistar.

SUMMARY

Gonçalves JO. Comparison between the results of gene expression of desmin, alpha-actin and TGF-beta1 obtained from the methods of semiquantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time (qRT-PCR) in a model of selective bile ducts ligation in growing animals [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014. 85p.

The mechanisms responsible for liver fibrosis in childhood are poorly understood. Children suffering from biliary atresia, when submitted to the successful Kasai portoenterostomy, become anicteric, but nonetheless develop cirrhosis in the long term. Similarly, the occurrence of intrahepatic biliary stenosis in the postoperative period of liver transplantation may lead to cirrhosis of the whole organ. Such facts suggest that endocrine or paracrine mechanisms are involved in hepatic fibrogenesis. To elucidate this process, the selective bile duct ligation model in young rats was developed in our laboratory. Using this model, we identified changes in the expression of smooth muscle alpha-actin both in the obstructed parenchyma and the hepatic parenchyma adjacent to the obstruction. However, the expression profiles of desmin, a protein present at high levels during activation of hepatic stellate cells and TGFbeta1, the main pro-fibrogenic cytokine, were unchanged when analyzed with semiquantitative RT-PCR. Thus, the molecular mechanisms involved in the modulation of hepatic fibrogenesis in this experimental model are not fully understood. The methodology of qRT-PCR (real time PCR) has previously been described as a more precise and sensitive method, allowing the detection of increased copy number of the gene while amplification occurs, whereas by semiquantitative RT-PCR, the analysis of transcripts is only perfomed after the amplification step. This study aimed to evaluate the molecular changes in experimental model of selective bile duct ligation and compare the results between semiquantitative RT-PCR and real-time qRT-PCR methods. Selective biliary duct ligation was performed on Wistar rats with 21 days of life, the groups were separated according to the moment of death: 7 or 60 days after surgery. The expression of desmin, alpha-actin smooth muscle and TGF-beta1 was examined in tissue from hepatic parenchyma with biliary obstruction (duct ligation - DL) and in the adjacent hepatic parenchyma (duct non-ligated - DNL) using semiguantitative RT-PCR and real-time qRT-PCR. The methodology of the real-time gRT-PCR allowed to identify changes in gene expression profile that were not shown by semiquantitative method. The DL parenchyma showed a more severe fibrogenic reaction, with increased smooth muscle alpha-actin and TGF-beta1 expression after 7 days. The DNL parenchyma presented a later fibrotic response, with increased desmin expression 7 and 60 days after surgery, besides of increased smooth muscle alpha-actin 60 days after surgery. Real-time gRT-PCR was more sensitive to identify changes in gene expression profile compared to the semiquantitative method. Our results help to clarify the dynamic of molecular changes involved in the modulation of hepatic fibrogenesis in an experimental model of selective bile duct ligation and can be directly applied to the study of intrahepatic biliary stenosis and biliary atresia.

Descriptors: Desmin; Alpha-actin; Transforming growth factor beta 1; Fibrosis; Hepatic stellate cells; Cholestasis; Real-time polymerase chain reaction; Bile ducts; Wistar rats.

1. INTRODUÇÃO

A fibrose representa uma alteração comum nas doenças crônicas do fígado. Caracteriza-se pelo acúmulo de componentes da matriz extracelular e principalmente pelo aumento da síntese de colágeno do tipo I, III e IV em resposta à lesão tecidual. Esse aumento na produção de proteínas da matriz extracelular pode ser iniciado por diferentes fatores: dentre eles destacam-se a obstrução biliar, as exposições a agentes hepatotóxicos, infecções virais e doenças metabólicas.¹ Embora as situações que levam a agressão tecidual e a ativação do processo inflamatório sejam distintas, o processo progressivo da fibrose hepática leva ao comprometimento funcional do órgão, sendo necessário o transplante de fígado para o tratamento definitivo dos pacientes em estágio avançado.²

Os mecanismos responsáveis pela fibrose hepática na infância são pouco conhecidos.³ A atresia das vias biliares (AVB) é uma patologia caracterizada pela obliteração progressiva das vias biliares e subsequente desenvolvimento de cirrose, tornando-se a principal indicação de transplante hepático na faixa etária pediátrica.² Nos casos em que o diagnóstico da atresia de vias biliares é feito precocemente, o fluxo biliar pode ser restabelecido através da portoenterostomia a Kasai. No entanto, mesmo nas crianças que se tornam anictéricas, em longo prazo observa-se a evolução para fibrose comprometendo o órgão inteiro.⁴ Alguns autores vêm tentando compreender estes fatos sugerindo um envolvimento de fatores endócrinos ou parácrinos na modulação da gravidade da doença.⁵⁻⁷

Não há consenso a respeito da regressão da fibrose hepática⁶, embora haja algumas evidências deste processo. Os mecanismos que desencadeiam a produção de colágeno e desarranjo da arquitetura parenquimatosa hepática após o restabelecimento do fluxo biliar nos casos de AVB operados pela técnica de Kasai permanecem desconhecidos.⁷

Desta forma, o transplante hepático tem se tornado, nos dias atuais, o tratamento definitivo para crianças com AVB em estágio avançado.^{8,9} No entanto, embora o transplante hepático seja o tratamento definitivo para grande parte das hepatopatias terminais, ele ainda representa um procedimento complexo, com expressivo número de complicações no período pós-operatório.¹⁰ No transplante hepático pediátrico cerca de 20 a 30% destas complicações envolvem as estenoses biliares que podem ser intra ou extrahepáticas.^{11,12}

As estenoses extra-hepáticas são passíveis de tratamento, ou cirúrgico ou por dilatação percutânea e drenagem guiada por colangiografia transparietohepatica, e se instituído precocemente previne a lesão permanente do fígado.¹³ No entanto, as complicações localizadas na via biliar intra-hepática são frequentemente complexas e o tratamento por dilatação percutânea não apresenta bom prognóstico.¹⁴ Além disso, mesmo quando as estenoses intrahepáticas são segmentares e periféricas, podem evoluir em longo prazo para o desenvolvimento de fibrose nos demais segmentos que apresentam drenagem biliar normal, conduzindo a cirrose hepática com necessidade de retransplante.¹⁰ Não se sabe se a colestase provocada em apenas um segmento hepático pode ser responsável pela produção de fatores que, de forma endócrina ou parácrina, podem agir sob o parênguima hepático adjacente não colestático, levando ao desenvolvimento de fibrose em todo o fígado.¹⁵⁻¹⁷

Em decorrência da colestase, os hepatócitos sofrem peroxidação lipídica liberando espécies reativas de oxigênio (EROs) e iniciam o processo inflamatório com a ativação das células de Kupffer.^{18,19} A apoptose e a necrose dos hepatócitos estimulam a produção de fatores quimiotáticos e de marcadores de moléculas de adesão celular.²⁰ O infiltrado de células mononucleares e polimorfonucleares persistente no parênquima hepático favorece a cronicidade da resposta inflamatória com a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), que promove a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α), fator de crescimento transformante – beta (TGF- β), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), e interleucina 8 (IL-8).^{21,22}

A liberação de citocinas no parênquima hepático promove o desenvolvimento da fibrogênese, com a ativação e transdiferenciação das células hepáticas em miofibroblastos.^{23,24} Os miofibroblastos constituem uma população celular heterogênea, derivada de diferentes tipos celulares como as células estreladas hepáticas e fibroblastos do trato portal, além disso, também se sugere que os miofibroblastos possam se originar a partir da transição epitelial-mesenquimal (EMT) dos colangiócitos, hepatócitos e de células tronco mesenguimais ou fibrócitos circulantes.²⁵⁻³¹

As alterações histológicas observadas na arquitetura do parênquima hepático no início da fibrogênese apresentam infiltrado leucocitário e neutrofílico além da presença de células de Kupffer ao redor do espaço porta.³² Estas células durante a inflamação crônica desencadeiam a ativação

das células estreladas hepáticas (células perisinusoidais ou células de Ito), através da secreção de fatores de crescimento, tais como: fator de crescimento transformante alfa (TGF-alfa), TGF-beta, TNF-alfa, fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).²⁴

A ativação das células estreladas hepáticas provoca a proliferação dessas células, que é marcada pelo aumento na expressão da desmina, uma proteína estrutural dos filamentos intermediários presente no citoesqueleto das células estreladas hepáticas.^{23,32}

Poucos trabalhos na literatura descrevem a atuação dessa proteína na modulação da fibrogênese hepática.³²⁻³⁵ Em estudos experimentais de colestase observa-se que imediatamente após a indução da fibrose hepática as células estreladas apresentam aumento significativo de desmina.³⁵ A evolução do processo fibrogênico é vista após alguns dias com a redução dos níveis de desmina e um rápido aumento na expressão da alfa-actina de músculo liso (Figura 1), caracterizando a diferenciação destas células em miofibroblastos.³⁶ Da mesma forma, os fibroblastos do trato portal sob influência do TGF-β1 sofrem o processo de transdiferenciação para miofibroblastos. ^{37,38} Entretanto, estudos prévios têm demonstrado que embora a população de miofibroblastos seja heterogênea, os fibroblastos não apresentam a presença de desmina em nenhum estágio de diferenciação para miofibroblastos.³⁷

5



Figura 1. Esquema ilustrativo da dinâmica da desmina e alfa-actina de músculo liso na ativação e transdiferenciação das células estreladas durante a evolução do processo de fibrogênese hepática. (Modificado: Golbar e cols., 2011)

A ativação e transdiferenciação das células hepáticas em miofibroblastos é uma resposta de reparo tecidual à lesão hepática.³⁹⁻⁴¹ Ativadas, elas transdiferenciam-se em miofibroblastos, apresentando reação imunoistoquímica positiva para alfa-actina de músculo liso.^{42,43} Esse processo inclui a secreção de fatores vasoativos, aumento da contratilidade e a síntese de proteínas da matriz extracelular, principalmente colágeno do tipo I, III e IV.^{44,45}

O aumento na produção de proteínas da matriz extracelular pelos miofibroblastos decorre da necessidade da reparação tecidual no parênquima hepático.⁴⁶ Os miofibroblastos são células que participam ativamente na

reparação cicatricial, atuando na contração do tecido e fechamento da lesão.⁴⁷ Contudo, a presença do TGF-beta inibe a apoptose dos miofibroblastos conduzindo aos efeitos deletérios do acúmulo de colágeno no parênquima hepático.⁴⁸

A elucidação do papel do TGF-beta tem sido demonstrada em diversas patologias. Esta citocina apresenta uma ampla variedade de efeitos sobre a diferenciação, crescimento e resposta imunológica.⁴⁹ Em doenças colestáticas é visto que níveis elevados de TGF-β1 podem inibir a proliferação das células estreladas, atuando como indutor de apoptose.⁵⁰⁻⁵³ Além disso, a presença contínua de TGF-β1 no parênquima hepático proporciona o aumento na deposição da matriz extracelular pelos miofibroblastos, conduzindo a distorção da arquitetura parenquimatosa. ⁵⁴⁻⁵⁸

Os fenômenos fisiopatológicos envolvidos na evolução da fibrogênese hepática podem ser estudados através de modelos experimentais.⁵⁹ A indução da fibrose hepática pelo modelo cirúrgico da ligadura do ducto biliar comum em ratos adultos tem sido o modelo mais explorado em estudos de doenças colestáticas.^{35,60,61} A simplicidade, reprodutibilidade, facilidade de lesão e alterações histopatológicas similares às observadas em humanos são vantagens consideráveis. No entanto, os resultados obtidos com animais adultos não traduz com fidelidade a resposta fibrogênica observada em organismos jovens.³⁵⁻⁶¹

No laboratório de Cirurgia Pediátrica do HC-FMUSP (LIM-30) e no Setor de Cirurgia Experimental do Instituto da Criança do HC-FMUSP houve sempre o interesse em desenvolver modelos experimentais com animais jovens, com o intuito de investigar as alterações fisiopatológicas observada em doenças da

