ANDRÉ LUIZ VEIGA CONRADO

**Histopatologia do desenvolvimento do modelo
de cirrose hepática em ratas pela tioacetamida**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier
Hernandez-Blazquez

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Conrado, André Luiz Veiga

Histopatologia do desenvolvimento do modelo de cirrose hepática em ratas pela tioacetamida / André Luiz Veiga Conrado. -- São Paulo, 2013.

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

Orientador: Francisco Javier Hernandez Blazquez.

Descritores: 1.Cirrose hepática/fisiopatologia 2.Tioacetamida/toxicidade
3.Ratos Wistar 4.Ativação de macrófagos 5.Inflamação 6.Modelos animais
7.Fígado

USP/FM/DBD-426/13

“Ora et labora et legere.”
(em latim: Reze, trabalhe e leia).
Lema Beneditino

Agradecimentos

À Adonai nosso Pai Celestial, ao Rosa de Saron, seu Filho e ao Paráclito enviado a nós. A Trina unidade presente em nossa vida! Shalom!

Aos meus pais Lucia Aparecida Veiga Conrado e Silvio Conrado e aos meus irmãos, os doutores Ana Paula Conrado Dulz e Marco Aurélio Veiga Conrado que estão comigo nesta caminhada. Mais um degrau alcançado!

Ao meu orientador, Professor Doutor Francisco Javier Hernandez-Blazquez, que me aceitou como orientado.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Experimental, Tânia Regina de Souza, que sempre nos atendeu prontamente e me contemplou com a Bolsa CAPES departamental.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - que concedeu a bolsa de estudos.

Aos meus amigos da pós-graduação Juliana Shimara Pires Ferrão, Fernanda Cardoso, Renata Gabriel Fontenele, Wesley Antunes Meireles, Camila Ercolini Barroso, Graziela Menck, Lilian Namazu, Fernanda Bastianello, Simone Moraes Palmeira,

Cristiane Cagnoni de Lima, Carlos Eduardo Malavasi Bruno, Thierry Salmon, Juliana Catoia e João Leonardo Mendonça.

Ao amigo Diogo Nader Palermo, técnico do Laboratório de Anatomia Microscópica e Imunohistoquímica – LAMIH do Departamento de Cirurgia/FMVZ/USP e Joana Mona Pinto, doutoranda do ICB/USP.

À minha namorada, a médica veterinária Priscilla Jerez Moreira, que entrou na minha vida no momento de maior desafio e me deu ânimo e coragem pra seguir em frente...

Kyrie Eleison

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1) INTRODUÇÃO.....	1
2) REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1) O FÍGADO.....	4
2.2) MODELO DE INDUÇÃO DE CIRROSE COM TAA.....	6
2.3) MORFOLOGIA DA HEPATITE AGUDA E CRÔNICA.....	7
2.4) NECROSE.....	9
2.5) APOPTOSE.....	11
2.6) INTERAÇÕES CELULARES NA FIBROSE HEPÁTICA.....	12
3) OBJETIVOS.....	18
3.1) OBJETIVO GERAL.....	19
3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4) MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1) ANIMAIS.....	21
4.2) MODELO DE INDUÇÃO DA FIBROSE HEPÁTICA PELA ADMINISTRAÇÃO DA TAA.....	22
4.3) EUTANÁSIA.....	22
4.4) MORFOMETRIA E HISTOLOGIA DO FÍGADO.....	22
4.5) COLORAÇÕES PARA MICROSCOPIA DE LUZ.....	23

4.6) AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	24
4.7) QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO.....	24
4.8)IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	25
4.9) ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
5) RESULTADOS	28
5.1) ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS.....	29
5.2) ÍNDICES MORFOMÉTRICOS MACROSCÓPICOS.....	29
5.3) AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	30
5.4) VOLUME OCUPADO PELO COLÁGENO.....	36
5.5) DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO, HEPATÓCITOS EM APOPTOSE E CÉLULAS MCP-1 POSITIVAS.....	38
6) DISCUSSÃO.....	44
7) CONCLUSÕES.....	50
8) REFERÊNCIAS.....	52

Lista de siglas e abreviaturas

CCl_4 - tetracloreto de carbono

DAB – 3,3 diaminobenzidina tetraidrocloro

DAC – DNase ativada por caspase

DMN - dimetilnitrosamina

DNA - ácido desoxirribonucleico

g/cm^3 – grama por centímetro cúbico

HE – hematoxilina e eosina

HSC (hepatic stellate cell) - célula hepática estrelada

IFC – índice fígado/carcaça (%)

IHS – índice hepatossomático (%)

IVP – índice vísceras/peso (%)

MCP-1 - proteína quimiotática de monócitos do tipo 1

mg/kg – miligrama por quilograma de peso vivo

ME – macrófago exsudativo

MT – macrófago tecidual

PGE2 – prostaglandina E2

TAA – tioacetamida

TNF alfa - fator de necrose tumoral alfa

VHT – veia hepática terminal

Lista de figuras

- Figura 1 - Organização histológica do fígado. A, lóbulo portal com destaque para os colangiólos e canálculos biliares entre os hepatócitos. B, lóbulo hepático; com ênfase no hepatócito. C, ácino hepático e suas divisões em zonas.....6
- Figura 2 - A via extrínseca da apoptose é ativada pela ligação de células do sistema imunológico ao receptor CD95 e a via intrínseca é ativada por sinais externos e lesões internas como, por exemplo, lesão ao DNA nuclear. Ambas as vias convergem para a ativação da caspase 3 (adaptado de Hengartner, 2000).....13
- Figura 3 - A fagocitose de corpúsculos apoptóticos por MT e HSC desencadeia a resposta inflamatória e retroestimula a apoptose de hepatócitos, além de aumentar a síntese de colágeno tipo I (adaptado de Guicciardi; Gores, 2010).....14
- Figura 4 – Representação esquemática do modelo proposto aliando a apoptose de hepatócitos à inflamação e à fibrose. Estímulos proapoptóticos induzem a apoptose dos hepatócitos, que secretam sinais lipídicos para “captura” por HSCs e MTs. A fagocitose de corpúsculos apoptóticos estimula as expressão de genes prófibróticos e ligantes de morte (como o CD95L). A persistente ativação destas células promove a apoptose adicional de hepatócitos, a qual culmina na inflamação hepática, com geração de quimiocinas (como a MCP-1) e ativação das HSCs. A ativação das HSCs torna-as relativamente resistentes aos estímulos apoptóticos, perpetuando o acúmulo de fibras colágenas (adaptado de Canbay et al., 2004).....15
- Figura 5 - Delineamento experimental do tratamento com TAA. As cruzes representam a semana em que cada grupo controle e tratado sofreu eutanásia. No eixo dos grupos: C - grupo de ratas controle; T- grupo de ratas tratadas. São Paulo, 2013.....21

Figura 6 - Fotomicrografias de cortes de fígado de ratas coradas com HE. Em **A**, nota-se a presença de células em apoptose (setas espessas) e infiltrado inflamatório (seta fina) ao redor das VHT. Em **B**, nota-se a hepatite de interface ao redor dos espaços porta, com hepatócitos apresentando o citoplasma rendilhado (seta grossa) em contraste aos hepatócitos hígidos da zona 2 acinar (cabeça de seta). Em **C**, nota-se a presença de macrófagos próximos à VHT com acúmulo de lipofuscina (cabeça de seta) e hepatócitos necróticos (seta grossa). Em **D**, observa-se a hepatite de interface (seta grossa), a formação de novos ductos biliares (seta fina) e hepatócitos binucleados em zona 2 acinar (cabeça de seta). **A e B**, ratas tratadas com TAA por uma semana; **C e D**, ratas tratadas com TAA por sete semanas. Barra – 50 µm. São Paulo, 2013.....35

Figura 7 - Fotomicrografias de cortes de fígados de ratas corados com o método de Picrossírius. Em **A**, observam-se os componentes do espaço porta: a veia porta (seta grossa); ducto biliar (cabeça de seta) e artéria hepática (seta fina). Em **B**, nota-se que o espaço porta ainda não apresenta reação ductular ou deposição de fibras colágenas. Em **C**, observa-se a deposição das fibras colágenas com pequenos feixes irradiando excentricamente (cabeça de seta) e novos ductos biliares (setas finas). Em **D**, nota-se a presença de finos feixes colágenos (cabeça de seta) e novos ductos biliares (setas finas). **A**; rata do grupo controle, **B**; rata tratada com TAA por uma semana, **C**; rata tratada com TAA por quatro semanas, **D**; rata tratada com TAA por sete semanas. Barra – 50 µm. São Paulo, 2013.....37

Figura 8 – Fotomicrografias de cortes de fígado com detecção de macrófagos ED1. As ratas do grupo controle (**A**) exibiram poucas células ED1 positivas ao redor das VHT, mas aumento considerável foi observado após uma semana de tratamento (**B**), atingindo número máximo na quarta semana (**C**) e redução lenta e contínua até a sétima semana (**D**). Barra – 50 µm. São Paulo, 2013.....41

Figura 9 – Os macrófagos ED2 também se encontraram nos sinusóides (**A**). A partir da primeira semana eles foram atraídos para as VHT (**B**), na quarta semana foram vistas em regiões com hepatócitos necróticos (seta) (**C**) e, ao fim do tratamento com TAA, foram observadas próximos aos espaços porta (**D**) participando da necrose de sacabocado (seta). Barra - 20µm. São Paulo, 2013..42

Figura 10 – Os hepatócitos em apoptose são encontrados naturalmente em todas as zonas acinares **(A)** e, uma vez expostos agudamente à TAA por uma semana (grupo 1T) **(B)**, um grande número de hepatócitos foram afetados e entraram em apoptose, surgindo áreas de necrose (seta), detectadas na quarta semana **(C)** na zona 2 acinar (seta) porém, ao final do experimento **(D)** os hepatócitos em apoptose se concentraram próximos das VHT. Barra – 50 µm. São Paulo, 2013.....43