7

infância.^{35,61-62} Gibelli e cols., comparando as alterações estruturais no modelo de ligadura do ducto biliar comum em ratos jovens e adultos, demonstraram evolução da fibrose mais intensa nos animais jovens, incentivando-nos a desenvolver mais estudos para a compreensão da evolução da doença em animais jovens.³⁵ Andrade e cols., utilizando ratos recém-desmamados, verificaram que a administração de pentoxifilina ou prednisolona reduz a deposição de colágeno durante a colestase induzida pela ligadura do ducto biliar comum.⁶¹

Na sequência destes achados, Tannuri e cols. desenvolveram o modelo de ligadura seletiva do ducto biliar em animais recém-desmamados, visando estudar a ação da colestase sob o parênguima hepático adjacente, cujas vias biliares não apresentavam obstrução. Por meio de análises histológicas e histomorfométricas, os fenômenos de proliferação ductular e acúmulo de colágeno decorrentes da obstrução biliar foram observados não somente nos lobos hepáticos cujas vias biliares foram obstruídas, mas também nos lobos cujas vias biliares permaneceram pérvias.⁶⁴ De forma semelhante, a presença do marcador de miofibroblastos, a alfa-actina de músculo liso, apresentou aumento significativo em ambos os lobos hepáticos pela metodologia do RT-PCR semiguantitativo, confirmando os achados histológicos e consolidando a utilização do modelo experimental. No entanto, os genes da desmina e TGF-β1 que também estão envolvidos na evolução da fibrogênese hepática, principalmente na identificação dos tipos celulares predominantes da população de miofibroblastos, não foram detectados quando avaliados pelo método convencional do RT-PCR semiguantitativo.^{31,36,58}

A metodologia da reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) tem sido bastante útil no sentido de auxiliar a compreensão dos mecanismos de interação gênica e as possíveis funções fisiológicas dos genes em resposta a lesão celular.⁶⁵ O princípio da análise de expressão gênica consiste em realizar o caminho inverso ao da célula, onde, uma vez que a produção de ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) pela célula é necessário para a síntese proteica, extrai-se o mRNA do material biológico de interesse e empregando a enzima transcriptase reversa sintetiza-se *in vitro* uma fita de DNA complementar ao mRNA (cDNA), possibilitando a quantificação deste material genético pela metodologia da PCR.^{66,67}

Na literatura atual é expressivo o número de trabalhos que utilizam a metodologia do RT-PCR para a quantificação de transcritos.⁶⁸⁻⁷⁰ Em particular, a metodologia do qRT-PCR (*quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*) ou RT-PCR em tempo real tem sido de uso cada vez mais corrente.⁶⁹⁻⁷⁰ Uma das principais diferenças entre estas metodologias é que no qRT-PCR é possível detectar o aumento do número de cópias do gene de interesse à medida que ocorre a amplificação, enquanto que na metodologia do RT-PCR semiquantitativo a análise dos transcritos só é realizada após a etapa da amplificação em termociclador, mediante a realização da eletroforese em gel de agarose.^{71,72}

Esta marcante diversidade entre as metodologias tem proporcionado maior confiabilidade no método do PCR em tempo real, não somente pela redução dos riscos de contaminação da amostra, como também pela maior sensibilidade na quantificação dos transcritos.⁷³ Isto decorre do fato de que, na metodologia do PCR em tempo real, a quantificação é feita através da

9

intensidade de fluorescência obtida pela detecção de fluoróforos intercalantes de DNA de dupla fita, enquanto que na metodologia do RT-PCR semiquantitativa a mensuração do material genético é feita empiricamente através da densitometria das bandas.⁷⁴

Neste contexto, a metodologia do qRT-PCR em tempo real tem demonstrado maior sensibilidade na identificação de alterações moleculares em relação à metodologia do RT-PCR semiquantitativo.⁷³ Além disso, o fato de podermos observar a curva de amplificação à medida que a reação acontece nos transmite maior confiabilidade dos resultados, estabelecendo a quantificação do material genético na fase exponencial da reação de acordo com o perfil de amplificação das amostras.⁷⁵

Em síntese, os fenômenos fisiopatológicos que sucedem à colestase são pouco conhecidos. Embora o número de estudos sobre fibrogênese hepática seja abundante, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da fibrose após o reestabelecimento do fluxo biliar nos casos de atresia das vias biliares, e o comprometimento dos segmentos hepáticos que apresentam drenagem biliar normal a partir de um parênquima com colestase, não são compreendidos.⁷⁶ A utilização do modelo experimental de ligadura seletiva das vias biliares no rato recém-desmamado permitiu identificar a presença de miofibroblastos no parênquima não colestático. No entanto, a metodologia do RT-PCR semiquantitativo não permitiu identificar a sequência das alterações moleculares envolvidas na evolução da fibrogênese hepática neste modelo experimental.⁶³ A utilização da metodologia do qRT-PCR em tempo real permitirá investigar a dinâmica das alterações moleculares envolvidas no

desenvolvimento da fibrogênese hepática no modelo de ligadura seletiva do ducto biliar.

2. OBJETIVOS

Os objetivos da presente pesquisa foram:

- Comparar os resultados obtidos pelo método do RT-PCR semiquantitativo e do qRT-PCR em tempo real para o estudo dos genes da desmina, alfa actina de músculo liso e TGF-β1.
- Investigar a dinâmica das alterações moleculares dos genes da desmina, alfa-actina de músculo liso e TGF-β1 após a ligadura seletiva do ducto biliar tanto no parênquima hepático colestático como também no parênquima hepático adjacente à obstrução biliar.

3. MÉTODOS
3.1. Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da FMUSP, em 20 de outubro de 2010, sob o n° 269/10.

3.2. Animal de experimentação

Para este estudo foram utilizados ratos Wistar recém-desmamados (21 dias), de ambos os sexos, com peso entre 30 e 50 gramas. Os animais 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 horas e mantidos em gaiolas com iluminação e temperatura controlada e fornecimento de ração e água *ad libitum*.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados após anestesia de acordo com as Normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.⁷⁸

3.3. Método cirúrgico da ligadura seletiva dos ductos biliares

Todos os animais foram operados pelo mesmo cirurgião. Para a padronização da ligadura biliar seletiva foram operados 13 ratos com 21 dias de vida, com o objetivo de se obter experiência quanto à técnica anestésica e à padronização dos procedimentos cirúrgicos.

Após anestesia com isoflurano em campânula, os animais foram colocados e fixados com esparadrapo micropore nas quatro patas, em prancha adequada. Utilizando-se material de microcirurgia e estereomicroscópio com 20 a 40 aumentos, com técnica não asséptica, o acesso ao fígado foi feito por laparotomia mediana supra-umbilical. O ligamento triangular esquerdo do fígado foi seccionado para melhor exposição da víscera e procedeu-se à ligadura dos ductos biliares responsáveis pela drenagem do lobo hepático médio, esquerdo lateral e caudado, que perfazem aproximadamente 70% da massa do fígado do rato. A ligadura foi realizada com fio de nylon 9.0 seguida da secção do ramo biliar, impedindo assim a recanalização do mesmo (Figura 2). O lobo direito lateral permaneceu com sua drenagem biliar intacta.



Figura 2. Fotografia mostrando as ligaduras e secção dos dois ductos responsáveis pela drenagem biliar dos lobos hepáticos médio, esquerdo lateral e caudado (seta preta). Observar que a drenagem do lobo direito lateral permanece intacta (seta branca)

Com o objetivo de evitar neoformação de canalículos biliares intrahepáticos entre os lobos, foi realizada, adicionalmente, ligadura do parênquima que comunica o lobo direito lateral (ducto não ligado) com o médio (ducto ligado), por meio de clipe metálico do tipo vascular (Figura 3). Tal processo de colateralização já foi descrito⁷⁹ e pode ser responsável pela reversão da colestase do parênquima ligado em poucos dias.



Figura 3. Fotografia mostrando o clipe vascular colocado entre o lobo direito lateral e médio. Notar isolamento total do parênquima do lobo lateral direito em relação ao restante do fígado (seta)

Imediatamente após o procedimento cirúrgico a incisão abdominal foi fechada com sutura contínua, em plano único, utilizando-se fio inabsorvível monofilamentar de polipropileno 6-0, com agulha vascular.

3.4. Obtenção do material

Os ratos submetidos à ligadura seletiva das vias biliares e secção do parênquima foram divididos em grupos, de acordo com o momento da morte: 7 e 60 dias após a cirurgia. Como controle foram utilizados ratos mantidos sobre as mesmas condições ambientais não sendo realizado procedimento cirúrgico.

Grupo 1: Ratos submetidos a ligadura seletiva das vias biliares e sacrificados 7 dias após a ligadura seletiva das vias biliares (n=6).

Grupo 2: Ratos submetidos a ligadura seletiva das vias biliares e sacrificados 60 dias após a ligadura seletiva das vias biliares (n=6).

Grupo 3: Ratos controles com 28 dias de vida (n=6).

Grupo 4: Ratos controles com 81 dias de vida (n=6).

Os ratos foram colocados em campânula de isoflurano até a parada respiratória. Através de incisão mediana tóraco-abdominal foram colhidos separadamente os lobos hepáticos médio e esquerdo lateral (cujos ductos foram ligados- **DL**) e o lobo direito lateral onde a drenagem biliar permaneceu intacta (ducto não ligado - **DNL**).

Imediatamente após a coleta, o material foi colocado em solução de RPMI contendo soro fetal bovino a 10% e enviadas ao laboratório para o congelamento das amostras em nitrogênio liquido à -180°C.

3.5. Extração de RNA

Foi realizada extração do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) dos fragmentos de fígado coletados (DL e DNL). Aproximadamente 100mg de tecido hepático foi fragmentado em pulverizador de tecido (Mikro-Dismembrenator U Sartorius, Alemanha) após adição de nitrogênio líquido. O pulverizado foi homogeneizado em 700µl da solução TRIZOL[®] (INVITROGEN Life Technologies, USA).

A solução obtida foi incubada durante 5 minutos em temperatura ambiente para completa dissociação de nucleoproteínas, e em seguida foram adicionados 200µl de clorofórmio. Esta solução foi centrifugada na velocidade de 10.621 x g durante 15 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação, foi obtida a separação da mistura em 3 fases: uma inferior de coloração avermelhada (fenol-clororórmio), uma interfase (proteínas), e uma superior, incolor e aquosa. Esta última que contém o RNA foi transferida para um tubo limpo em que foi adicionado 500µL de isopropanol gelado. A solução permaneceu em repouso durante 15 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, foi submetida à centrifugação a 10.621 x g por 15 minutos. Nesta etapa o *pellet* de RNA era visível e todo o sobrenadante foi desprezado por imersão. O pellet contendo o RNA foi lavado com 1ml de etanol 75% gelado, e centrifugado a 2.655 x g por 5 minutos. Ao término da centrifugação o sobrenadante foi retirado com cuidado para não aspirar o RNA precipitado no fundo do tubo, o RNA foi ressuspenso em água bidestilada, tratada com 0,01% de Dietilpirocarbonato (DEPC).

A determinação da concentração e da pureza do material foi realizada por espectrofotômetro modelo Biofotômetro (Eppendorf AG, Alemanha). Em uma cubeta de quartzo foram colocados 1µL do RNA em suspensão e 100µL de água com DEPC para a leitura nos comprimentos de onda 260 e 280nm. Foi padronizado para todas as amostras de RNA a concentração final de 10µg/µl. Observou-se também a relação A₂₆₀/A₂₈₀ para a avaliação da pureza do RNA, a qual foi considerada aceitável se estivesse entre 1,8 e 2,1, pois valores neste intervalo indicam ausência de DNA na amostra.

A integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%, através da visualização das bandas ribossomais 18S e 28 S coradas com brometo de etídeo (Figura 4), que foram fotografadas pelo sistema Kodak Gel Logic 100 Imaging System (Kodak, Rochester, NY). Após esses procedimentos, as amostras foram armazenadas em nitrogênio liquido a temperatura de -180°C e, posteriormente, submetidas à transcrição.



Figura 4. Gel de agarose a 1% com amostras de RNA extraído. As subunidades 18S e 28S correspondem ao RNA ribossomal, indicando a integridade da amostra

3.6. Síntese de cDNA através da Transcrição Reversa

Após a extração de RNA, o cDNA foi sintetizado para que a reação em cadeia da polimerase (PCR) semiguantitativa e guantitativa fosse realizada. Dez microgramas de RNA total foram utilizados na síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) através da utilização da enzima Superscript III RnaseH trancriptase reversa (Invitrogen, Carlsbad, CA). Inicialmente, foram adicionados 1µl de RNA total, 100pmoles de oligonucleotídeos de desoxitimidina – (oligo [dT]) que se associa à cauda Poli A, atuando como iniciador para a transcriptase reversa e 5µl de água livre de RNase, com incubação a 72°C por 10 minutos e imediato resfriamento das amostras em gelo. Posteriormente, foram adicionados para cada amostra 4µl de tampão da enzima, 0,1M de dithiotreitol, 500µM de cada um dos deoxinucleotídeos (dNTP) e 200 unidades de SuperScript III. A reação com volume total de 20µL foi processada em termociclador Peltier Thermal Cycler 200 (MJ Research, Minnesota, EUA) por 50 minutos a 42°C, seguida por 10 minutos a 72°C para a inativação da enzima. Após este procedimento as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

3.7. Genes de refêrencia (housekeeper genes)

Os genes referência ou *housekeeping* são genes constitutivos, responsáveis por funções essenciais para a manutenção do funcionamento

23

celular. Deste modo, o gene de referência ideal é aquele que apresenta expressão constante nos diversos estágios de desenvolvimento e condições fisiológicas, não sofrendo alteração por tratamentos ou condições experimentais.

A normalização através do uso de genes referência é um método para o controle interno do erro experimental da RT-PCR, que embora abranjam uma série de cuidados para garantir uma quantidade semelhante entre as amostras, ainda assim, estão sujeitas às variações provenientes de todo o processo, desde o método de extração do RNA até a quantificação dos transcritos pela metodologia do PCR. Desta forma, esta estratégia permite controlar variações nas quantidades iniciais do ácido ribonucleico entre as diferentes amostras.⁷⁵ O gene da ciclofilina que participa do dobramento de proteínas e a hipoxantinaguanina fosforibosil transferase (HPRT), uma enzima que converte a hipoxantina em inosina ou guanina em guanosina, sendo importante na via de rescaldo de purinas, (a hipoxantina é uma purina presente no anticódon do RNA, na forma de iosina), apresentaram níveis de expressão constantes nos diferentes grupos estudados, sendo considerados apropriados para este estudo por apresentar baixa variabilidade de expressão gênica.

3.8. Escolha dos primers

Os *primers* específicos utilizados neste estudo para os genes da desmina, α-actina de músculo liso, TGF-β1 e para os genes de referência interna hipoxantina-fosforibosil transferase e ciclofilina foram desenhados com

base nas sequências de RNA mensageiro disponíveis no banco de dados do *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Os *primers* foram construídos utilizando o programa Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). A sequência dos iniciadores "*primers*" dos genes de estudo bem como dos genes utilizados como calibradores (*housekeepers*) está descrita na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos utilizados na PCR para detecção da expressão gênica.

Gene	"primers"	Sequência	
α-actina	sense	5' GTT TGA GAC CTT CAA TGT CCC 3'	159
	antissense	5' CGA TCT CAC GCT CAG CAG TGA 3'	
	sense	5' ATA CGC CTG AGT GGC TGT CT 3'	
TGF-β1			153
	antissense	5' TGG GAC TGA TCC CAT TGA TT 3'	
	sense	5' CCA ACT GAG AGA AGA AGC AGA G 3'	
Desmina			134
	antissense	5' CTT ATT GGC TGC CTG AGT CAA G 3'	
	sense	5' GGG AAG GTG AAA GAA GGC AT 3'	
Ciclofilina			211
	antissense	5' GAG AGC AGA GAT TAC AGG GT 3'	
	sense	CTC ATG GAC TGA TTA TGG ACA GGA C	
HPRT			123
	antissense	GCA GGT CAG CAA AGA ACT TAT AGC C	
nh: nair hase	<u> </u>		

pb: pair base.

3.9. PCR semiquantitativa (RT-PCR)

A PCR foi realizada em reações com volume de 25µL. Cada reação continha 1µl de cDNA, 7,5pmol de cada um dos *primers*, 200µM de cada um

dos deoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,5µL de tampão da enzima (20mM Tris-HCI pH8.0), 2 unidades da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen). Todas as reações foram realizadas no termociclador (MJ Research, Minnesota, EUA), acompanhadas de um controle de contaminação da reação ausente de material genético. A fim de evitar uma falsa análise, o número de ciclos para cada um dos genes estudados foi estabelecido de modo que a reação terminasse antes de atingir a fase platô.

Para a amplificação dos genes foi realizada uma etapa de denaturação inicial de 94°C por 5 minutos e ao passo final foi realizada uma extensão de 72°C por 10 minutos para todos os genes. As condições da PCR semiquantitativa para cada gene estão representadas na Tabela 2.

Genes	Denaturação	Pareamento	Extensão	n° de ciclos
α-actina	95°C - 1 minuto	61°C - 1 minuto	72°C - 1 minuto	35
TGF-β1	95°C - 1 minuto	60°C -1 minuto	72°C - 1 minuto	33
desmina	95°C - 1 minuto	56°C - 1 minuto	72°C - 1 minuto	32
ciclofilina	95°C - 1 minuto	55°C - 1 minuto	72°C - 1 minuto	30

Tabela 2: Condições utilizadas para a amplificação dos genes pelo PCR.

n° de ciclos: quantidade de ciclos necessários para a detecção do produto da PCR.

Ao final da reação o produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, durante 30 minutos a 110 volts (Figura 5). O gel foi documentado pelo sistema Kodak Gel Logic 100 Imaging System (Kodak, Rochester, NY).



Figura 5. Amplificação do gene da ciclofilina (gel de agarose a 2%) das amostras de cDNA dos animais. As bandas correspondem a um fragmento de 211 pares de base

A magnitude de expressão de cada gene foi avaliada pela densitometria das bandas utilizando o Software Kodak Imaging (Kodak, Rochester, NY). A partir dos resultados fornecidos pelo Software foi realizado o seguinte cálculo:

Gene de estudo

Gene interno

3.10. PCR quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)

O estudo da amplificação dos genes da desmina, α-actina de músculo liso e TGF-β1 também foram realizados pela técnica de qRT-PCR, a fim de confrontar com os resultados obtidos pelo método do RT-PCR semiquantitativo.

Para o monitoramento da qRT-PCR foi necessária a padronização de um gene interno que apresentasse as mesmas condições de ciclagem térmica dos genes de estudo. Inicialmente foram testados os genes ciclofilina e HPRT, constatando-se que o gene HPRT apresentava condições idênticas de amplificação para os genes do estudo.

O volume total da reação de 15µL foi composto de 1µl de cDNA, 7,5pmol de cada iniciador para cada um dos genes estudados e 7,5µl de Platinum[®] SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen Life Technologies, USA) que contem todos os reagentes necessários para a reação além do fluoróforo SYBR Green I. Este corante fluorescente intercala à dupla fita de DNA permitindo a quantificação do material genético amplificado. Através da quantificação da intensidade de fluorescência é possível estabelecer o número de cópias de DNA que é proporcional à intensidade de fluorescência obtida.

Todas as reações foram realizadas em termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Alemanha) acompanhadas de um controle de ausência de contaminação de material genético da reação. Cada amostra foi realizada em triplicata tanto para o gene alvo como para o gene interno.

Para todos os genes a reação da PCR iniciou com denaturação a 95°C por 5 minutos antes do início da ciclagem que consistiu de 40 ciclos. Finalizando o último ciclo, foi realizada uma extensão final a 72°C por 5 minutos antes de iniciar a dissociação do produto amplificado. As condições de ciclagem da reação para cada um dos genes estudados estão representadas na tabela 3.

27

Genes	Denaturação	Pareamento	Extensão
alfa-actina	95°C - 20 segundos	60°C - 30 segundos	72°C - 30 segundos
TGF-β1	95°C - 20 segundos	60°C -30 segundos	72°C - 30 segundos
desmina	95°C - 25 segundos	62°C - 35 segundos	72°C - 30 segundos

Tabela 3: Condições utilizadas para a amplificação dos genes pelo método do qRT-PCR em tempo real.

Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de dissociação ou curva de *melting*. A cinética da curva de *melting* consiste em elevar gradualmente a temperatura (55°C a 95°C). A medida em que o DNA é submetido a uma temperatura elevada ocorre a sua denaturação, com redução repentina da emissão de fluorescência pelo SYBR green. Esse resultado, expresso em graus Celsius, é característico de cada produto de PCR e varia conforme o tamanho e composição química do fragmento amplificado. Esta abordagem permite verificar a especificidade da reação, além de confirmar a ausência de formação de dímeros de *primers* ou qualquer outro produto inespecífico, que poderiam fornecer resultados falsos. A figura 6 exemplifica esta análise de especificidade da amplificação.



Figura 6. Curva de *melting* dos genes da desmina, α-actina, TGF-beta 1 e hipoxantina-fosforibosil transferase (HPRT). A presença de um pico único demonstra a especificidade da reação

A detecção da amplificação das amostras foi realizada no Software Rotor Gene Q – Pure Detection versão 2.0.3 (Qiagen, Alemanha). À medida que inicia a reação do PCR em tempo real o programa de computador gera um gráfico onde é realizada a quantificação da intensidade de fluorescência a cada novo ciclo da reação. Ao final da reação, é estabelecido o limiar de detecção denominado *threshold*. A quantificação do material genético é estabelecida no ponto onde ocorre a intersecção do *threshold* com a curva de amplificação, estes valores são expressos em Ct (*Cycle threshold*) e se referem à quantidade de ciclos necessários para que a amostra atinja o limiar de detecção na fase exponencial da amplificação. Desta forma, quanto maior a quantidade de material genético presente na reação, menor é o número de ciclos necessários para a detecção da intensidade de fluorescência. A figura 7 mostra o monitoramento das curvas de amplificação do qRT-PCR.



Figura 7. Curva de amplificação de qRT-PCR. O traço horizontal representa o limiar de detecção da fluorescência (*threshold*). A quantidade da fluorescência obtida durante a reação de PCR produz uma curva de amplificação que na fase exponencial ultrapassa o limiar de detecção Ct, permitindo a quantificação do material genético

A partir dos valores obtidos de Ct da reação do PCR em tempo real, foram mensurados os níveis de expressão gênica das amostras utilizando o cálculo da quantificação relativa. Este método de análise tem por objetivo comparar as mudanças no perfil de expressão gênica da amostra de estudo em relação a um calibrador (amostra controle). O cálculo da quantificação relativa (RQ - *relative quantification*) foi feito pelo método descrito por Livak e Schmittgen (2001),⁸⁰ que é determinado pela equação RQ=2^{-ΔΔct}. $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}, \text{ onde } \Delta Ct = Ct \text{ alvo - } Ct \text{ endógeno, e } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra - } \Delta Ct$ do calibrador

Para a realização desta fórmula, primeiramente deve ser feita a correção de variação de concentração de cDNA entre as amostras (valor de Δ Ct). Esta correção é realizada subtraindo o valor obtido do Ct alvo (valor de Ct do gene de interesse) com o valor obtido do Ct do gene endógeno. Após a obtenção destes valores foi realizado o cálculo do $\Delta\Delta$ Ct, para isto, os valores obtidos de Δ Ct das amostras foram subtraídos pelo valor de Δ Ct da amostra calibradora. A utilização de uma amostra calibradora é recomendada para descrever quantas vezes o gene de estudo está sendo mais ou menos expresso em relação a este calibrador, recomenda-se como calibradores da reação amostras do tempo zero do estudo ou amostras controles (sem nenhum tratamento).