Lista de tabelas

- Tabela 1 – Especificações dos anticorpos utilizados para a detecção de macrófagos exsudativos e teciduais, células dendríticas, células estreladas hepáticas e hepatócitos apoptóticos. São Paulo, 201327
- Tabela 2 - Morfometria macroscópica do fígado das ratas com avaliação intragrupo realizada entre os grupos controle (C) e tratado (T) para os respectivos períodos de tratamento (p. ex. Pvivo 1C vs. 1T). Os resultados (média $\pm$ desvio padrão) mostraram diferenças estatísticas entre si - indicadas com asteriscos - para os índices morfométricos macroscópicos IVP, IFC e IHS a partir da terceira semana, com o uso do teste t não pareado com correção de Welch ($p < 0,05$). **N**, número de animais em cada grupo; **P vivo**, peso final; **P Vis**, peso das vísceras; **P Car**, peso da carcaça; **PFig**, peso do fígado; **VFig**, volume do fígado; **DFig**, densidade do fígado; **IVP**, índice vísceras/peso vivo; **IFC**, índice fígado/carcaça; **IHS**, índice hepatossomático. São Paulo, 2011.....32
- Tabela 3 - Média e desvio padrão do índice fígado carcaça (em %). Nas linhas os asteriscos indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos tratados e os controles na mesma semana. O número de ratas em cada grupo está indicado entre parênteses. ANOVA com pós-teste de Bonferroni. São Paulo, 2013.....33
- Tabela 4 - Média e desvio padrão do índice hepatossomático (em %). Nas linhas os asteriscos indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos tratados e os controles na mesma semana. O número de ratas em cada grupo está indicado entre parênteses. ANOVA com pós-teste de Bonferroni. São Paulo, 2013.....33
- Tabela 5 - Média e desvio padrão do índice vísceras/peso (em %). Nas linhas os asteriscos indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos tratados e os controles na mesma semana. O número de ratas em cada grupo está indicado entre parênteses. ANOVA com pós-teste de Bonferroni. São Paulo, 2013.....34

- Tabela 6 - O volume ocupado pelas fibras colágenas (em %) variou, mas não houve aumento significativo ($p>0,05$) durante o uso da TAA. 1T a 7T denominam os grupos tratados com TAA nos períodos de uma à sete semanas. ANOVA com pós-teste de Bonferroni ($p<0,05$). São Paulo, 2013.....36
- Tabela 7 – Média e desvio padrão de células positivas por campo ($0,1497746 \text{ mm}^2$) para o anticorpo anti – ED1. O número de ratas em cada grupo está indicado entre parênteses. Nas linhas os asteriscos indicam diferença estatística ($p<0,05$) entre os grupos tratados e os controles na mesma semana. O número de ratas em cada grupo está indicado entre parênteses. ANOVA com pós-teste de Bonferroni. São Paulo, 2013.....39
- Tabela 8 - Média e desvio padrão de células positivas por campo ($0,1497746 \text{ mm}^2$) para o anticorpo anti – ED2. O número de ratas em cada grupo está indicado entre parênteses. Nas linhas os asteriscos indicam diferença estatística ($p<0,05$) entre os grupos tratados e os controles na mesma semana. O número de ratas em cada grupo está indicado entre parênteses. ANOVA com pós-teste de Bonferroni. São Paulo, 2013.....39
- Tabela 9 - Média e desvio padrão de células positivas por campo ($0,1497746 \text{ mm}^2$) para o anticorpo anti – caspase 3. O número de ratas em cada grupo está indicado entre parênteses. Nas linhas os asteriscos indicam diferença estatística ($p<0,05$) entre os grupos tratados e os controles na mesma semana. O número de ratas em cada grupo está indicado entre parênteses. ANOVA com pós-teste de Bonferroni. São Paulo, 2013.....40

Resumo

Conrado ALV. *Histopatologia do desenvolvimento do modelo de cirrose hepática em ratas pela tioacetamida* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2013.

A cirrose é uma doença cosmopolita que causa milhares de mortes a cada ano e encontra-se em estado de atenção pelos sistemas de saúde governamentais. Em auxílio à sua compreensão, utiliza-se o modelo de indução de cirrose pela tioacetamida (TAA) em ratas. Porém este modelo tem carência de informações sobre a presença de células inflamatórias no fígado, as quais desempenham ação destrutiva e estimulam o desenvolvimento da cirrose. Propusemos nesta pesquisa a detecção de macrófagos e células dendríticas neste modelo nas primeiras sete semanas com o uso de tioacetamida na dose de 200mg/kg em aplicações intraperitoneais, correlacionando-as com a apoptose de hepatócitos, a presença de células MCP-1 positivas e o desenvolvimento da fibrose em fígado de ratas. Com isto, esperou-se encontrar o aumento contínuo de macrófagos teciduais e exsudativos, juntamente com o aumento de células dendríticas, atraídas pela secreção de MCP-1 pelas células estreladas hepáticas. Esperou-se também a detecção de hepatócitos em apoptose e consequente deposição de fibras colágenas pelas células estreladas hepáticas. A ação tóxica da tioacetamida foi observada pela necrose de sacabocado e reação tecidual com proliferação de ductos biliares. A tioacetamida foi eficiente em desencadear a presença de macrófagos e hepatócitos em apoptose nas primeiras semanas, contudo foi ineficaz em manter o aumento destes eventos de forma constante até o final da sétima semana. Além disso, o aumento do tecido colágeno não foi significativo, indicando indiretamente a presença de macrófagos e a lesão de hepatócitos não foi suficientemente intensa para desencadear a ação máxima das células estreladas hepáticas durante as sete semanas de tratamento. A utilização de 200 mg/kg de tioacetamida induziu a presença de células inflamatórias, todavia a lesão do parênquima hepático foi atenuada com o tempo. Portanto, a fim de se manter a constante lesão e inflamação do fígado, possivelmente será necessário aumentar a dose de TAA.

Descritores: Cirrose hepática/fisiopatologia; Tioacetamida/toxicidade; Ratos Wistar; Ativação de macrófagos; Inflamação; Modelos animais; Fígado

Abstract

Conrado ALV. Developmental histopathology of the thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina; 2013.

Cirrhosis is a cosmopolitan disease that causes thousands of deaths each year and is in a state of attention by governmental health systems. In aid for its comprehension, we use the model of cirrhosis induced by thioacetamide (TAA) in rats. But this model has a lack of information about the presence of inflammatory cells in the liver, which play destructive action and stimulate the development of cirrhosis. We have proposed in this research to detect macrophages and dendritic cells in this model using 200mg/kg of thioacetamide via intraperitoneal for seven weeks and correlate them with apoptosis in hepatocytes, the presence of MCP-1 positive cells and the development of fibrosis in the liver of female rats. It was hoped to find steady increase in tissue and exudative macrophages and of dendritic cells attracted by the release of MCP-1 by hepatic stellate cells, to detect apoptosis in hepatocytes and consequent increase collagen deposition by hepatic stellate cells. The toxic action of thioacetamide was observed by piecemeal necrosis and tissue reaction with bile duct proliferation. The thioacetamide was effective in triggering the presence of macrophages and hepatocyte apoptosis in the first weeks, but ineffective in maintaining steadily increase of these events until the end of the seventh week. Furthermore, the increase of collagen tissue was not significant; indicating indirectly that the presence of macrophages and hepatocyte injury was not enough intense to trigger the maximum action of hepatic stellate cells during the seven weeks of treatment. The use of 200 mg / kg of thioacetamide induced the presence of inflammatory cells; however the injury of the hepatic parenchyma was attenuated with time. Therefore, in order to keep the constant liver injury and inflammation possibly will be necessary to increase the dose of TAA.

Descriptors: Liver cirrhosis/physiopathology; Thioacetamide/toxicity; Rats, Wistar; Macrophage activation; Inflammation; Models, animal; Liver.

1.Introdução

Em todos os continentes, as doenças hepáticas crônicas se apresentam em situação de atenção. A expectativa de vida destes pacientes é reduzida (Lim; Kim, 2008) e, mesmo com tratamentos alopáticos e transplante hepático a taxa de mortalidade não diminuiu nos últimos 30 anos (Asrani; Kamath, 2013). Dentre as diversas doenças hepáticas crônicas, a hepatite C tem seu desfecho como cirrose em 20% a 30% dos pacientes, sendo então importante o desenvolvimento de estratégias para seu controle e tratamento (Crawford; Liu, 2010).

Diante desta situação, muitos modelos animais experimentais foram desenvolvidos para o estudo, a compreensão e a reversão da cirrose hepática. Com o propósito de causar lesão no fígado, o uso de tetracloreto de carbono (CCl_4) em ratos é o modelo mais antigo e produz alterações semelhantes às observadas na cirrose humana, já o modelo em que se utiliza a dimetilnitrosamina (DMN) apresenta problemas como a alta mortalidade, necrose e inflamação grave que não refletem os casos de cirrose humana. Contudo, o modelo em que se utiliza a tioacetamida (TAA) é o mais recente e com detecção de sinais e sintomas mais próximos aos relatados na cirrose humana (Guerra, 2008) sendo, portanto, o escolhido para esta pesquisa.

Uma das críticas ao modelo da TAA é a baixa presença de células inflamatórias, um componente essencial na patogenia da cirrose (Laleman *et al.*, 2006). No processo lesivo hepático ocorre a ação sinérgica de diversas células do sistema imunológico, entre as quais os macrófagos teciduais (ou células de Kupffer) e macrófagos que adentram o parênquima e têm ações locais, e as células dendríticas que “patrulham” os tecidos e estimulam a resposta imunológica em nível sistêmico (Hernandez-Gea; Friedman, 2011).

Sendo assim, o presente estudo vem contribuir com mais informações sobre a presença de macrófagos exsudativos e teciduais, além das células dendríticas no fígado de ratas submetidas à indução de cirrose hepática pelo uso da TAA.

2. Revisão da Literatura

2.1 O fígado

O fígado é a maior glândula isolada do corpo e corresponde de 2% a 5% do peso corporal do organismo. A proporção entre o peso do fígado e o peso corporal geralmente é constante (Banks, 1992).

As numerosas e variadas funções hepáticas são desempenhadas por dois tipos celulares – os hepatócitos e os macrófagos teciduais (MT), também chamados de células de Kupffer. O hepatócito retém um alto potencial mitótico e desempenha funções diversificadas e especializadas, enquanto que os MT revestem regiões dos sinusóides hepáticos, estando intimamente associados aos hepatócitos (Banks, 1992). Os MT metabolizam hemácias maduras com mais de 120 dias de vida e digerem a hemoglobina, secretam proteínas relacionadas com processos imunológicos e destroem bactérias (Junqueira; Carneiro; 1999).

A organização histológica do fígado pode ser considerada através de três perspectivas: morfológica, secretora e vascular. A unidade morfológica é constituída pelo lóbulo hepático; já a unidade funcional é o lóbulo portal que possui função de secretar bile e a unidade vascular é o ácino hepático (Figura 1) (Turner *et al.*, 2011).