Neste estudo foi utilizado como amostra calibradora um pool (contendo a mistura de todas as amostras controles), de forma que também comparamos este pool com as amostras individuais dos animais controles, a fim de obter os valores de expressão gênica deste grupo. Após a determinação dos valores de $\Delta\Delta$ Ct, aplicou-se a fórmula da quantificação relativa dada por: 2^{- $\Delta\Delta$ ct}, onde o dois na base da fórmula aritmética representa que a quantidade de material genético da reação é dobrada a cada novo ciclo. No entanto, para assumir que a quantidade de material genético é dobrada a cada novo ciclo da reação, é necessário avaliar a eficiência da reação de PCR para o gene de estudo e o gene endógeno, sendo válido o método da quantificação relativa apenas se a eficiência da reação for aproximadamente iguais entre o gene alvo e o gene endógeno.

3.11. Análise da eficiência da amplificação

A validação do método da quantificação relativa neste estudo foi realizada através da curva padrão. Para isto, utilizou-se um pool de todas as amostras de cDNA do grupo controle (pool de cDNA). Em seguida foram realizadas diluições seriadas deste pool de cDNA (1:10; 1:100; 1:1.000; 1:10.000), a amplificação das amostras foi realizada utilizando os mesmos reagentes descritos anteriormente.

Após a amplificação o software estabeleceu um gráfico de regressão linear formado a partir dos valores do Ct em relação ao número relativo de cópias da diluição seriada. A partir deste gráfico o software do aparelho de PCR em tempo real determinou os valores do coeficiente angular da reta (*slope*) utilizando a fórmula:

E=10^(-1/slope)

Onde o *slope* corresponde à inclinação da reta da curva padrão que deve apresentar valor próximo de -3,3 obtido quando se analisa a variação dos Cts dos genes em função do logaritimo na base 10, das diferentes concentrações de cDNA. Um *slope* de -3,3 indica 100% de eficiência da amplificação do ensaio, o coeficiente de correlação (R²) mensurado pelo mesmo software mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de Ct das amostras, onde o valor 1 indica

um ajuste perfeito entre a regressão linear e os valores individuais de Ct. Foram considerados para este estudo valores de eficiência próximo de 100%, *slope* de -3,3 e valores de " \mathbb{R}^2 " próximo de 1. A tabela 4 mostra os valores de coeficiente de correlação (\mathbb{R}^2), inclinação da reta (*slope* ou M) e eficiência da reação (100% = 1.00) obtidos para os diferentes genes estudados. As figuras 8, 9, 10 e 11 demonstram os pontos das diluições de cDNA e a análise do gráfico obtido por esses pontos fornecido pelo software do aparelho de PCR em tempo real.

Tabela 4: Valores obtidos pela curva de eficiência na padronização das reações de qRT-PCR.

Gene	R ²	Inclinação (<i>slope</i>)	Eficiência
desmina	0,997	3,310	1.00 (100%)
Alfa-actina	0,997	3,36	0,98 (98%)
TGF-beta 1	0,992	3,311	1.00 (100%)
HPRT	0,992	3,315	1.00 (100%)



Figura 8. Curva de eficiência de amplificação do gene da desmina gerada na padronização da reação do qRT-PCR. **A)** Curva de amplificação das diluições seriadas de cDNA. **B)** Gráfico de regressão linear estabelecido pelo software do aparelho de PCR em tempo real. No eixo "x" representa a concentração de cDNA (escala logarítmica) e no eixo "y" encontram-se os valores de "Cts" de cada diluição das amostras de cDNA



Figura 9. Curva de eficiência de amplificação do gene da alfa actina de músculo liso, gerada na padronização da reação do qRT-PCR. A) Curva de amplificação das diluições seriadas de cDNA. B) Gráfico de regressão linear estabelecido pelo software do aparelho de PCR em tempo real. No eixo "x" encontram-se os valores de "Cts" de cada diluição das amostras de cDNA



Figura 10. Curva de eficiência de amplificação do gene do TGF-beta 1, gerada na padronização da reação do qRT-PCR. A) Curva de amplificação das diluições seriadas de cDNA. B) Gráfico de regressão linear estabelecido pelo software do aparelho de PCR em tempo real. No eixo "x" encontram-se os valores de "Cts" de cada diluição das amostras de cDNA



Figura 11. Curva de eficiência de amplificação do gene da hipoxantinafosforibosil transferase (HPRT), gerada na padronização da reação do qRT-PCR. A) Curva de amplificação das diluições seriadas de cDNA. B) Gráfico de regressão linear estabelecido pelo software do aparelho de PCR em tempo real. No eixo "x" encontram-se os valores de "Cts" de cada diluição das amostras de cDNA

3.12. Limites de detecção entre os métodos do RT-PCR e qRT-PCR

Para comparar os limites de detecção entre as metodologias do RT-PCR semiquantitativo e o qRT-PCR em tempo real, foram realizadas diluições seriadas de cDNA para a amplificação do gene da α-actina de músculo liso,

que apresentou diferenças significantes em ambas as metodologias. Um pool de cDNA contendo a mistura de todas as amostras do lobo ligado (DL) foram submetidas a diluições seriadas (1:10; 1:100; 1:1.000; 1:10.000; 1:100.000). Utilizamos um pool de amostras do lobo ligado (DL) devido este grupo ter demonstrado diferenças significantes em ambas as metodologias. Os reagentes utilizados para esta análise foram os mesmos descritos anteriormente de acordo com a metodologia utilizada.

3.13. Análise Estatística

Antes de aplicar-se à análise estatística destinada a possibilitar a interpretação dos dados, verificamos através do teste de Shapiro-Wilk a distribuição dos dados, a fim de avaliar qual teste seria o mais adequado para cada situação.

Os dados que apresentaram distribuição normal (paramétrico) foram submetidos à análise de variância (ANOVA – *one way*) seguido do teste de Tukey. Assumindo a distribuição assimétrica os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. A hipótese de igualdade foi rejeitada para p≤0,05. Todos os cálculos foram realizados pelo programa SPSS versão 18.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Perfil de expressão dos genes responsáveis pela fibrogênese hepática pelos métodos do RT-PCR (semiquantitativo) e qRT-PCR

Os perfis de expressão dos genes responsáveis pelo processo da fibrogênese hepática foram comparados pelos métodos de RT-PCR (semiquantitativo) e do qRT-PCR (quantitativo), após 7 e 60 dias da ligadura seletiva do ducto biliar.

Para melhor compreensão, os resultados numéricos referentes às expressões dos genes estudados serão apresentados sob a forma de gráficos. Os valores individuais das análises da expressão gênica obtidos através das duas metodologias descritas constam em ANEXOS.

Nos gráficos referentes ao RT-PCR semiquantitativo, são mostradas as medianas e percentis das densidades relativas ds bandas dos genes amplificados. Nos gráficos referentes ao qRT-PCR, expõem-se as medianas e percentis da quantificação da expressão gênica obtida a partir do produto 2-ΔΔct.

Nos gráficos 1 e 2 são apresentados os níveis de expressão gênica pelos métodos semiquantitativo e quantitativo do gene da desmina nos animais controles, em DL (parênquima com ducto biliar ligado) e DNL (parênquima com ducto não ligado), 7 e 60 dias após o procedimento cirúrgico.

40









Observando o perfil de expressão gênica da desmina entre as diferentes metodologias, podemos observar diferenças entre os métodos. Pela metodologia do RT-PCR semiquantitativo os grupos não apresentaram diferenças de expressão gênica. Ao contrário, a metodologia do qRT-PCR exibiu alterações significantes não demonstradas pelo método convencional.

A partir da metodologia do qRT-PCR em tempo real pudemos observar aumento significativo do gene da desmina no parênquima hepático onde a drenagem biliar permaneceu intacta (DNL) 7 e 60 dias após a ligadura seletiva do ducto biliar. Nos gráficos 3 e 4 são apresentados os níveis de expressão gênica pelos métodos semiquantitativo e quantitativo do gene da alfa-actina de músculo liso nos animais controles, em DL e DNL, após 7 e 60 dias da ligadura seletiva do ducto biliar.

Gráfico 3. Valores de expressão gênica da alfa-actina de músculo liso, 7 dias após a ligadura seletiva do ducto biliar.





Gráfico 4. Valores de expressão gênica da alfa-actina de músculo liso, 60 dias após a ligadura seletiva do ducto biliar.

Os resultados observados em ambas as metodologias demonstraram aumento significativo na expressão do gene da alfa-actina de músculo liso no lobo hepático submetido à ligadura do ducto biliar (DL) após 7 dias do procedimento cirúrgico quando comparado com as amostras do grupo controle ($p\leq0,05$). Contudo, 60 dias após a ligadura seletiva do ducto biliar pudemos observar que em ambas as metodologias os níveis de expressão gênica da alfa-actina de músculo liso esteve aumentado tanto em DL quanto em DNL em relação ao grupo controle ($p\leq0,05$). Nos gráficos 5 e 6 são apresentados os níveis de expressão gênica pelos métodos semiquantitativo e quantitativo do gene do TGF- β 1 nos animais controles, em DL e DNL, após 7 e 60 dias da ligadura seletiva do ducto biliar.

Gráfico 5. Valores de expressão gênica do TGF-β1, 7 dias após a ligadura seletiva do ducto biliar.







A análise do perfil de expressão gênica do TGF- β 1 pelas diferentes metodologias mostrou resultados heterogêneos. Pela metodologia do RT-PCR semiquantitativo após 7 dias do procedimento cirúrgico não houve diferença estatisticamente significante (p=0,09). No entanto, considerando a metodologia do qRT-PCR em tempo real, mais sensível, pudemos observar que após 7 dias as amostras do lobo hepático submetido a ligadura do ducto biliar (DL) apresentaram aumento significativo de expressão gênica do TGF- β 1 em relação ao grupo controle (p=0,015). Após 60 dias da ligadura seletiva do ducto biliar, os valores de expressão do gene TGF-β1 não exibiram diferenças significativas pelas metodologias utilizadas.

4.2. Comparação dos limites de detecção entre as metodologias do RT-PCR semiguantitativo e do gRT-PCR em tempo real

A capacidade em detectar pequenas quantidades de material genético pelos métodos do RT-PCR semiquantitativo e do qRT-PCR em tempo real foram comparadas através de diluições seriadas de cDNA (Figura 12). Comparando os limites de detecção entre ambos os métodos foi possível visualizar que a metodologia do RT-PCR semiquantitativo apresentou menor sensibilidade na detecção de pequenas quantidades de material genético (12C) em comparação com o método do qRT-PCR em tempo real. (12A). Através de diluições seriadas de cDNA o método semiquantitativo identificou apenas diluições com maior concentração de cDNA (diluição de 1:10 até 1:1.000), enquanto que a metodologia do qRT-PCR em tempo real permitiu visualizar a amplificação de amostras mais diluídas (diluição de 1:10 até 1:100.000) demonstrando ainda uma alta especificidade do método mesmo em amostras com baixas concentrações de material genético, como pode ser observada através de um pico único da curva de *melting* (12B).



Figura 12. Comparação do limite de detecção dos métodos de RT-PCR semiquantitativo e qRT-PCR em tempo real para o gene da alfa actina de músculo liso. **A)** Curva de amplificação gerada pelo software do aparelho do qRT-PCR em tempo real, (eixo y) quantidade de fluorescência do SYBR Green I, (eixo x) quantidade de ciclos. Detecção das diluições das amostras de cDNA (10⁵; 10⁴; 10³; 10²; 10¹). **B)** Curva de melting mostrando a especificidade do ensaio em amostras com pouca quantidade de material genético. **C)** Amostras amplificadas pelo método do RT-PCR semiquantitativo, analisadas pela visualização da densidade da banda de DNA (gel de agarose 2%). Note que somente as diluições mais concentradas foram detectadas (10⁵; 10⁴; 10³). **D)** Representação gráfica da eficiência de detecção das amostras diluídas pelos métodos do qRT-PCR em tempo real e do RT-PCR semiquantitativo

5. DISCUSSÃO

Dentre os métodos laboratoriais utilizados para avaliar processos fisiológicos envolvidos pós-intervenção em modelos experimentais, as técnicas de reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa têm sido bastante úteis no sentido de auxiliar a compreensão dos mecanismos de interação gênica e as possíveis funções fisiológicas dos genes em resposta a lesão celular.⁶⁵ A técnica convencional do RT-PCR semiquantitativo permite a quantificação dos níveis de expressão gênica de forma empírica, onde a mensuração dos resultados é realizada através da densidade da banda de DNA ao final da reação de PCR.⁸¹

O advento da metodologia do qRT-PCR em tempo real tem possibilitado a quantificação dos níveis de expressão gênica de forma mais acurada, utilizando fluoróforos que se intercalam ao DNA à medida que o material genético é amplificado.^{82,83} Desta forma, a cada novo ciclo da reação de PCR em tempo real é realizada a leitura da intensidade de fluorescência, e ao final da reação da PCR é projetada a curva de amplificação das amostras, elucidando o perfil da amplificação de cada amostra nas fases: inicial (*background*), exponencial, linear e platô.^{84,85} A delimitação das distintas fases pela curva de amplificação do PCR em tempo real, permite que o material genético seja quantificado na fase exponencial da reação, determinando o nível de expressão gênica de cada amostra.⁸²

Esta marcante diversidade em mensurar os níveis de expressão gênica entre as diferentes metodologias da PCR pode conduzir estudos a resultados conflitantes, o que motivou a proposta inicial deste estudo de comparar os
resultados obtidos entre os métodos do RT-PCR semiquantitativo e do qRT-PCR em tempo real.

No presente estudo, a comparação dos resultados obtidos entre as diferentes metodologias de análise de expressão gênica apresentaram resultados heterogêneos. Uma das possíveis explicações para este achado seria o fato do método do qRT-PCR em tempo real permitir o monitoramento da amplificação da reação, possibilitando identificar a quantidade de material genético ainda na fase exponencial do ensaio, enquanto que os resultados obtidos pelo método do RT-PCR semiquantitativo são mensurados somente ao final da amplificação do material genético, o que limita a identificação da fase exponencial de cada uma das amostras.^{73,74,84}

Essas discrepâncias entre resultados das diferentes metodologias de PCR têm sido extensivamente demonstradas em estudos envolvendo a quantificação de microrganismos,⁸⁵⁻⁹² em particular trabalhos envolvendo a identificação e quantificação viral onde há grande necessidade de métodos mais sensíveis para a detecção do agente patogênico na fase precoce da infecção.⁸⁷⁻⁹²

Diferentemente, Souza e cols., ao comparar a capacidade dos métodos do RT-PCR semiquantitativo e do qRT-PCR em tempo real na detecção do gene MYCN em neuroblastoma encontraram resultados semelhantes entre as diferentes metodologias, demonstrando que o método convencional por ser de custo mais acessível pode ser utilizado para o exame prognóstico desta neoplasia. Por outro lado, os autores sugerem que a detecção por ambas as metodologias só foi possível devido às amostras utilizadas pertencerem a pacientes em estádios avançados da doença, o que de fato caracteriza a maior

51

quantidade de material genético mutado devido à progressão das células tumorais.⁶⁸

Em nosso estudo, a utilização das diferentes metodologias de análise de expressão gênica permitiu elucidar a dinâmica das alterações decorrentes da obstrução seletiva do ducto biliar. O modelo experimental utilizado na presente pesquisa foi proposto por Tannuri e cols., em nosso laboratório a fim de elucidar os mecanismos envolvidos no processo da fibrogênese hepática nos casos de atresia das vias biliares e estenoses segmentares. Por meio do método do RT-PCR semiguantitativo pôde-se observar um aumento da expressão do gene da alfa actina de músculo liso tanto no parênquima hepático com obstrução do fluxo biliar como no parênquima hepático adjacente à obstrução, elucidando a atuação de mecanismos endócrinos ou parácrinos na modulação da doença.⁶⁴ De fato, a atuação de mecanismos endócrinos ou parácrinos na evolução do processo fibrogênico nos casos de colestase segmentar tem sido sugerida por diversos autores.¹⁵⁻¹⁷ No entanto, modelos experimentais que reproduzissem a ativação e o estabelecimento da fibrose no parênguima hepático cujas vias biliares permanecem pérvias ainda não haviam sido explorados em animais jovens.

Outros estudos, referentes ao modelo de obstrução biliar seletiva em ratos, têm sido utilizados em animais adultos.^{79,93} Quaresma e cols., estudaram as alterações histológicas e bioquímicas decorrentes da obstrução biliar do ducto hepático direito em ratos adultos, no entanto, nenhum sinal de colestase pôde ser identificado, devido à comunicação entre o parênquima hepático colestático e o parênquima hepático adjacente à obstrução biliar.⁹³ De fato, a reversibilidade da fibrose hepática decorrente da colestase segmentar já havia

sido elucidada previamente por Ni e cols., que demonstraram que a recuperação do processo obstrutivo do parênquima hepático cuja via biliar foi obstruída é reestabelecida a partir da formação de ductos biliares colaterais.⁷⁹

Em nosso laboratório, o modelo da ligadura seletiva em ratos jovens possibilitou a reprodutibilidade dos achados histopatológicos observado nos casos de colestase, permitindo o estudo *in vivo* da dinâmica das alterações moleculares envolvidas na evolução da fibrogênese hepática decorrente da colestase segmentar.⁶⁴

A elucidação das alterações decorrentes da colestase tem sido classicamente estudada pelo modelo experimental de ligadura do ducto biliar comum.⁹⁴⁻⁹⁶ A fisiopatologia da fibrogênese hepática envolve uma complexa relação entre infiltrado inflamatório, produção de espécies reativas de oxigênio, ativação e liberação de citocinas pró-inflamatórias que culminam na ativação e transdiferenciação das células hepáticas em miofibroblastos.⁹⁷ Vários trabalhos que utilizam o modelo clássico de ligadura do ducto biliar comum descrevem a presença de miofibroblastos poucos dias após o procedimento cirúrgico.^{77,35,61}

Em nosso modelo, pôde-se observar, pela metodologia do qRT-PCR em tempo real, níveis de expressão gênica da desmina mais elevados no parênquima hepático onde a drenagem biliar permaneceu intacta (DNL), enquanto que o parênquima hepático colestático não apresentou diferenças significativas. Este dado corrobora com a hipótese de que o desenvolvimento da fibrose nos casos de AVB e estenoses intra-hepáticas ocorra a partir de mecanismos endócrinos ou parácrinos.¹⁵⁻¹⁷

A desmina é uma proteína estrutural dos filamentos intermediários presente no citoesqueleto da célula estreladas,³⁴ no entanto, em estado

53

quiescente as células estreladas hepáticas apresentam níveis baixos desta proteína que dificilmente são detectáveis. Ao serem ativadas por citocinas próinflamatórias e fatores de crescimento tais como: TGF-beta, TGF-alfa, TNF-alfa e IL-6, as células estreladas hepáticas passam a se proliferar apresentando níveis elevados de desmina.³²

O processo de transdiferenciação das células estreladas em miofibroblastos é observado na fase inicial da fibrogênese hepática. Durante esse processo, há a presença de níveis elevados de desmina, devido ao aumento da população de células estreladas hepáticas.³² Poucos estudos demonstram a atuação da desmina no processo de fibrogênese hepática, provavelmente pelo fato dos níveis da desmina só serem observados na fase precoce da fibrogênese hepática.³²⁻³⁶ Esta hipótese pode ser confirmada em nosso modelo animal, onde o parênquima hepático cuja via biliar foi obstruída não apresentou diferenças significativas dos níveis de desmina. A presença de valores semelhantes aos níveis basais de desmina no parênquima hepático colestático pode ser justificada pela evolução da fibrogênese ter sido mais intensa, levando a redução dos níveis de desmina pela diferenciação do fenótipo celular em miofibroblastos.

Por ser provavelmente menos intenso porém contínuo o estímulo fibrogênico no parênquima com drenagem biliar intacta (DNL), os níveis de desmina se mantiveram elevados. Provavelmente em DNL as células estreladas continuam lentamente se multiplicando, enquanto que em DL o estímulo fibrogênico mais intenso deve provocar uma intensa proliferação inicial das células estreladas, e 7 dias após a ligadura biliar seletiva essa população celular já se encontra diferenciada em miofibroblastos.

Esta hipótese pode ser consolidada ao observarmos os níveis de expressão gênica da alfa-actina de músculo liso. Através das duas metodologias foi possível observar que o parênquima hepático com obstrução do fluxo biliar apresentou resposta fibrogênica mais intensa com aumento na expressão do gene da alfa-actina de músculo liso sete dias após o procedimento da ligadura seletiva, enquanto que no parênquima hepático cujas vias biliares permaneceram pérvias, os níveis de alfa-actina só foram diferentemente expressos após sessenta dias da cirurgia, demonstrado resposta fibrogênica mais tardia.

A alfa-actina de músculo liso é expressa pelos miofibroblastos, que constituem uma população heterogênea de células altamente pró-fibrogênica, que sustentam a progressão da fibrose com a deposição de colágeno, e consequente alteração da arquitetura parenquimatosa.^{8,20,21} Estudos com diferentes modelos experimentais de fibrose hepática descrevem a presença deste marcador de miofibroblastos poucos dias após a indução de fibrose. Porém, é evidente que o estabelecimento da doença é variável de acordo com o estímulo fibrogênico. Em estudos utilizando o modelo clássico de ligadura do ducto biliar comum é observada evolução rápida de fibrose, sendo identificados níveis elevados de alfa-actina de músculo liso poucos dias após a indução da fibrose.

No presente estudo, o modelo de ligadura seletiva do ducto biliar demonstrou desenvolvimento progressivo de fibrose, e semelhante ao modelo clássico de ligadura do ducto biliar comum, a presença da alfa actina de músculo liso no parênquima com obstrução do fluxo biliar após a primeira semana da cirurgia, evidenciou a resposta fibrogênica mais intensa neste parênguima.

Esta afirmação pode ser pode ser demonstrada pelo perfil de expressão gênica do TGF-β1. Através dos resultados obtidos pela metodologia do qRT-PCR em tempo real, foi possível identificar níveis elevados de expressão gênica do TGF-β1 no parênquima hepático colestático após sete dias da ligadura seletiva do ducto biliar.