Os lóbulos hepáticos são massas prismáticas e poligonais de tecido que são formadas por placas ou lâminas de hepatócitos interdigitados entre os capilares sinusóides anastomosados. As placas celulares e de sinusóides parecem irradiar-se a partir de um vaso centralmente posicionado, a veia hepática terminal (VHT). O conceito de lóbulo hepático está fundamentado em duas relações simples: o padrão de organização estrutural e o padrão de organização do fluxo sanguíneo da periferia, através dos sinusóides, em direção à VHT (Junqueira; Carneiro, 1999).

Os sinusóides formam uma rede altamente anastomosada que separa as placas hepáticas umas das outras e pela qual é transportado o sangue dos vasos interlobulares (Junqueira e Carneiro, 1999). Nos capilares sinusóides desembocam ramos terminais da artéria hepática e da veia porta, de tal modo que há mistura de sangue arterial e venoso (George *et al.*; 1998). A luz do sinusóide é revestida por dois tipos de células: células endoteliais típicas e por MT. Apesar da justaposição entre os sinusóides e os hepatócitos, eles são separados por um espaço perissinusoidal ou espaço de Disse (Banks, 1992).

Fibras reticulares, microvilos dos hepatócitos e células estreladas hepáticas (HSC) ocupam o espaço perissinusoidal. Estas últimas controlam o *feedback* do tecido conjuntivo intersticial (interlobular), o qual é mais proeminente nas regiões interlobulares chamadas de espaços porta (Banks, 1992). O espaço porta é formado pelos ramos interlobulares de um ducto biliar, da artéria hepática e da veia porta, nervos e pequenos vasos linfáticos, além de tecido conjuntivo intersticial (Junqueira; Carneiro, 1999).

Os hepatócitos imediatamente em contato com o espaço porta são chamados de placa limitante, os quais formam uma orla descontínua ao redor do mesênquima do espaço porta (Crawford; Liu, 2010). O espaço porta é o ponto de referência da organização do fígado e no estudo dos fígados hígidos e alterados. (Banks, 1992).

O fígado é classicamente dividido em lóbulos hexagonais de 1 a 2 mm de diâmetro, orientados ao redor das VHT. Entretanto, como os hepatócitos próximos às VHT estão mais distantes do suprimento sanguíneo, argumentou-se que eles estão na periferia dos “lóbulos metabólicos”, chamados ácinos. Conceituados como aproximadamente triangulares, os ácinos possuem os ramos terminais da artéria hepática e da veia porta estendendo-se a partir dos espaços porta, em suas bases, e VHT nos seus ápices. O parênquima do ácino hepático divide-se em três zonas, estando a zona 1 mais perto do suprimento vascular, a zona 3 em contato com a VHT e a zona 2 em uma posição intermediária (Crawford; Liu, 2010).

Figura 1 - Organização histológica do fígado. A, lóbulo portal com destaque para os colangióis e canalículos biliares entre os hepatócitos. B, lóbulo hepático; com ênfase no hepatócito. C, ácino hepático e suas divisões em zonas (adaptado de Turner *et al.*, 2011)

2.2 Modelo de indução de cirrose com TAA

Os modelos experimentais de cirrose hepática em roedores utilizam diversos tipos de substâncias químicas tóxicas – os xenobiontes - na indução de lesões, por exemplo, o tetracloreto de carbono (CCl_4); a dimetilnitrosamina (DMN) e a tioacetamida (TAA) (Brenner, 2009). O modelo que utiliza a TAA é o mais recente (Guerra *et al.*, 2009, Cogliati *et al.*, 2010, Trotta *et al.*, 2013), produz alterações mais próximas às que ocorrem na cirrose humana (Laleman *et al.* 2006) tais como a peroxidação das membranas lipídicas, necrose celular, fibrose e reorganização micronodular do parênquima, proliferação ductular (Sun *et al.*, 2000) e, finalmente, cirrose macronodular (Hakateyama *et al.*, 2002).

Na avaliação histopatológica, a lesão causada pela TAA é consequência da oxidação lipídica das membranas dos hepatócitos (Sun *et al.*, 2000) e de organelas, tais como as mitocôndrias (Natarajan *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2012) e retículo endoplasmático (Ron; Walter, 2007; Tanjore *et al.*, 2013), o que resulta na ativação da apoptose pela via intrínseca (Chen *et al.*, 2006) e necrose dos hepatócitos (Mangipudy *et al.*, 1998).

Além das características patológicas, o uso da TAA apresenta outras vantagens como menor toxicidade para o operador em comparação com os outros xenobiontes, a administração por diferentes vias - oral; intubação intragástrica; subcutânea ou intraperitoneal (Fontana *et al.*, 1996), diversos protocolos de administração (Corbin; Minuk, 2003), a especificidade pelo fígado como órgão alvo, sua ação específica na região da VHT, meia vida curta e grande intervalo de tempo entre seus efeitos necrogênicos e a insuficiência hepática (Chilakapati *et al.*, 2005), e menor mortalidade em relação ao CCl₄ (Li *et al.*, 2002).

A utilização deste modelo tem como objetivos a compreensão do desenvolvimento da cirrose e suas consequências, além de estratégias para a sua prevenção e tratamento farmacológico alopático ou com extratos vegetais e soluções nutricionais (Low *et al.*, 2004; Nagata *et al.*, 2005; Pinzani *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Laleman *et al.*, 2006; Noda *et al.*, 2006; Guerra *et al.*, 2009; Furtado *et al.*, 2012; Salama *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2012; Trotta *et al.*, 2013).

2.3 Morfologia da hepatite aguda e crônica

As alterações morfológicas na hepatite aguda e crônica são compartilhadas entre os vírus hepatotróficos e podem ser também simuladas por reações medicamentosas e substâncias xenobiontes (Crawford; Liu, 2010).

Na hepatite aguda, a lesão dos hepatócitos assume a forma de tumefação difusa, ou seja, balonização, de modo que o citoplasma parece estar vazio e conter apenas feixes esparsos de remanescentes citoplasmáticos. São vistos dois padrões de morte celular dos hepatócitos. No primeiro, a ruptura das membranas celulares acarreta citólise. As células necróticas parecem ter se “extinguido”, com colapso da estrutura de reticulina de colágeno onde as células desapareceram; agregados de macrófagos removedores marcam as áreas de extinção (Cotran *et al.*, 2000, Schoemaker; Moshage, 2004).

O segundo padrão de morte celular, a apoptose, é mais discreto. Com a morte celular de origem tóxica ou imunomediada, hepatócitos isolados tornam-se arredondados, picnóticos e intensamente eosinofílicos contendo núcleos fragmentados. As células apoptóticas também são fagocitadas dentro de horas por macrófagos e, portanto, difíceis de serem encontrados a despeito de uma taxa acelerada de lesão de hepatócitos. Nos casos intensos, a necrose confluyente de hepatócitos pode gerar a necrose em ponte conectando regiões portais-portais, centrais-centrais ou portais-centrais de lóbulos adjacentes, significando uma forma mais intensa de hepatite aguda. A tumefação e regeneração dos hepatócitos acabam por comprimir os sinusóides, e o arranjo discretamente radial é perdido (Desmet, 1988, Cotran *et al.*, 2000).

A inflamação é um achado típico e, em geral, proeminente da hepatite aguda. Os MTs sofrem hipertrofia e hiperplasia e, com frequência, estão carregados de lipofuscina em virtude de fagocitose dos restos hepatocelulares. Os espaços porta geralmente estão infiltrados com uma mistura de células inflamatórias. O infiltrado inflamatório pode extravasar para o parênquima adjacente, causando necrose dos hepatócitos periportais, essa “hepatite de interface” (necrose de sacabocado) pode também ocorrer na hepatite aguda crônica. Por fim, o epitélio dos ductos biliares pode tornar-se reativo e, até mesmo, proliferar, formando estruturas ductulares mal definidas (Cotran *et al.*, 2000, Schoemaker; Moshage, 2004).

As características histológicas da hepatite crônica variam de extremamente leves a graves. A necrose de hepatócitos em toda a extensão do

lóbulo pode ocorrer em todas as formas de hepatite crônica. Nas formas mais leves, o infiltrado inflamatório significativo limita-se aos tratos portais e é constituído por linfócitos, macrófagos, plasmócitos eventuais e raros neutrófilos e eosinófilos. A hepatite da interface e necrose em ponte contínua anunciam uma lesão hepática progressiva. A marca da lesão hepática é o depósito de tecido fibroso. No início, somente os espaços porta exibem fibrose aumentada, mas a fibrose periportal ocorre com o tempo, seguida por conexão dos septos fibrosos entre lóbulos, conhecida como fibrose em ponte (Desmet, 1988, Cotran *et al.*, 2000).

2.4 Necrose

Em contraste à apoptose e outras formas não tão bem caracterizadas de morte celular programada, a morte accidental de células animais em resposta a uma injúria aguda, como um trauma, a falta de suprimento de sangue ou qualquer lesão exógena irreversível, geralmente, é causada pelo processo de necrose celular (Alberts *et al.*, 2012).

A necrose refere-se a um espectro de alterações morfológicas que sucedem a morte celular no tecido vivo, em grande parte resultantes da ação degradativa progressiva de enzimas sobre a célula letalmente lesionada. Sua manifestação mais comum é a necrose de coagulação, caracterizada por desnaturação das proteínas citoplasmáticas, degradação das organelas celulares e tumefação celular (Cotran *et al.*, 2000). Didaticamente, as células necrosadas se expandem e rompem, liberando seus conteúdos sobre os vizinhos e provocando a resposta inflamatória (Alberts *et al.*, 2010).

A aparência morfológica da necrose resulta de dois processos essencialmente concomitantes: a digestão enzimática da célula e a desnaturação de proteínas (Malhi *et al.*, 2010). As células necróticas mostram eosinofilia aumentada, atribuível, em parte, à perda da basofilia normal

conferida pelo RNA no citoplasma e, em parte, à maior ligação da eosina às proteínas intracitoplasmáticas desnaturadas (Cotran *et al.*, 2000). A desnaturação em células necróticas pode ser interpretada como uma medida preventiva contra a resposta imunológica (Majno; Joris, 2004). A célula pode ter aparência homogênea mais vítrea do que a de células híginas, principalmente em virtude da perda de partículas de glicogênio. Quando as enzimas digerem as organelas citoplasmáticas, o citoplasma se torna vacuolizado e parece roído por traças (Cotran *et al.*, 2000).