O TGF-beta1 é a principal citocina envolvida na evolução da fibrose hepática, sendo expresso no fígado pelas células de Kupffer, miofibroblastos, e fibroblastos portais. Esta citocina está relacionada com a diferenciação celular, e principalmente na estimulação da síntese de componentes da matriz extracelular, como colágenos dos tipos I, III e IV, fibronectina e laminina.⁵⁴⁻⁵⁸ Além disso, alguns trabalhos têm demonstrado que níveis elevados de TGF-β1 podem inibir a proliferação das células estreladas hepáticas, atuando como indutor de apoptose.⁵⁰⁻⁵³

Estudos experimentais sobre fibrose têm demonstrado a atuação do TGF-beta1 na fase precoce da fibrogênese induzindo a transdiferenciação do fenótipo celular de fibroblastos para miofibroblastos.⁹⁸ No entanto, a real via que leva à ativação do processo de diferenciação celular na fibrogênese hepática ainda é bastante controversa.⁹⁹ Alguns autores acreditam que a ênfase dada às células estreladas hepáticas na produção de proteínas de matriz extracelular nos últimos anos tem sido demasiadamente exagerada, sugerindo a atuação dos fibroblastos do trato portal nos estágios iniciais do desenvolvimento da fibrogênese hepática.¹⁰⁰⁻¹⁰² De fato, o desenvolvimento da fibrose não ocorre por uma via única de ativação, mas sim pela interação de diversos mecanismos complexos que interagem entre si conduzindo à desestruturação da arquitetura parenquimatosa.²³⁻²⁴ Guyot e cols., sugerem que o predomínio de diferentes tipos celulares na evolução da fibrogênese hepática decorre do tipo de modelo experimental utilizado.²⁹

A colestase decorrente da obstrução da via biliar intra-hepática não é um fenômeno isolado na medicina,¹⁰³⁻¹⁰⁵ o que justifica a utilização do modelo experimental de ligadura seletiva do ducto biliar para melhor compreender os mecanismos de ativação da fibrose nos casos de obstrução biliar observados na infância. A diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos é observada pela presença de níveis elevados de TGF-beta1, que induz a diferenciação destas células.⁵⁷⁻⁵⁸

De fato, em nosso modelo experimental os níveis de TGF-β1 apresentaram níveis elevados somente no parênquima hepático colestático concomitantemente com a presença da alfa-actina de músculo liso, enquanto que no parênquima hepático adjacente à obstrução biliar não houve aumento desta citocina. A presença da alfa-actina de músculo liso após sete dias da ligadura seletiva no parênquima hepático colestático permitiu que pudéssemos inferir que a resposta fibrogênica neste parênquima seja mais intensa em relação ao parênquima hepático adjacente, que demostrou níveis elevados de alfa actina somente após sessenta dias da cirurgia. Portanto, nossos resultados reforçam a hipótese do importante papel das células estreladas hepáticas durante o estágio inicial da fibrogênese.²⁶

A expressão gênica aumentada do TGF-beta1 no parênquima hepático colestático na fase precoce da fibrogênese hepática sugere uma resposta à ativação dos fibroblastos portais, já que esta citocina também induz a diferenciação do fenótipo celular de fibroblastos em miofibroblastos.^{39,56} Entretanto, a tendência a persistência da expressão do TGF-beta1 no parênquima hepático colestático, em uma fase mais tardia e a presença da alfa-actina de músculo liso isolada no parênguima adjacente à obstrução sugere que esta citocina esteja intimamente relacionada à deposição de colágeno pelos miofibroblastos, uma vez que o parênguima hepático adjacente apresentou resposta fibrogênica mais tardia. Diversos autores têm demonstrado que o TGF-beta1 atua na inibição da proliferação de células estreladas hepáticas.^{50,52} Nossas observações sobre o parênquima hepático adjacente à obstrução corroboram com esta hipótese, em que não foi possível identificarmos a presença da desmina juntamente com a do TGF-beta1, o que de fato esclarece este mecanismo.

As alterações moleculares decorrentes da obstrução seletiva do ducto biliar não puderam ser totalmente esclarecidas pela metodologia do RT-PCR semiquantitativo. Comparando os resultados obtidos entre as diferentes metodologias do qRT-PCR em tempo real e do RT-PCR semiquantitativo pudemos identificar que o perfil de expressão gênica da alfa-actina de músculo liso foram semelhantes em ambos os métodos. Pelo contrário, ao compararmos os resultados de expressão gênica do TGF-β1 pelas diferentes metodologias, pudemos observar que o método semiquantitativo demonstrou tendência ao aumento no parênquima hepático colestático com valor de p=0,09. Este aumento no nível de expressão gênica do TGF-β1 pôde ser

elucidada de forma objetiva pela metodologia do qRT-PCR em tempo real que demonstrou valor de significância estatística mais expressiva (p=0,015).

Como já dito anteriormente, a desmina é uma proteína de fase aguda, presente em níveis elevados durante a ativação e proliferação das células estreladas hepáticas.³² Em nosso estudo, procuramos identificar o processo da fibrogênese em sua fase inicial, no entanto, a metodologia convencional do RT-PCR semiquantitativo não identificou diferenças significantes da desmina entre os diferentes grupos. Por outro lado, a metodologia do qRT-PCR em tempo real possibilitou identificarmos alterações nos níveis de expressão gênica da desmina no parênquima hepático onde a drenagem biliar permaneceu normal.

Essas discrepâncias entre os resultados obtidos pelas diferentes metodologias podem ser explicadas pelo fato de que o método do PCR em tempo real apresenta maior sensibilidade na detecção de pequenas alterações de material genético.⁶⁶ Dagher e cols., avaliando o limite de detecção de DNA pelos métodos do RT-PCR semiquantitativo e qRT-PCR em tempo real demonstraram que a metodologia do qRT-PCR em tempo real apresenta sensibilidade dez vezes maior que o método semiquantitativo, permitindo a identificação de pequenas concentrações de material genético.¹⁰⁶

Para efeito de comparação da efetividade dos métodos, realizamos diluições seriadas de cDNA e comparamos qualitativamente a capacidade das diferentes metodologias em identificar pequenas quantidades de material genético representada através destas diluições. Através desta análise, pudemos identificar que o método do RT-PCR semiquantitativo apresenta maior dificuldade em identificar pequenas quantidades de material genético,

demonstrada pela identificação da banda do produto amplificado das amostras mais concentradas com diluições de cDNA de 1:10 e 1:100. Diferentemente, a metodologia do qRT-PCR em tempo real apresentou níveis de detecção melhores, permitindo identificar a amplificação das amostras com menores quantidades de material genético com diluições até 1:100.000, além de apresentar alta especificidade da amplificação representada pela formação de um pico único na curva de *melting*.

É oportuno mencionar que a efetividade de identificar pequenas variações de expressão gênica pelo método do qRT-PCR em tempo real também pôde ser observada pelos valores da escala gráfica dos resultados obtidos pelas diferentes metodologias. Através da representação dos valores da expressão gênica da alfa-actina de músculo liso, observamos que os resultados obtidos nos grupos que apresentaram diferenças significativas pelo qRT-PCR em tempo real apresentam valores mais elevados e facilmente distintos, enquanto que os dados obtidos pelo método do RT-PCR semiquantitativo apresentaram na escala representada no gráfico valores menores e relativamente próximos, embora tenham apresentado diferenças significativas semelhantes ao método do PCR em tempo real. No entanto, os genes da desmina e TGF-beta 1 não demonstraram diferenças significantes entre os grupos quando avaliados pelo método do RT-PCR semiquantitativo, mas ao serem analisados pela metodologia do qRT-PCR em tempo real, apresentaram diferenças significativas, porém apresentaram valores na escala gráfica aproximados.

Diante do exposto, pudemos demonstrar que o método do qRT-PCR em tempo real apresenta maior sensibilidade na detecção de pequenas

60

quantidades de material genético, além de permitir distinguir pequenas variações nos níveis de expressão gênica, como foi demonstrado pelos resultados obtidos pelo qRT-PCR em tempo real na análise dos genes da desmina e do TGF-beta1.

No presente estudo, os resultados obtidos entre as diferentes metodologias de análise de expressão gênica, permitiram elucidar a dinâmica das alterações dos genes da desmina, alfa-actina de músculo liso e TGF-beta1 na evolução da fibrogênese hepática no modelo experimental de ligadura seletiva do ducto biliar. A constatação de que a metodologia do qRT-PCR em tempo real é mais sensível que o RT-PCR semiquantitativo representa considerável interesse na pesquisa clínica e experimental, uma vez que estas metodologias são de uso corriqueiro e podem conduzir a resultados conflitantes.

Finalmente, a presença de níveis elevados de expressão do gene da desmina no parênquima hepático adjacente à obstrução biliar, permitiu elucidar o aumento da população das células estreladas hepáticas em resposta ao estímulo fibrogênico, sugerindo que este tipo celular exerça um importante papel no desenvolvimento da fibrose nos casos de colestase segmentares. O conhecimento dos mecanismos de transição do fenótipo celular para miofibroblastos poderá permitir delimitar potenciais fármacos a fim de inibir a evolução da fibrogênese nos casos de colestase segmentares. A inibição da proliferação das células estreladas hepáticas poderá reduzir a evolução da fibrogênese nos casos de colestase segmentares. A inibição da proliferação das células estreladas hepáticas poderá reduzir a evolução da fibrogênese hepática no modelo experimental estudado. Esta é a próxima pesquisa, que já está em curso no Laboratório de Cirurgia Pediátrica da FMUSP (LIM-30), dando sequência à presente investigação.

6. CONCLUSÕES

Nas condições da presente pesquisa, pôde-se concluir que:

- A metodologia da qRT-PCR demonstrou maior sensibilidade em comparação com o método do RT-PCR semiquantitativo no estudo da expressão dos genes da desmina, alfa actina de músculo liso e TGF-beta1.
- 2. Através da metodologia do qRT-PCR em tempo real foi possível elucidar a dinâmica das alterações dos genes da desmina, alfaactina de músculo liso e TGF-beta 1 na evolução da fibrogênese hepática tanto no parênquima hepático colestático como também no parênquima hepático adjacente à obstrução biliar.

7. ANEXOS

Controle	DL	DNL
0,83	0,86	0,77
0,77	0,76	0,98
0,85	0,84	0,75
0,71	0,63	0,77
0,90	0,82	0,67
0,75	0,87	0,85

Anexo A. Valores individuais da densidade relativa das bandas obtidas pelo método semiquantitativo do RT-PCR para o gene da desmina, nos grupos controle, DL e DNL 7 dias após a ligadura seletiva dos ductos biliares.

Anexo B. Resultados obtidos pelo método do qRT-PCR em tempo real expressando os valores médios individuais da quantificação relativa do gene da desmina, nos grupos controle, DL e DNL 7 dias após a ligadura seletiva dos ductos biliares.

Controle	DL	DNL
0,744313	1,604603	2,136143
0,834425	1,236288	3,746191
0,436856	1,455363	1,214661
0,787176	1,137002	2,497621
0,523012	1,183831	2,913810
0,670749	1,110098	1,828983

Controle	DL	DNL
0,78	0,71	0,94
0,79	0,98	0,96
0,77	0,63	0,84
0,85	0,74	0,57
0,80	0,92	0,74
0,77	0,78	0,86

Anexo C. Valores individuais da densidade relativa das bandas obtidas pelo método semiquantitativo do RT-PCR para o gene da desmina, nos grupos controle, DL e DNL 60 dias após a ligadura seletiva dos ductos biliares.

Anexo D. Resultados obtidos pelo método do qRT-PCR em tempo real expressando os valores médios individuais da quantificação relativa do gene da desmina, nos grupos controle, DL e DNL 60 dias após a ligadura seletiva dos ductos biliares.

Controle	DL	DNL
0,404106	0,855600	1,274836
0,227085	0,909078	1,481141
0,570382	0,726986	0,952638
0,447610	1,132334	1,218417
0,344999	1,129103	1,343604
0,488570	0,812729	1,129824

Controle	DL	DNL
0,87	0,98	0,90
0,88	0,98	0,88
0,81	1,28	0,86
0,90	0,88	0,95
0,75	1,04	0,86
0,81	1,22	0,95

Anexo E. Valores individuais da densidade relativa das bandas obtidas pelo método semiquantitativo do RT-PCR para o gene da alfa-actina, nos grupos controle, DL e DNL 7 dias após a ligadura seletiva dos ductos biliares.