Alterações nucleares aparecem na forma de um de três padrões, todas devidas à degradação inespecífica de DNA. A basofilia da cromatina pode esmaecer e ocorrer a cariólise, uma alteração que reflete atividade de DNase. Um segundo padrão é a picnose, caracterizada por retração nuclear e aumento da basofilia e observada também na morte celular apoptótica. Aqui, o DNA aparentemente se condensa em uma massa basofílica sólida e encolhida. No terceiro padrão, a cariorrexe, o núcleo picnótico sofre fragmentação. Com o decorrer do tempo (um ou dois dias), o núcleo na célula necrótica desaparece totalmente (Cotran *et al.*, 2000).

A necrose frequentemente exhibe uma distribuição zonal. A mais óbvia é a necrose dos hepatócitos imediatamente em torno da VHT – a denominada necrose centrolobular, que é uma lesão que é típica de isquemia a várias reações medicamentosas e tóxicas (Malhi *et al.*, 2010).

Na maioria das causas de lesão hepática, encontra-se uma mistura variável de morte e inflamação hepatocelulares. A necrose de hepatócitos pode limitar-se a células esparsas dentro dos lóbulos hepáticos - a necrose focal - ou à interface entre o parênquima periportal e os espaços porta inflamados – a hepatite de interface. Com uma lesão inflamatória mais intensa, a necrose de hepatócitos contíguos pode expandir-se a lóbulos adjacentes em uma progressão porta-porta, porta-VHT ou VHT-VHT, formando assim a necrose em ponte. A necrose de lóbulos inteiros ou necrose submaciça, e da necrose da maior parte do fígado, também chamada necrose maciça, geralmente é acompanhada de insuficiência hepática (Cotran *et al.*, 2000).

Embora a necrose celular seja uma característica morfológica clássica da lesão hepática, sua contribuição patogênica para a fibrose hepática tem sido negligenciada, em grande parte porque não há marcadores moleculares ou bioquímicos de necrose similares àqueles descobertos para a apoptose. A necrose pode simplesmente representar uma resposta celular mais grave que a apoptose quando as concentrações do estímulo lesionante são maiores, mas o potencial relativo da necrose comparado com a apoptose na estimulação da fibrogênese são desconhecidos (Friedman, 2008).

2.5 Apoptose

A apoptose é uma forma de morte celular programada destinada a eliminar células desnecessárias durante a embriogênese, regulando o número de células em um novo ser em formação. Mas também ocorre como um mecanismo de defesa, como nas reações imunológicas; quando as células são lesadas por uma doença ou agentes nocivos; e no envelhecimento (Alberts *et al.*, 2010).

Morfologicamente, as células em apoptose se encolhem e se condensam, o citoesqueleto colapsa, o envelope se desfaz, e a cromatina nuclear se condensa e se quebra em fragmentos de formas e tamanhos diversos (Cotran *et al.*, 2000). A superfície celular comumente forma bolhas, e se a célula é grande, frequentemente quebram-se em fragmentos envolvidos por membranas chamados corpos apoptóticos (Malhi *et al.*, 2010).

O processo mais importante é a alteração química da célula ou dos corpos apoptóticos, que são rapidamente engolfados por uma célula vizinha, ou um macrófago, antes que possam liberar seus conteúdos (Majno; Joris, 2004). Dessa maneira, a célula morre e é fagocitada rapidamente, existindo poucas delas para serem vistas (Alberts *et al.*, 2010). Os corpúsculos apoptóticos são rapidamente degradados dentro dos lisossomos, e as células adjacentes

migram ou proliferam para repor o espaço ocupado pela célula apoptótica agora eliminada (Cotran *et al.*, 2000).

Em uma visão molecular, a morte celular por apoptose pode ocorrer através de duas vias principais, chamadas via intrínseca e extrínseca. A via extrínseca é iniciada a partir da ligação de ligantes extracelulares aos receptores transmembrana que desencadeiam a cascata enzimática e a ação da procaspase-8. Por outro lado, a via intrínseca, também conhecida como via mitocondrial, é ativada por estímulos que causam a permeabilização das membranas das mitocôndrias com consequente liberação de fatores para o citosol como, por exemplo, o citocromo C, que iniciam e regulam a ação da procaspase-9 (Yin *et al.*, 2012).

As procaspases-8 e 9 atuam nas procaspases-3, 6 e 7 que, em suas formas efetoras (caspases-3, 6 e 7), ativam a enzima DNase ativada por caspase (DAC). As DAC clivam o DNA nas regiões ligantes internucleossomais, resultando em múltiplos fragmentos de DNA com 180 pares de base (Malhi *et al.*, 2010).

2.6 Interações celulares na fibrose hepática

As interações entre células do parênquima e o infiltrado inflamatório diante de um xenobionte são fundamentais para a deposição de fibras colágenas no parênquima hepático, com futura evolução para cirrose.

Em fígados agredidos por xenobiontes tanto a necrose quanto a apoptose contribuem para a morte celular (Galle, 1997). A indução da apoptose por receptores de HSCs, MT, e macrófagos exsudativos (ME) (Kolios *et al.*, 2006; Ramadori *et al.*, 2008) juntamente com a fagocitose de corpúsculos apoptóticos (Friedman, 2008) são processos ativadores da fibrose hepática (Figura 3) (Canbay *et al.*, 2004; Guicciardi; Gores, 2010).

Figura 2 – A via extrínseca da apoptose é ativada pela ligação de células do sistema imunológico ao receptor CD95 e a via intrínseca é ativada por sinais externos e lesões internas como, por exemplo, lesão ao DNA nuclear. Ambas as vias convergem para a ativação da caspase 3 (adaptado de Hengartner, 2000)

As HSCs são ativadas por numerosos estímulos parácrinos e por MT, em áreas de necrose hepatocelular e inflamação. Em seguida, passam a expressar α -actina de músculo liso e sintetizam colágeno tipo I e III (Figura 3). Por fim, proliferam e atraem leucócitos e a elas próprias para os sítios de lesão. (Brandão *et al.*, 2006; Kolios *et al.*, 2006). Se o processo fibrótico é suficientemente mantido, as HSCs tornam-se agora capazes de sintetizar tais mediadores, desta forma mantendo e ampliando sua própria atividade fibrogênica através da autoestimulação (Ramadori *et al.*, 2008).

A fibrogênese hepática não é causada somente por um aumento na síntese de tecido conjuntivo, mas é basicamente o resultado do desequilíbrio

entre o aumento da síntese de matriz e a diminuição da degradação da matriz extracelular (Benyon *et al.*, 1996).

Concomitante com os processos de morte celular e indução de fibrose hepática, ocorre a quimiotaxia de células de defesa para o interior do parênquima hepático. A inflamação perpetua-se enquanto o agente nocivo se mantiver presente ou for repetidamente administrado (Ramadori *et al.*, 2008).

A observação de que as HSCs contribuem com o acúmulo de neutrófilos, quimioatração de macrófagos e linfócitos T na doença hepática fornece um papel determinante das HSCs na distribuição de linfócitos dentro do fígado inflamado (Holt *et al.*, 2009). Nos fígados lesionados agudamente, as HSCs sintetizam diversos tipos de citocinas e quimiocinas que participam do recrutamento de leucócitos da corrente sanguínea, entre elas a MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1).

Figura 3 – A fagocitose de corpúsculos apoptóticos por MT e HSC desencadeia a resposta inflamatória e retroestimula a apoptose de hepatócitos, além de aumentar a síntese de colágeno tipo I (adaptado de Guicciardi; Gores, 2010)

A MCP-1 foi detectada em HSCs ao longo de septos fibrosos (Nagata *et al.*, 2005) e em células de regiões centrolobulares afetadas (Mori *et al.*, 2009).

A habilidade das HSCs em secretar MCP-1 indica que estas células contribuem não apenas para a atração, mas também para ativação de MEs no local da lesão (Marra *et al.*, 1993, 1998). Consequentemente, a supressão da secreção de MCP-1 inibe o infiltrado inflamatório de macrófagos e a fibrose no fígado de ratos (Imamura *et al.*, 2005).

As HSCs interagem com células inflamatórias também via receptor, o que leva à expressão de citocinas que amplificam a inflamação (Canbay *et al.*, 2004). Sinergicamente a apoptose induz a inflamação, pois os macrófagos aparecem em cena e fagocitam as células apoptóticas (Majno e Joris, 2004), mas não secretam substâncias que estimulam atração de outras células inflamatórias (Hori *et al.*, 2003) (Figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática do modelo proposto aliando a apoptose de hepatócitos à inflamação e à fibrose. Estímulos proapoptóticos induzem a apoptose dos hepatócitos, que secretam sinais lipídicos para “captura” por HSCs e MTs. A fagocitose de corpúsculos apoptóticos estimula as expressões de genes prófibróticos e ligantes de morte (como o CD95L). A persistente ativação destas células promove a apoptose adicional de hepatócitos, a qual culmina na inflamação hepática, com geração de quimiocinas (como a MCP-1) e ativação das HSCs. A ativação das HSCs torna-as relativamente resistentes aos estímulos apoptóticos, perpetuando o acúmulo de fibras colágenas (adaptado de Canbay *et al.*, 2004)

Macrófagos constituem-se em um grupo de células com funções e morfologia heterogêneas, e os subgrupos podem ser identificados através de técnicas imunohistoquímicas. Os antígenos ED1 e ED2 são particularmente úteis na caracterização de subpopulações de macrófagos hepáticos. O anticorpo ED1 liga-se à maior parte da população de macrófagos, bem como a monócitos do sangue periférico e a precursores da medula óssea. Devido ao fato de que poucas células expressam ED1 quando ativadas, este é útil para a classificação dos membros do sistema fagocítico mononuclear (Gomes *et al.*, 2004).

Duas principais subpopulações de macrófagos são distinguíveis através do uso combinado de anticorpos anti - ED1 e anti - ED2. Essas populações apresentam discretas diferenças morfológicas, mas distribuição anatômica e características funcionais distintas. Uma população de pequenas células ED1 positivas está presente ao redor dos espaços porta e VHT. Outra população, constituída por grandes células ED1 e ED2 positivas está localizada ao longo dos sinusóides. Pequenos macrófagos hepáticos normalmente não são marcados com anticorpo anti - ED2 (Armbrust; Ramadori, 1996). De forma geral, o anticorpo anti - ED1 evidencia os MEs e o anti - ED2 detecta os MT.

Além disso, para a detecção de células dendríticas pode ser utilizado o antígeno OX6. Tais células são observadas nas regiões periportais de fígados de ratos (Ide *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2009). As células dendríticas, as quais são apresentadoras clássicas de antígenos são abundantes no fígado, e sua contribuição na fibrose hepática é uma área de crescente interesse (Hernandez-Gea; Friedman, 2011).

Todas estas células foram detectadas em regiões da VHT e espaços porta de fígados de ratos com lesão tóxica causada por TAA (Ide *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2009). Células ED1 foram detectadas nos espaços sinusoidais e junto de septos fibrosos, enquanto que células ED2 foram encontradas em áreas constituídas por hepatócitos degenerados em fígados de ratos expostos à TAA (Hori *et al.*, 2003; Noda *et al.*, 2006).

Tendo em vista o papel central da inflamação no desenvolvimento da fibrose e cirrose hepática em ratos, e uma vez que já foi comprovado que o modelo de administração de TAA é eficaz no desenvolvimento de cirrose (Trotta *et al.*, 2013), o objetivo do trabalho foi comprovar a presença de inflamação nos estágios iniciais e estudar este processo inflamatório para substanciar melhor o modelo de cirrose hepática induzida por TAA em ratos, a presença das células do sistema imunológico no interior do fígado, a ativação e aumento da população de macrófagos exsudativos, teciduais e células dendríticas, além da quimiotaxia para as regiões lesionadas e a apoptose de hepatócitos nas diversas regiões acinares.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estudar o modelo de indução experimental de cirrose por tioacetamida no âmbito da resposta celular do sistema imunológico ao longo das primeiras sete semanas em ratas Wistar.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar semanalmente macrófagos exsudativos, macrófagos teciduais e células dendríticas nos fígados lesionados pela administração de tioacetamida;
- Detectar a deposição de fibras colágenas e quantificar o volume que estas ocupam no parênquima hepático;
- Avaliar a presença de células que expressam a proteína quimiotática de monócitos do tipo 1 (MCP-1);
- Quantificar semanalmente hepatócitos em apoptose durante o uso da tioacetamida.

4. Material e métodos

4.1 Animais

Foram utilizadas 105 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando entre 130g e 180g e com idades entre 30 e 60 dias. Em cada gaiola plástica forrada com maravalha e ração *ad libitum* foram acondicionados cinco animais. Posteriormente foram divididos em sete grupos de 15 ratas, sendo 10 que sofreram indução de fibrose pelo tratamento com tioacetamida (TAA) (Thioacetamide, Sigma-Aldrich, Germany, lote: BCB2830V) e cinco ratas controle. As ratas controle foram identificadas como 1C até 7C (grupos de ratas controle da primeira até a sétima semana) e as tratadas com TAA identificadas como 1T até 7T (grupos de ratas tratadas da primeira até a sétima semana) (Figura 5).

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) - protocolo 2048/2010 - e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP) – protocolo 349/11.

Figura 5 – Delineamento experimental do tratamento com TAA. As cruzes representam a semana em que cada grupo controle e tratado sofreu eutanásia. No eixo dos grupos: C - grupo de ratas controle; T- grupo de ratas tratadas. São Paulo, 2013

4.2 Modelo de indução da fibrose hepática pela administração da TAA

A TAA foi diluída em solução salina (NaCl a 0,9%, Sanobiol, Pouso Alegre, Brasil) na concentração de 4% e administrada via intraperitoneal na dose de 200mg/kg de peso vivo, 3 vezes por semana, com períodos entre uma e sete semanas (adaptado de Guerra *et al.*, 2009). As ratas dos grupos controle receberam solução salina via intraperitoneal.

4.3 Eutanásia

Dois dias após a última administração de TAA em cada grupo, os animais sofreram eutanásia utilizando-se isoflurano (Isoforine, Cristália, Itapira, Brasil) em oxigênio 100%, administrado através de circuito de Magill.

4.4 Morfometria e histologia do fígado

Após a eutanásia das ratas, estas foram pesadas e a incisão da cavidade abdominal no plano sagital permitiu a retirada dos órgãos abdominais para pesagem da carcaça, das vísceras, do fígado e posterior aferição do volume do fígado pelo método de Scherle (1970). Os parâmetros biométricos foram tabulados e utilizados para o cálculo dos respectivos índices morfométricos macroscópicos:

- 1) Índice vísceras/peso:

$$IVP (\%) = \frac{\text{peso das vísceras (g)}}{\text{peso da carcaça (g)}} \times 100$$

2) Índice fígado/carcaça:

$$IFC (\%) = \frac{\text{peso do fígado (g)}}{\text{peso da carcaça (g)}} \times 100$$

3) Índice hepatossomático:

$$IHS (\%) = \frac{\text{peso do fígado (g)}}{\text{peso da rata (g)}} \times 100$$

4) Densidade do fígado:

$$DFig (g/cm^3) = \frac{\text{peso do fígado (g)}}{\text{volume do fígado (cm}^3\text{)}}$$

Foram coletadas amostras dos lobos hepáticos lateral esquerdo e medial de todos os animais para análise histológica. A fixação dos fragmentos foi efetuada nos líquidos fixadores Bouin, Metacarn e McDowell (Kiernan, 1999). Para a inclusão do material utilizou-se parafina (parafina histológica, Erv-Plast, Brasil) e historresina (Historesin, Leica Mycrosystems Nußloch GmbH, Heidelberg, Germany). O material fixado em McDowell foi incluído em historresina a partir de uma bateria com concentrações crescentes de álcool etílico, álcool etílico absoluto-resina (1:1) e finalmente, resina.

Os blocos de parafina foram seccionados ao redor de 4µm de espessura e os blocos em historresina ao redor de 2µm.

4.5 Colorações para microscopia de luz

Para a verificação dos aspectos morfológicos no processo de lesão celular do fígado, foi utilizada a coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). Também foi utilizada a coloração com Picrossírius – direct red 80 (Fluka

Chemie GmbH, Steinheim, Switzerland) diluído em solução de ácido pícrico saturada (Cinética, Jandira, Brasil) (Junqueira *et al.*, 1979) - adaptada com o uso do ácido fosfomolibdico (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil) a 2%. Quando o ácido fosfomolibdico a 2% é utilizado antes da solução de Picrossírius a 5% este atua como mordente e o corante liga-se mais intensamente às fibras colágenas (Dolber; Spach, 1987).

4.6 Avaliação Histopatológica

As lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina foram analisadas nos aumentos de 40, 100 e 400x, e as lesões foram descritas. As lâminas coradas por Picrossírius realçaram a presença de fibras colágenas e foram avaliadas em aumentos de 100x, 400x e 1000x para a descrição da evolução da fibrose.

4.7 Quantificação do colágeno

Foram selecionados ao acaso materiais histológicos de 10 animais de cada grupo tratado e dos grupos controle. Em cada lâmina foi quantificada a proporção volumétrica das fibras colágenas em relação ao parênquima. Foram medidos 10 campos de tamanho uniforme por animal. A fotomicrografia de cada campo foi capturada e tratada de forma a contrastar as fibras colágenas da coloração de fundo por limiar de cor. Foram usadas as lâminas coradas apenas por Picrossírius. Após a separação, a proporção volumétrica ocupada (volume ocupado) pelas fibras colágenas foi medida.

O valor obtido nos 10 campos mensurados foi somado, obtendo-se o valor da área de colágeno no fígado (ACF) para cada rata. A porcentagem da área de colágeno no fígado (PACF) em relação ao restante do tecido hepático foi calculada através da fórmula:

$$PACF = \frac{ACF}{ACC} \times 100$$

na qual ACC é a somatória área total dos 10 campos de cada rata.

A densidade volumétrica média do colágeno para cada grupo experimental (DVMC) foi calculada através da fórmula:

$$DVMC = \frac{MÉDIA\ PACF}{ACC}$$

na qual ACC é a área do campo para cada rata, obtendo-se assim a média e desvio padrão das PACFs, sendo que o grupo experimental foi composto por 10 ratas.

Para a aquisição das imagens, foi utilizado microscópio óptico Olympus Bx60 (Olympus, Japan) - ajustado para aumento de 400x, com câmara acoplada Axiocam HRc Zeiss® (Zeiss, Jena, Germany). As imagens foram analisadas em um microcomputador com programa de morfometria AxioVision 4.8 (Zeiss, Jena, Germany).

4.8 Imuno-histoquímica para detecção de células do sistema imunológico

Os cortes de fígado de seis ratas fixados em formaldeído a 4% - obtido a partir do paraformaldeído - em lâminas silanizadas (Star Frost, Waldemar Knittel, Germany) foram desparafinados, a recuperação antigênica foi realizada com imersão e ebulição das lâminas em tampão citrato de sódio pH 6 em forno microondas por 10 minutos (750w), bloqueio de peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 10% diluída em metanol por 30 minutos, lavagens em tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,5 e bloqueio das reações inespecíficas com solução de leite em pó a 5% por uma hora em estufa a 50 °C, e incubados com os anticorpos primários *overnight* (Tabela 1) diluídos em tampão Tris-HCl (Santos *et al.*, 2009). O sistema de detecção utilizado para os anticorpos anti - ED1, anti - ED2 e anti-caspase 3 foi o Advance HRP Envision System (Dako K1390, Carpinteria CA, USA). Apenas para o anticorpo anti-MCP1 foi utilizado anticorpo secundário anti-hamster biotinilado (Vector Laboratories, Burlingame CA, USA, código BA9100) na concentração de 5

$\mu\text{g/ml}$ e a estreptavidina peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame CA, USA, código SA-5704), ambos por 30 minutos e, então, todos revelados com 3,3-diaminobenzidina tetrahydroclorato (DAB) (Dako K3468 Carpinteria CA, USA).

Controles negativos foram realizados pela omissão dos anticorpos primários e pela incubação *overnight* com tampão Tris-HCl pH 7,5 nos cortes de fígados de ratas submetidas às reações positivas.

Foram avaliados cinco campos de cada lâmina escolhidos aleatoriamente, os perfis das células positivas foram contadas manualmente e o resultado foi registrado como células positivas/área do campo ($0,1497746 \text{ mm}^2$) com o auxílio do microscópio óptico Olympus BX60 (Olympus, Japan) com câmara acoplada AxioCam HRc Zeiss® (Zeiss, Jena, Germany). As imagens foram analisadas em um microcomputador com o programa de morfometria específico AxioVision 4.8 Zeiss® (Zeiss, Jena, Germany).