Anexo F. Resultados obtidos pelo método do qRT-PCR em tempo real expressando os valores médios individuais da quantificação relativa do gene da alfa-actina, nos grupos controle, DL e DNL 7 dias após a ligadura seletiva dos ductos biliares.

Controle	DL	DNL
2,138841	8,643991	2,181028
1,625871	8,168097	3,216160
1,875426	9,849155	4,818026
0,716978	8,111676	5,032611
1,329579	7,210003	4,610370
1,864938	9,415310	2,804206

Controle	DL	DNL
0,86	1,07	0,89
0,88	1,10	1,09
0,85	1,00	1,10
0,87	1,05	1,18
0,86	1,15	0,89
0,88	1,07	1,10

Anexo G. Valores individuais da densidade relativa das bandas obtidas pelo método semiquantitativo do RT-PCR para o gene da alfa-actina, nos grupos controle, DL e DNL 60 dias após a ligadura seletiva dos ductos biliares.

Anexo H. Resultados obtidos pelo método do qRT-PCR em tempo real expressando os valores médios individuais da quantificação relativa do gene da alfa-actina, nos grupos controle, DL e DNL 60 dias após a ligadura seletiva dos ductos biliares.

Controle	DL	DNL
2,799242	10,629486	10,196485
1,795426	10,928322	7,061623
2,887859	10,911845	8,754349
1,627068	10,729760	10,852835
1,731606	10,731031	8,190108
2,743384	10,751290	10,376063

DNL
1,03
0,79
1,24
1,11
0,72
0,85

Anexo I. Valores individuais da densidade relativa das bandas obtidas pelo método semiquantitativo do RT-PCR para o gene do TGF-beta 1, nos grupos controle, DL e DNL 7 dias após a ligadura seletiva dos ductos biliares.

Anexo J. Resultados obtidos pelo método do qRT-PCR em tempo real expressando os valores médios individuais da quantificação relativa do gene do TGF-beta 1, nos grupos controle, DL e DNL 7 dias após a ligadura seletiva dos ductos biliares.

Controle	DL	DNL
0,995374	1,404580	1,514475
0,755241	1,153249	0,994262
0,578344	1,497759	1,235485
0,924524	1,425282	1,205141
0,696289	1,734103	1,344387
0,948146	1,575382	1,646701

Controle	DL	DNL
0,90	0,95	0,74
0,85	0,96	0,99
0,86	0,95	0,76
0,89	0,71	1,20
0,90	0,96	0,89
0,87	0,75	0,85

Anexo K. Valores individuais da densidade relativa das bandas obtidas pelo método semiquantitativo do RT-PCR para o gene do TGF-beta 1, nos grupos controle, DL e DNL 60 dias após a ligadura seletiva dos ductos biliares.

Anexo L. Resultados obtidos pelo método do qRT-PCR em tempo real expressando os valores médios individuais da quantificação relativa do gene do TGF-beta 1, nos grupos controle, DL e DNL 60 dias após a ligadura seletiva dos ductos biliares.

Controle	DL	DNL
0,674800	0,895746	0,772949
0,609290	0,929987	0,810021
0,494831	0,895940	0,742262
0,764439	0,933809	0,976038
0,620401	0,732043	0,832260
0,564775	0,815351	0,894671

8. REFERÊNCIAS

 Silva MM. Atresia das Vias Biliares e outras colestases do período neonatal. In: Tannuri U. Doenças cirúrgicas da criança e do adolescente. Barueri, Manole, 2010. p 330-40.

2. Santos JL, Carvalho E, Bezerra JA. Advances in biliary atresia: from patient care to research. *Braz J Med Biol Res.* 2010; 43(6):522-7.

3. Wong KKY, Chung PHY, Chan IHY, Lan LCL, Tam PKH. Performing Kasai Portoenterostomy Beyond 60 Days of Life Is Not Necessarily Associated With a Worse Outcome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;51(5):631-4.

4. Otte JB, Degoyet JD, Reding R, Hausleithner V, Sokal E, Chardot C, Debande B. Sequential treatment of biliary atresia with Kasai portoenterostomy and liver-transplantation: a review. *Hepatology*. 1994;20(1):S41-S8.

5. Wildhaber BE, Coran AG, Drongowski RA, Hirschl RB, Geiger JD, Lelli JL, Teitelbaum DH. The Kasai portoenterostomy for biliary atresia: A review of a 27-year experience with 81 patients. *J Pediatr Surg.* 2003;38(10):1480-5.

6. Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis - Fact or fantasy? *Hepatology*. 2006; 43(2):S82-S8.

7. Kalayoglu M, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Eckhoff DE, Pirsch JD, Judd R, Sollinger HW, Hoffmann RM, Belzer FO. Long-term results of liver transplantation for biliary atresia. *Surgery*. 1993;114(4):711-8.

8. Petersen C. Pathogenesis and treatment opportunities for biliary atresia. *Clin Liver Dis.* 2006;10(1):73-88.

9. Tannuri U, Tannuri AC, Gibelli NE, Santos MM, Ayoub AA, Maksoud-Filho JG, Velhote MC, Pinho-Apezzato ML, Silva MM, Andrade WC, Moreira AM, Miyatani HT, Guimarães RR. Transplante de fígado na criança. In: Tannuri
U. *Doenças cirúrgicas da criança e do adolescente.* Barueri: Manole, 2010. p.
362-73.

10. Ben Qian Y, Liu CL, Lo CM, Fan ST. Risk factors for biliary complications after liver transplantation. *Arch Surg.* 2004;139(10):1101-5.

11. Yuan D, Wei YG, Lin HM, Li FQ, Yang M, Liu XL, Li B, Yan LN, Zeng Y, Wen TF, Zhao JC, Yang JY. Risk factors of biliary complications following liver transplantation: retrospective analysis of a single centre. *Postgrad Med J*. 2009;85(1001):119-23.

12. Akamatsu N, Sugawara Y, Hashimoto D. Biliary reconstruction, its complications and management of biliary complications after adult liver transplantation: a systematic review of the incidence, risk factors and outcome. *Transpl Int.* 2011;24(4):379-92.

13. Moreira AM, Carnevale FC, Tannuri U, Suzuki L, Gibelli N, Maksoud JG, Cerri GG. Long-Term Results of Percutaneous Bilioenteric Anastomotic Stricture Treatment in Liver-Transplanted Children. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2010;33(1):90-6.

14. Neuhaus P, Pascher A. Technical problems: biliary. In: Busuttil RW, Klintmalm GK. *Transplantation of the liver.* 2nd Ed. Elsevier Saunders, 2005. p 929-52.

15. Marzioni M, Glaser S, Francis H, Marucci L, Benedetti A, Alvaro D, Taffetani S, Ueno Y, Roskams T, Phinizy JL, Venter J, Fava G, Lesage GD, Alpini G. Autocrine/paracrine regulation of the growth of the biliary tree by the neuroendocrine hormone serotonin. *Gastroenterology*. 2005;128(1):121-37.

16. Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Ueno Y, Meininger CJ, Franchitto A, Onori P, Marzioni M, Taffetani S, Fava G, Stoica G, Venter J, Reichenbach R, De Morrow S, Summers R, Alpini G. Vascular endothelial growth factor stimulates rat cholangiocyte proliferation via an autocrine mechanism. *Gastroenterology*. 2006;130(4):1270-82.

17. Glaser S, De Morrow S, Francis H, Ueno Y, Gaudio E, Vaculin S, Venter J, Franchitto A, Onori P, Vaculin B, Marzioni M, Wise C, Pilanthananond M, Savage J, Pierce L, Mancinelli R, Alpini G. Progesterone stimulates the proliferation of female and male cholangiocytes via autocrine/paracrine mechanisms. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* 2008;295(1):G124-G36.

18. Lamireau T, Zoltowska M, Levy E, Yousef I, Rosenbaum J, Tuchweber B, Desmoulière A. Effects of bile acids on biliary epithelial cells: Proliferation, cytotoxicity, and cytokine secretion. *Life Sci.* 2003;72(12):1401-11.

Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis.
 J Hepatol. 2001;35(2):297-306.

20. Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, Kaufmann SH, Gores GJ. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest.* 1999;103(1):137-45.

21. Wang TL, Zhang X, Li JJ. The role of NF-kappa B in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol.* 2002;2(11):1509-20.

22. Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Sola S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CM. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappa B in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(9):1708-17.

23. Burt AD. Cellular and molecular aspects of hepatic-fibrosis. *J Pathol.* 1993;170(2):105-14.

24. Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. Semin Liver Dis. 1999;19(2):129-40.

25. Wells RG. Cellular Sources of Extracellular Matrix in Hepatic Fibrosis. *Clin Liver Dis.* 2008;12(4):759-68.

26. Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes - the principal collagen-producing cells of normal rat-liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(24):8681-5.

27. Beaussier M, Wendum D, Schiffer E, Dumont S, Rey C, Lienhart A, Housset C. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries. *Lab Invest.* 2007;87(3):292-303.

28. Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Rugge M, Wright NA, Alison MR. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterol.* 2004;126(4):955-63.

29. Guyot C, Lepreux S, Combe C, Doudnikoff E, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Desmoulière A. Hepatic fibrosis and cirrhosis: The (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(2):135-51.

30. Novo E, di Bonzo LV, Cannito S, Colombatto S, Parola M. Hepatic myofibroblasts: A heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(11):2089-93.

31. Li Y, Wang J, Asahina K. Mesothelial cells give rise to hepatic stellate cells and myofibroblasts via mesothelial-mesenchymal transition in liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(6):2324-9.

32. Ballardini G, Fallani M, Biagini G, Bianchi FB, Pisi E. Desmin and actin in the identification of Ito cells and in monitoring their evolution to myofibroblasts in experimental liver fibrosis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1988;56(1): 45-9.

33. Ballardini G, Groff P, Degiorgi LB, Schuppan D, Bianchi FB. Ito cell heterogeneity - desmin-negative Ito cells in normal rat-liver. *Hepatology*. 1994;19(2):440-6.

34. Takase S, Leo MA, Nouchi T, Lieber CS. Desmin distinguishes cultured fat-storing cells from myofibroblasts, smooth-muscle cells and fibroblasts in the rat. *J Hepatol.* 1988;6(3):267-76.

35. Gibelli NEM, Tannuri U, de Mello ES. Immunohistochemical studies of stellate cells in experimental cholestasis in newborn and adult rats. *Clinics*. 2008;63(5):689-94.

36. Golbar HM, Izawa T, Yano R, Ichikawa C, Sawamoto O, Kuwamura M, Lamarre J, Yamate J. Immunohistochemical Characterization of Macrophages and Myofibroblasts in alpha-Naphthylisothiocyanate (ANIT)-Induced Bile Duct Injury and Subsequent Fibrogenesis in Rats. *Toxicol Pathol.* 2011;39(5):795-808.

37. Li Z, Dranoff JA, Chan EP, Uemura M, Sevigny J, Wells RG. Transforming growth factor-beta and substrate stiffness regulate portal fibroblast activation in culture. *Hepatology*. 2007;46(4):1246-56.

38. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growthfactor-beta-1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulationtissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993;122(1):103-11. 39. Gabbiani G, Ryan GB, Majno G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*. 1971;27(5):549.

40. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(5):349-63.

41. Desmouliere A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: Role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest.* 2003;83(12):1689-707.

42. Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound-healing. *Lab Invest*. 1990;63(1):21-9.

43. Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C. Alphasmooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2003;14(6):2508-19.

44. Eyden B. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med.* 2008;12(1):22-37.

45. Welch MP, Odland GF, Clark RAF. Temporal relationships of f-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol*. 1990;110(1):133-45.

46. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 2007;127(3):526-37.

47. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, De Wever O, Mareel M, Gabbiani G. Recent Developments in Myofibroblast

Biology Paradigms for Connective Tissue Remodeling. *Am J Pathol.* 2012;180(4):1340-55.

48. Zhang HY, Phan SH. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta 1. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;21(6):658-65.

49. Inoue Y, Imamura T. Regulation of TGF-beta family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Sci.* 2008;99(11):2107-12.

50. Schrum LW, Bird MA, Salcher O, Burchardt ER, Grisham JW, Brenner DA, Rippe RA, Behrns KE. Autocrine expression of activated transforming growth factor-beta(1) induces apoptosis in normal rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;280(1):G139-48.

51. Benedetti A, Disario A, Baroni GS, Jezequel AM. Transforming growth factor beta-1 increases the number of apoptotic bodies and decreases intracellular ph in isolated periportal and perivenular rat hepatocytes. *Hepatology*. 1995;22(5):1488-98.

52. Chen RH, Chang TY. Involvement of caspase family proteases in transforming growth factor-beta-induced apoptosis. *Cell Growth Differ*. 1997;8(7):821-7.

53. Gressner AM, Polzar B, Lahme B, Mannherz HG. Induction of rat liver parenchymal cell apoptosis by hepatic myofibroblasts via transforming growth factor beta. *Hepatology*. 1996;23(3):571-81.

54. Inagaki Y, Mamura M, Kanamaru Y, Greenwel P, Nemoto T, Takehara K, Ten Dijke P, Nakao A. Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells. *J Cell Physiol*. 2001;187(1):117-23. 55. Kanzler S, Baumann M, Schirmacher P, Dries V, Bayer E, Gerken G, Dienes HP, Lohse AW. Prediction of progressive liver fibrosis in hepatitis C infection by serum and tissue levels of transforming growth factor-beta. *J Viral Hepat.* 2001;8(6):430-7.

56. Lijnen P, Petrov V. Transforming growth factor-beta 1 induced collagen production in cultures of cardiac fibroblasts is the result of the appearance of myofibroblasts. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2002;24(6):333-44.

57. Nakatsukasa H, Nagy P, Evarts RP, Hsia CC, Marsden E, Thorgeirsson SS. Cellular-distribution of transforming growth factor-beta-1 and procollagen type I, type-III, type IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat-liver fibrosis. *J Clin Invest.* 1990;85(6):1833-43.

58. Casini A, Pinzani M, Milani S, Grappone C, Galli G, Jezequel AM, Schuppan D, Rotella CM, Surrenti C. Regulation of extracellular-matrix synthesis by transforming growth factor beta 1 in human fat-storing cells. *Gastroenterol.* 1993;105(1):245-53.

59. Mederacke I. Liver fibrosis - mouse models and relevance in human liver diseases. *Z Gastroenterol*. 2013;51(1):55-62.

60. Johnstone JMS, Lee EG. A quantitative assessment of structural changes in rats liver following obstruction of common bile duct. *Br J Exp Pathol*. 1976;57(1):85-94.

61. Andrade WD, da Silva LFF, Coelho MCD, Tannuri ACA, Alves VAF, Tannuri U. Effects of the administration of pentoxifylline and prednisolone on the evolution of portal fibrogenesis secondary to biliary obstruction in growing animals: immunohistochemical analysis of the expression of TGF-beta; and VEGF. *Clinics*. 2012;67(12):1455-61. 62. Coelho MCM, Tannuri U, Tannuri ACA, Mello ES, dos Santos NASR. Expression of interleukin 6 and apoptosis-related genes in suckling and weaning rat models of hepatectomy and liver regeneration. *J Pediatr Surg.* 2007;42(4):613-9.

63. Tannuri ACA, Tannuri U, Wakamatsu A, Mello ES, Coelho MCM, Dos Santos NASR. Effect of the immunosuppressants on hepatocyte proliferation and apoptosis in a young animal model of liver regeneration: An immunohistochemical study using tissue microarrays. *Pediatr Transplant.* 2008;12(1):40-6.

64. Tannuri ACA, Coelho MCM, Goncalves JdO, Santos MM, Ferraz da Silva LF, Bendit I, Tannuri U. Effects of selective bile duct ligation on liver parenchyma in young animals: histologic and molecular evaluations. *J Pediatr Surg.* 2012;47(3):513-22.

65. Bachman J. Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol.* 2013;530(1):67-74.

66. Shiao YH. A new reverse transcription-polymerase chain reaction method for accurate quantification. *BMC Biotechnol*. 2003;3-22.

67. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1559-82.

68. Souza ACMF, Souza DRV, Sanabani SS, Giorgi RR, Bendit I. The performance of semi-quantitative differential PCR is similar to that of real-time PCR for the detection of the MYCN gene in neuroblastomas. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42(9):791-5.

69. Sari S, Hashemi M, Mahdian R, Parivar K, Rezayat M. The effect of pentoxifylline on bcl-2 gene expression changes in hippocampus after

ischemia-reperfusion in wistar rats by a quantitative RT-PCR method. *Iran J Pharm Res.* 2013;12(3):495-501.

70. Wisnieski F, Calcagno DQ, Leal MF, Dos Santos LC, Gigek CO, Chen ES, Pontes TB, Assumpção PP, de Assumpção MB, Demachki S, Burbano RR, Smith MA. Reference genes for quantitative RT-PCR data in gastric tissues and cell lines. *World J Gastroenterol.* 2013;19(41)7121-8.

71. Lie YS, Petropoulos CJ. Advances in quantitative PCR technology: 5 ' nuclease assays. *Curr Opin Biotechnol*. 1998;9(1):43-8.

72. Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M. Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med.* 1998;36(5):255-69.

73. Klatte M, Bauer P. Accurate Real-time Reverse Transcription Quantitative PCR. *Methods Mol Biol.* 2009;479:61-77.

74. Souazé F, NtodouThome A, Tran CY, Rostene W, Forgez P. Quantitative RT-PCR: Limits and accuracy. *Biotechniques.* 1996;21(2):280-5.

75. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*. 2005;6(4):279-84.

76. 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(2):527-35.

77. Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, Clavien PA. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg.* 2008;95(5):646-56.

78. COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal); Comissão de Ética no uso de animais (CEUA). Disponível em: http://www.cobea.org.br 79. Ni YC, Lukito G, Marchal G, Cresens E, Yu J, Petré C, Baert AL, Fevery J. Potential role of bile-duct collaterals in the recovery of the biliary obstruction - experimental-study in rats using microcholangiography, histology, serology and magnetic-resonance-imaging. *Hepatology*. 1994;20(6):1557-66.

80. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta ct}$ method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.

81. Wood GS, Uluer AZ. Polymerase chain reaction/denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE): Sensitivity, band pattern analysis, and methodologic optimization. *Am J Dermatopathol.* 1999;21(6):547-51.

82. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific dna-sequences. *Biotechnology*. 1992;10(4):413-7.

83. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 1997;22(1):130-8.

84. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: realtime monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 1993;11(9):1026-30.

85. Ishiguro T, Saitoh J, Yawata H, Yamagishi H, Iwasaki S, Mitoma Y. Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater. *Anal Biochem.* 1995;229(2):207-13.

86. Paugam A, L'Ollivier C, Viguie C, Anaya L, de Ponfilly GG, Ranque S. Comparison of real-time PCR with conventional methods to detect dermatophytes in samples from patients with suspected dermatophytosis. *J Microbiol Methods*. 2013;95(2):218-22.

87. Sonawane GG, Tripathi BN. Comparison of a quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) with conventional PCR, bacterial culture and ELISA for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in sheep showing pathology of Johne's disease. *Springerplus*. 2013;2(1):45-7.

88. Micalessi MI, Boulet GA, Pillet S, Jacquet J, Pozzetto B, Bogers JJ, Bourlet T. Comparison of SPF10 real-time PCR and conventional PCR in combination with the INNO-LiPA HPV genotyping extra assay for the detection and typing of human papillomavirus in cervical samples. *J Virol Methods*. 2013; 194(1): 113-7.

89. Podgorska K, Kamieniecka K, Stadejek T, Pejsak Z. Comparison of PCR methods for detection of classical swine fever virus and other pestiviruses. *Pol J Vet Sci.* 2012;15(4):615-20.

90. Stellrecht A, Espino AA, Nattanmai SM, Jackson WF, Conti DJ. Comparison of three real-time PCR for the quantification of polyomavirus BK. *J Clin Virol.* 2013;56(4):354-9.

91. Paudel D, Jarman R, Limkittikul K, Klungthong C, Chamnanchanunt S, Nisalak A, Gibbons R, Chokejindachai W. Comparison of real-time SYBR green dengue assay with real-time taqman RT-PCR dengue assay and the conventional nested PCR for diagnosis of primary and secondary dengue infection. *N Am J Med Sci.* 2011; 3(10): 478-85.

92. Zhang N, Liu Z, Han Q, Qiu J, Chen J, Zhang G, Li Z, Lou S, Li N. Development of one-step SYBR Green real-time RT-PCR for quantifying bovine viral diarrhea virus type-1 and its comparison with conventional RT-PCR. *Virol J.* 2011; 8(1):374-375.

93. Quaresma AB, d'Acampora AJ, Tramonte R, de Farias DC, Joly FS. Histological study of the liver and biochemistry of the blood of Wistar rats following ligature of right hepatic duct. *Acta Cir Bras.* 2007;22(1):68-78.

94. Zhang SH, Wen KM, Wu W, Li WY, Zhao JN. Efficacy of HGF carried by ultrasound microbubble-cationic nano-liposomes complex for treating hepatic fibrosis in a bile duct ligation rat model, and its relationship with the diffusion-weighted MRI parameters. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2013;3(13):S2210-7401.

95. Schierwagen R, Leeming DJ, Klein S, Granzow M, Nielsen MJ, Sauerbruch T, Krag A, Karsdal MA, Trebicka J. Serum markers of the extracellular matrix remodeling reflect antifibrotic therapy in bile-duct ligated rats. *Front Physiol.* 2013; 4(1): 195-196.

96. Lim JH, Kim TW, Song IB, Park SJ, Kim MS, Cho ES, Jung JY, Son HY, Kim JW, Yun HI. Protective effect of the roots extract of Platycodon grandiflorum on bile duct ligatin-induced hepatic fibrosis in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2013; 1(1):1-9.

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

98. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J*. 2004;18(7):816-27.

99. Iwaisako K, Brenner DA, Kisseleva T. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27:65-8.

100. 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 Pathol.* 1991; 164(2):167-74.

101. Bhunchet E, Wake K. Role of mesenchymal cell-populations in porcine serum induced rat-liver fibrosis. *Hepatology*. 1992;16(6):1452-72.

102. Miyazaki H, Van Eyken P, Roskams T, De Vos R, Desmet VJ. Transient expression of tenascin in experimentally induced cholestatic fibrosis in rat liver: an immunohistochemical study. *J Hepatol.* 1993; 19(3):353-66.

103. Gotthardt D, Chahoud F, Sauer P. Primary Sclerosing Cholangitis: Diagnostic and Therapeutic Problems. *Digest Dis*. 2011; 29 (1):41-5.

104. Ungureanu FD, Loachimescu M, Ungurianu L, Pricop M, Mircea G, Gragoescu D, Moldovan AC. Choledochal cyst as a complex malformation of the intra and extrahepatic bile ducts. *Chirurgia*. 2005;100(1):63-8.

105. Alvarez F. Portal vein complications after pediatric liver transplantation. *Curr Gastroenterol Rep.* 2012; 14(3):270-4.

106. Dagher H, Donninger H, Hutchinson P, Ghildyal R, Bardin P. Rhinovirus detection: comparison of real-time and conventional PCR. *J Virol Methods*. 2004;117(2):113-21.