4.9 Análise Estatística

As médias e desvios-padrão de todos os parâmetros quantificados foram devidamente comparados por testes estatísticos a partir do teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov e, em seguida, com testes paramétricos – teste t de Student com correção de Welch e análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni. Para os cálculos foi utilizado o programa estatístico GraphPad INSTAT® (versão 3.01, Zelanis Inc.). Os resultados estão apresentados com significância de 95% ($p < 0,05$).

Célula avaliada	Anticorpo	Especificidade	Clone	Diluição	Fabricante	Código
Macrófago exsudativo	Mouse anti rat CD68	CD68	ED1	1:100	AbD Serotec	MCA341GA
Macrófago tecidual	Mouse anti rat CD163	CD163	ED2	1:100	AbD Serotec	MCA342R
Célula estrelada hepática	Anti-MCP1 antibody	MCP-1	2H5	1:100	Abcam	ab21396
Célula dendrítica	Mouse anti-rat CD74	CD74	OX6	1:100	LifeSpam Bioscience	LS-B4812
Hepatócito apoptótico	Anti-active caspase-3 antibody	Fragmento p17 da caspase 3 ativa	PCL	1:100	Abcam	ab2302

OBS: PCL - anticorpo Policlonal

Tabela 1 – Especificações dos anticorpos utilizados para a detecção dos macrófagos recrutados e teciduais, células dendríticas, células estreladas hepáticas e hepatócitos apoptóticos. São Paulo, 2013

5. Resultados

5.1 Alterações macroscópicas

Em todo o período de tratamento das ratas, não houve ocorrência de óbito por manipulação, intoxicação aguda ou fatores outros como ração, água ou climatização do biotério.

O acompanhamento do peso das ratas dos sete grupos tratados mostrou uma redução de peso ao redor de 3% na primeira semana e 5% na segunda semana em relação ao peso inicial, com melhoras após a quarta semana.

5.2 Índices morfométricos macroscópicos

À necrópsia, foram observados o discreto enrugamento da superfície hepática e bordos levemente arredondados nos fígados de ratas tratadas durante sete semanas.

Em relação aos índices morfométricos macroscópicos, os valores calculados para IVP (índice vísceras peso); IHS (índice hepatossomático); IFC (índice fígado carcaça) e densidade do fígado (DFig) para os 14 grupos (1C à 7C, e 1T à 7T) foram avaliados tanto pela comparação entre o grupo tratado e o grupo controle para cada semana – por exemplo, para IVP: comparação entre 1C e 1T (teste t não pareado com correção de Welch) – quanto pela comparação do resultado de um grupo com os resultados de todos os outros grupos (ANOVA com pós-teste de Bonferroni).

Na primeira forma de avaliação os números revelaram que, a partir da terceira semana de uso contínuo de TAA, foi possível detectar elevações dos índices morfométricos nestes grupos ($p < 0,05$). Para o IFC foi observado aumento no grupo tratado por três semanas em relação ao controle ($7,2 \pm 0,5\%$ vs $5,0 \pm 0,3\%$); tratado por quatro semanas em relação ao controle ($6,4 \pm 0,8\%$ vs $5,3 \pm 0,4\%$); tratado por cinco semanas em relação ao controle ($6,1 \pm 0,6\%$ vs $4,7 \pm 0,4\%$); seis semanas em relação ao controle ($5,6 \pm 0,7\%$ vs $4,8 \pm 0,8\%$) e

tratado por sete semanas em relação ao controle ($5,7\pm0,8\%$ vs $4,6\pm0,3\%$) (Tabela 2). Para o IVP foi observado aumento no grupo tratado por três semanas em relação ao controle ($23,6\pm1,9\%$ vs $19,4\pm1,5\%$); tratado por quatro semanas em relação ao controle ($24,1\pm1,8\%$ vs $19,3\pm0,8\%$); tratado por cinco semanas em relação ao controle ($24,4\pm2,5\%$ vs $16,6\pm1,9\%$); tratado por seis semanas em relação ao controle ($23,1\pm2,3\%$ vs $17,9\pm1,2\%$) e tratado por sete semanas em relação ao controle ($22,6\pm2,2\%$ vs $18,6\pm0,9\%$) (Tabela 2). Para o IHS foi observado aumento no grupo tratado por três semanas em relação ao controle ($5,3\pm0,4\%$ vs $3,9\pm0,2\%$); tratados por cinco semanas em relação ao controle ($4,4\pm0,5\%$ vs $3,6\pm0,2\%$) (Tabela 2).

Quando os mesmos valores sofreram o segundo tipo de avaliação, não foram encontradas diferenças significativas entre si para os diferentes índices supracitados (Tabelas 3,4 e 5).

5.3 Avaliação Histopatológica

Durante as sete semanas foram observados o edema de hepatócitos com o citoplasma rendilhado (balonização), infiltrado inflamatório mono- e polimorfonuclear, células ovais, células em apoptose, megalocitose e poliploidia hepatocitária, deposição de fibras colágenas, e hepatite de interface (Figura 5).

Na zona 3 acinar foram detectadas células com cariorrexia e em apoptose (Figura 6A), hepatócitos poliploides (bi e trinucleados) possivelmente resultado de divisão celular (Figura 6D), e hepatócitos com megalocitose (núcleos com diâmetro aumentado e com 1 a 3 nucléolos evidentes), indicação indireta de aumento da síntese proteica. Além destes, foram também observados hepatócitos com citoplasma rendilhado (Figura 6B), sugerindo lesão em organelas citoplasmáticas.

Em zona 2 acinar foram observadas células poliploides, infiltrado inflamatório e células ovais.

Junto aos espaços porta foi notada uma grande quantidade de células ovas na primeira semana (não quantificado), as quais a partir da segunda semana apresentavam discreta organização em pequenos grupos e já na terceira semana foi possível observar novos ductos biliares formados nas periferias dessas regiões. A velocidade da diferenciação morfológica das células ovas é alta, pois na segunda semana ainda apresentavam aspecto ovoide, mas na quarta semana já se observava aspecto cuboide das células dos ductos biliares. Além disso, na sexta semana havia a presença de grande quantidade de células ovas no parênquima da zona 1 acinar e na sétima semana já se encontravam próximas da zona 2 acinar (Figura 6D).

O infiltrado inflamatório foi observado em todas as zonas acinares, mas com maior intensidade próxima das VHT (Figura 6A) e espaços porta. Pôde-se observar tanto neutrófilos (polimorfonuclear) quanto plasmócitos e macrófagos (mononucleares). Durante todo o período estudado foram observadas fagocitoses de debris celulares, assim como a proximidade entre macrófagos e células em apoptose (Figura 6C).

Com cinco semanas de uso contínuo de TAA foram detectadas, ao redor das VHT, destruição tecidual com deposição de material fibroso amorfo eosinofílico e o agrupamento de hepatócitos separados do parênquima tanto por este material fibroso quanto pelo infiltrado inflamatório, processo compatível com hepatite de interface (Figura 6D). Até a sétima semana, o infiltrado se intensificou ao redor das VHT.

Cortes submetidos à coloração de Picrossírius realçaram as fibras colágenas ao redor dos espaços porta e VHT (Figura 7A e 7B). Observou-se a deposição discreta de fibras colágenas ao redor de ductos e vasos dos espaços porta (Figura 7C), processo mais intenso do que o observado ao redor das VHT. Finos feixes colágenos originados das VHT foram observados a partir da terceira semana seguindo em direção aos sinusóides (Figura 7D), os quais também foram detectados nos espaços porta a partir da sétima semana.

Período de tratamento	Grupos	N	P vivo (g)	P Vis (g)	PCar (g)	PFig (g)	VFig (cm ³)	DFig (g/cm ³)	IVP(%)	IFC(%)	IHS(%)
1 semana	1C	5	131,4±2,9	29,2±1,1	98±2,8	6,6±0,5	6,6±0,5	1,0±0,1	22,2±0,8	6,7±0,5	5,0±0,3
	1T	10	137,4± 8,9	30,3±3,1	106,7±9,1	7,2±0,6	7,2±0,9	1,0±0,1	22,0±1,9	6,7±0,4	5,2±0,4
2 semanas	2C	5	142,4±4,2	31,8±2,9	110,6±2,8	7,6±1,1	7,0±1,0	1,1±0,2	22,3±1,9	6,9±1,2	5,3±0,9
	2T	10	152,0±16,9	37±4,5	106,8±14,7	8,2±1,5	7,5±1,1	1,1±0,1	24,5±3,3	7,6±0,5	5,4±0,4
3 semanas	3C	5	191,4±6,9*	37,2±3,4	148,8±6,5*	7,4±0,5*	7,6±0,9	1,0±0,1	19,4±1,5*	5,0±0,3*	3,9±0,2*
	3T	10	165,8±4,9*	39,1±2,9	122,8±4,4*	8,8±0,8*	8,4±1,0	1,1±0,1	23,6±1,9*	7,2±0,5*	5,3±0,4*
4 semanas	4C	5	216,2±13,5*	41,6±2,3	164,6±8,7*	8,8±0,8	8,6±0,9	1,0±0,1	19,3±0,8*	5,3±0,4*	4,1±0,2
	4T	10	177,1±10,6*	42,7±4,2	127,6±7,0*	8,2±1,3	7,9±1,4	1,1±0,1	24,1±1,8*	6,4±0,8*	4,6±0,6
5 semanas	5C	5	251,4±9,4*	41,6±4,6*	200,2±8,7*	9,4±0,5*	9,4±0,5*	1	16,6±1,9*	4,7±0,4*	3,7±0,2*
	5T	10	196,7±13,2*	47,8±3,8*	143,1±12,5*	8,7±0,9*	8,9±1,1*	1,0±0,1	24,4±2,5*	6,1±0,6*	4,4±0,3*
6 semanas	6C	5	229,4±14,9*	41,0±4,9	177,0±9,7*	8,6±1,5	8,6±1,1	1,0±0,1	17,9±1,2*	4,8±0,8	3,7±0,6
	6T	10	188,3±9,3*	43,4±3,9	134,9±9,4*	7,5±0,7	7,4±0,8	1,0±0,1	23,1±2,3*	5,6±0,7	4,0±0,4
7 semanas	7C	5	233,2±5,0*	43,4±1,8	181,2±5,2*	8,4±0,5	7,4±0,9	1,1±0,1	18,6±0,9*	4,6±0,3*	3,6±0,2*
	7T	10	197,7±10,3*	44,7±5,3	141,1±7,7*	8,1±1,1	7,7±0,9	1,0±0,1	22,6±2,2*	5,7±0,8*	4,1±0,5*

Tabela 2 - Morfometria macroscópica do fígado das ratas com avaliação intragrupo realizada entre os grupos controle (C) e tratado (T) para os respectivos períodos de tratamento (p. ex. P vivo 1C vs. 1T). Os resultados (média ± desvio padrão) mostraram diferenças estatísticas entre si – indicadas com asteriscos - para os índices morfométricos macroscópicos IVP, IFC e IHS a partir da terceira semana, com o uso do teste t não pareado com correção de Welch (p<0,05). **N**, número de animais em cada grupo; **P vivo**, peso final; **P Vis**, peso das vísceras; **P Car**, peso da carcaça; **PFig**, peso do fígado; **VFig**, volume do fígado; **DFig**, densidade do fígado; **IVP**, índice vísceras/peso vivo; **IFC**, índice fígado/carcaça; **IHS**, índice hepatossomático. São Paulo, 2011

Período de tratamento	Grupos Controle	Grupos Tratados	Efeito da TAA
1 semana	6,7±0,5 (5)	6,7±0,4 (10)	P>0,05
2 semanas	6,9±1,2 (5)	7,6±0,5 (10)	P>0,05
3 semanas	5±0,3 * (5)	7,2±0,5 * (10)	P<0,001
4 semanas	5,3±0,4 (5)	6,4±0,8 (10)	P>0,05
5 semanas	4,7±0,4 * (5)	6,1±0,6 * (10)	P<0,01
6 semanas	4,8±0,8 (5)	5,6±0,7 (10)	P>0,05
7 semanas	4,6±0,3 (5)	5,7±0,8 (10)	P>0,05

Tabela 3 - Média e desvio padrão do índice fígado carcaça (em %). Nas linhas os asteriscos indicam diferença estatística ($p<0,05$) entre os grupos tratados e os controles na mesma semana. O número de ratos em cada grupo está indicado entre parênteses. ANOVA com pós-teste de Bonferroni. São Paulo, 2013

Período de tratamento	Grupos Controle	Grupos Tratados	Efeito da TAA
1 semana	5,0±0,3 (5)	5,2±0,4 (10)	P>0,05
2 semanas	5,3±0,9 (5)	5,3±0,4 (10)	P>0,05
3 semanas	3,9±0,2 * (5)	5,3±0,4 * (10)	P<0,001
4 semanas	4,1±0,2 (5)	4,6±0,6 (10)	P>0,05
5 semanas	3,7±0,2 (5)	4,4±0,3 (10)	P>0,05
6 semanas	3,7±0,6 (5)	4±0,4 (10)	P>0,05
7 semanas	3,6±0,2 (5)	4,1±0,5 (10)	P>0,05

Tabela 4 - Média e desvio padrão do índice hepatossomático (em %). Nas linhas os asteriscos indicam diferença estatística ($p<0,05$) entre os grupos tratados e os controles na mesma semana. O número de ratos em cada grupo está indicado entre parênteses. ANOVA com pós-teste de Bonferroni. São Paulo, 2013

Período de tratamento	Grupos Controle	Grupos Tratados	Efeito da TAA
1 semana	22,2±0,8 (5)	22±1,9 (10)	P>0,05
2 semanas	22,8±1,5 (5)	24,5±3,3 (10)	P>0,05
3 semanas	19,4±1,5* (5)	23,6±1,4* (10)	P<0,01
4 semanas	19,2±0,8* (5)	24,1±1,8* (10)	P<0,001
5 semanas	16,6±1,9* (5)	24,4±2,5* (10)	P<0,001
6 semanas	17,8±1,1* (5)	23,1±2,3* (10)	P<0,001
7 semanas	18,6±0,9* (5)	22,6±2,2* (10)	P<0,05

Tabela 5 - Média e desvio padrão do índice vísceras/peso (em %). Nas linhas os asteriscos indicam diferença estatística ($p<0,05$) entre os grupos tratados e os controles na mesma semana. O número de ratas em cada grupo está indicado entre parênteses. ANOVA com pós-teste de Bonferroni. São Paulo, 2013

Figura 6 – Fotomicrografias de cortes de fígado de ratas coradas com HE. Em **A**, nota-se a presença de células em apoptose (setas espessas) e infiltrado inflamatório (seta fina) ao redor das VHT. Em **B**, nota-se a hepatite de interface ao redor dos espaços porta, com hepatócitos apresentando o citoplasma rendilhado (seta grossa) em contraste aos hepatócitos hígidos da zona 2 acinar (cabeça de seta). Em **C**, nota-se a presença de macrófagos próximos à VHT com acúmulo de lipofuscina (cabeça de seta) e hepatócitos necróticos (seta grossa). Em **D**, observa-se a hepatite de interface (seta grossa), a formação de novos ductos biliares (seta fina) e hepatócitos binucleados em zona 2 acinar (cabeça de seta). **A e B**, ratas tratadas com TAA por uma semana; **C e D**, ratas tratadas com TAA por sete semanas. Barra – 50 μ m. São Paulo, 2013

5.4 Volume ocupado pelo colágeno

Após a aquisição das fotomicrografias dos espaços porta, o volume médio e seu respectivo desvio padrão foram avaliados com o uso do teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni (Tabela 6). Não foi encontrada diferença estatística ($p=0,77$) no aumento do volume ocupado pelas fibras colágenas quando comparados o grupo controle e os grupos tratados por uma até sete semanas (1T a 7T).

Grupos	Média $\pm$ Desvio padrão	Efeito da TAA sobre a fibrose
Controle	0,15 $\pm$ 0,14 (5)	P=0,77
1T	0,14 $\pm$ 0,23 (10)	
2T	0,15 $\pm$ 0,18 (10)	
3T	0,15 $\pm$ 0,23 (10)	
4T	0,15 $\pm$ 0,26 (10)	
5T	0,14 $\pm$ 0,12 (10)	
6T	0,15 $\pm$ 0,17 (10)	
7T	0,16 $\pm$ 0,16 (10)	

Tabela 6 – O volume ocupado pelas fibras colágenas (em %) variou, mas não houve aumento significativo ($p>0,05$) durante o uso de TAA. 1T a 7T denominam os grupos tratados com TAA nos períodos de uma a sete semanas. ANOVA com pós-teste de Bonferroni ($p<0,05$). São Paulo, 2013

Figura 7 – Fotomicrografias de cortes de fígados de ratas corados com o método de Picrossírius. Em **A**, observam-se os componentes do espaço porta: a veia porta (seta grossa); ducto biliar (cabeça de seta) e artéria hepática (seta fina). Em **B**, nota-se que o espaço porta ainda não apresenta reação ductular ou deposição de fibras colágenas. Em **C**, observa-se a deposição das fibras colágenas com pequenos feixes irradiando excentricamente (cabeça de seta) e novos ductos biliares (setas finas). Em **D**, nota-se a presença de finos feixes colágenos (cabeça de seta) e novos ductos biliares (setas finas). **A**; rata do grupo controle, **B**; rata tratada com TAA por uma semana, **C**; rata tratada com TAA por quatro semanas, **D**; rata tratada com TAA por sete semanas. Barra – 50 μ m. São Paulo, 2013

5.5 Detecção e quantificação de células do sistema imunológico, hepatócitos em apoptose e células MCP-1 positivas

A detecção semanal de macrófagos exsudativos (ED1) e sua quantificação revelaram a presença e aumento gradual do número de células positivas em todo o parênquima, mais intensamente ao redor de espaços porta e VHT, até o pico no grupo tratado por quatro semanas em relação ao controle ($17,9 \pm 9,7$) e reduzindo-se em seguida, com valores próximos ao do grupo tratado por uma semana ($11,2 \pm 4,1$) (Tabela 7).

Para os macrófagos teciduais (ED2), a detecção e sua quantificação revelaram comportamento diferente do observado com os macrófagos exsudativos. Os valores tabulados revelaram pequeno aumento no número de células positivas nos campos avaliados, com valores máximos para as ratas tratadas por cinco semanas com tioacetamida ($17,3 \pm 8,3$) e declínio até o do período experimental (Tabela 8).

Em relação à quantificação das células em apoptose – caspase 3 positivas – foi observado o pico no grupo tratado por uma semana ($18,6 \pm 12,7$). Após isto, os valores sofreram flutuação com valores mínimos registrados no grupo tratado por quatro semanas ($5,3 \pm 5,9$), momento a partir do qual apresentaram elevação e valores semelhantes aos registrados no início do experimento ($18,0 \pm 9,8$ para o grupo tratado por sete semanas) (Tabela 9).

Infelizmente não logramos êxito na detecção de células dendríticas com o anticorpo anti - OX6 e na detecção de células MCP-1 positivas com o anticorpo anti - MCP-1 em nenhum dos grupos tratados com tioacetamida ou nos grupos controle.

Período de tratamento	Grupos Controle	Grupos Tratados	Efeito da TAA
1 semana	3,4±1,2* (5)	11,2±4,1* (6)	P<0,01
2 semanas	3,6±1,8 (5)	8,9±2,7 (6)	P>0,05
3 semanas	3,4±1,1* (5)	13,0±5,3* (6)	P<0,01
4 semanas	4,7±1,8* (5)	17,9±9,7* (6)	P<0,001
5 semanas	3,4±1,4* (5)	16,0±5,0* (6)	P<0,001
6 semanas	2,4±1,8* (5)	13,4±5,3* (6)	P<0,001
7 semanas	2,4±0,5* (5)	10,4±4,9* (6)	P>0,05

Tabela 7 - Média e desvio padrão de células positivas por campo (0,1497746 mm²) para o anticorpo anti – ED1. O número de ratas em cada grupo está indicado entre parênteses. Nas linhas os asteriscos indicam diferença estatística (p<0,05) entre os grupos tratados e os controles na mesma semana. O número de ratas em cada grupo está indicado entre parênteses. ANOVA com pós-teste de Bonferroni. São Paulo, 2013

Período de tratamento	Grupos Controle	Grupos Tratados	Efeito da TAA
1 semana	4,2±1,8 (5)	4,5±2,0 (6)	P>0,05
2 semanas	4,0±1,6 (5)	5,6±2,1 (6)	P>0,05
3 semanas	3,4±0,9 (5)	3,8±1,9 (6)	P>0,05
4 semanas	5,4±2,3 (5)	3,9±1,6 (6)	P>0,05
5 semanas	4,2±0,8 (5)	6,7±3,2 (6)	P>0,05
6 semanas	4,4±1,8 (5)	2,7±1,5 (6)	P>0,05
7 semanas	2,8±1,3 (5)	3,5±1,6 (6)	P>0,05

Tabela 8 - Média e desvio padrão de células positivas por campo (0,1497746 mm²) para o anticorpo anti – ED2. O número de ratas em cada grupo está indicado entre parênteses. Nas linhas os asteriscos indicam diferença estatística (p<0,05) entre os grupos tratados e os controles na mesma semana. O número de ratas em cada grupo está indicado entre parênteses. ANOVA com pós-teste de Bonferroni. São Paulo, 2013

Período de tratamento	Grupos Controle	Grupos Tratados	Efeito da TAA
1 semana	14,0±3,9 (5)	18,6±12,6 (6)	P>0,05
2 semanas	3,7±5,2 (5)	8,8±5,9 (6)	P>0,05
3 semanas	9,6±6,5 (5)	9,8±7,1 (6)	P>0,05
4 semanas	6,2±3,2 (5)	5,9±5,8 (6)	P>0,05
5 semanas	8,0±5,0 (5)	8,4±8,9 (6)	P>0,05
6 semanas	10,7±6,0 (5)	8,9±5,0 (6)	P>0,05
7 semanas	8,0±4,6 (5)	18,0±9,8 (6)	P>0,05

Tabela 9 - Média e desvio padrão de células positivas por campo (0,1497746 mm²) para o anticorpo anti – caspase 3. O número de ratas em cada grupo está indicado entre parênteses. Nas linhas os asteriscos indicam diferença estatística (p<0,05) entre os grupos tratados e os controles na mesma semana. O número de ratas em cada grupo está indicado entre parênteses. ANOVA com pós-teste de Bonferroni. São Paulo, 2013

Figura 8 – Fotomicrografias de cortes de fígado com detecção de macrófagos ED1. As ratas do grupo controle **(A)** exibiram poucas células ED1 positivas ao redor das VHT, mas aumento considerável foi observado após uma semana de tratamento **(B)**, atingindo número máximo na quarta semana **(C)** e redução lenta e contínua até a sétima semana **(D)**. Barra – 50 μ m. São Paulo, 2013

Figura 9 – Os macrófagos ED2 também se encontraram nos sinusóides **(A)**. A partir da primeira semana eles foram atraídos para as VHT **(B)**, na quarta semana foram vistas em regiões com hepatócitos necróticos (seta) **(C)** e, ao fim do tratamento com TAA, foram observadas próximos aos espaços porta **(D)** participando da necrose de sacabocado (seta). Barra - 20μm. São Paulo, 2013

Figura 10 – Os hepatócitos em apoptose são encontrados naturalmente em todas as zonas acinares **(A)** e, uma vez expostos agudamente à TAA por uma semana (grupo 1T) **(B)**, um grande número de hepatócitos foram afetados e entraram em apoptose, surgindo áreas de necrose (seta), detectadas na quarta semana **(C)** na zona 2 acinar (seta) porém, ao final do experimento **(D)** os hepatócitos em apoptose se concentraram próximos das VHT. Barra – 50 μ m. São Paulo, 2013

6. Discussão

O propósito desta investigação foi estudar a histopatologia do desenvolvimento da fibrose hepática no modelo de uso contínuo da TAA em ratas Wistar. Para tal, nos propusemos a quantificar os hepatócitos em apoptose de regiões lesionadas; células MCP-1 positivas; macrófagos exsudativos; macrófagos teciduais; células dendríticas e a proporção do volume ocupado pelas fibras colágenas depositadas durante o período de sete semanas.

Durante as primeiras semanas de indução de fibrose foi observada a perda de peso das ratas. Este fato, que é também observado em modelos animais expostos ao LPS bacteriano, é parcialmente explicado pela ação de interleucinas (IL)-1 alfa e beta, IL-6, interferons e do fator de necrose tumoral alfa (TNF alfa) (McCarthy, 2000). O TNF alfa estimula a secreção de prostaglandina E2 (PGE2) no estômago e no núcleo paraventricular do hipotálamo (núcleo da fome) que, respectivamente, causa o retardo no esvaziamento gástrico e a secreção de serotonina – formas pelas quais é sinalizada a saciedade para o sistema nervoso central. As IL-1 alfa e beta atuam de forma semelhante, seja pela estimulação do nervo vago ou pela ação central no núcleo paraventricular, respectivamente (McCarthy, 2000; Ohinata; Yoshikawa, 2008; Wenger; Moldrich, 2002; Asarian; Langhans, 2010; Haleem, 2012). A partir da avaliação dos índices biométricos podemos observar a ação indireta em nível periférico do TNF alfa em direção à lipólise (Chen *et al.*, 2009). Os valores máximos registrados para os índices biométricos índice fígado/carcaça, índice vísceras/peso e índice hepatossomático na segunda e terceira semanas, aliados à elevação dos números de macrófagos exsudativos e macrófagos teciduais no parênquima hepático sugerem a redução na ingestão de ração pelas ratas. A redução de peso das ratas foi inversamente proporcional ao número médio de macrófagos exsudativos e macrófagos teciduais durante as duas primeiras semanas, período após o qual as ratas retornaram ao peso inicial e o número de macrófagos se reduziu. Da quarta semana em diante suspeitamos da indução enzimática do sistema P450 (Low *et al.*, 2004; Maronpot *et al.*, 2010) e adaptação à dose de tioacetamida utilizada

(Williams; Iatropoulos, 2002). Logo, as ratas controle mantiveram vantagem na elevação de seu peso, sem ganho de peso compensatório para os grupos tratados com TAA.

O uso de agentes xenobiontes desencadeia a morte de células tanto pela apoptose quanto pela necrose, sendo a dose o fator determinante (Malhi *et al.*, 2010). No caso da TAA não é diferente, pois pequenas doses (50 e 150 mg/ml) causam morte celular via apoptose e altas doses (300 e 600 mg/ml) resultam em necrose celular (Mangipudy *et al.*, 1998), situação na qual a caspase-3 pode ser detectada no plasma (Sun *et al.*, 2000). Nesta pesquisa a morte foi detectada pela via da apoptose, mas também foi observada a hepatite de interface como consequência da fagocitose destas células mortas. A apoptose de células parenquimatosas não é mais vista como uma consequência silenciosa da lesão hepática, mas sim um estímulo inflamatório importante (Friedman, 2008).

Além da apoptose, a presença constante de células ovais próximas aos espaços porta nas primeiras semanas de tratamento demonstra a ação tóxica da tioacetamida. As células tronco do fígado, também chamadas de “células ovais” são uma população heterogênea de pequenas células das zonas portais com uma alta relação núcleo/citoplasma, núcleo ovoide e citoplasma basofílico (Darwiche; Petersen, 2010). A diferenciação de células ovais em ductos biliares é chamada de “resposta das células ovais” em roedores e “reação ductular” em humanos (Turner *et al.*, 2011).

Embora o exato mecanismo da sua ativação não seja ainda conhecido, uma condição para sua estimulação é que a proliferação hepatocitária deve estar gravemente impedida (Schoemaker, Moshage, 2004). As HSC também podem influenciar o crescimento e diferenciação das células ovais via secreção de fatores de crescimento ou também por interação direta célula-célula (Darwiche; Petersen, 2010). Nos modelos animais foi notado que a proliferação de células ovais é positivamente correlacionada com o grau de fibrose (Laleman *et al.*, 2006) e associada com a presença de células inflamatórias, tais como macrófagos exsudativos

e macrófagos teciduais, e HSC (Tsamandas *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 1999). Com o uso da tioacetamida por períodos mais longos, as células ovas originam novos ductos biliares de forma importante com rearranjo do parênquima hepático e instalação da cirrose (Trotta *et al.*, 2013).

O acúmulo de fibras colágenas é impulsionado pelo microambiente de células apoptóticas e fatores pró-fibróticos secretados por macrófagos (Lech; Anders, 2013) que, sinergicamente, contribuem para a estimulação parácrina das HSC (Friedman, 2000). Essas células são as responsáveis pela secreção de TGF β 1 e TNF α que ativam as HSC e desencadeiam a apoptose, respectivamente (Kolios *et al.*, 2009, Liu *et al.*, 2010). Portanto a presença de macrófagos no parênquima é uma etapa anterior ao acúmulo de tecido colágeno (Lech; Anders, 2013). Em suma, durante as sete primeiras semanas de uso da tioacetamida há a ação do infiltrado inflamatório e suas consequências - a hepatite de interface, a lesão tecidual e necrose (Hori *et al.*, 2004; Laleman *et al.*, 2006; Lech; Anders, 2013; Sahin; Wasmuth, 2013).

Contudo, para o modelo experimental de indução de cirrose pela tioacetamida ainda não existe a definição de quanto tempo após o início do seu uso o fígado lesionado de forma aguda (hepatite de interface e apoptose) passa para o estado crônico (angiogênese e presença de pseudolóbulos) e, por fim, cirrótico. As fronteiras entre os dois estádios são tênues e, para auxiliar a interpretação das alterações encontradas no parênquima e decidir qual o tratamento será utilizado nos pacientes, foram desenvolvidos métodos algorítmicos para o estadiamento da cirrose, tais como o método de Ishak; Scheuer; Metavir e Batts-Ludwig (Theise, 2007). Além da avaliação histopatológica, no futuro serão necessários métodos complementares para tornar o estadiamento da cirrose mais acurado. Técnicas moleculares e clínico-patológicas poderão ser empregadas para o acompanhamento das concentrações das enzimas que controlam as ações pró-fibróticas (as enzimas metaloproteinases de matriz, MMPs) e as anti-fibróticas (as enzimas inibidoras teciduais de metaloproteinases, TIMPs).

O protocolo de indução de cirrose hepática utilizado em ratas foi eficaz para a lesão dos hepatócitos e desenvolvimento do processo inflamatório, porém sua eficácia se reduziu ao longo do tempo. Em trabalhos anteriores, a ineficácia foi detectada indiretamente pelo aumento de peso das ratas após a sétima semana de uso da TAA (Guerra *et al.*, 2009; Lima, 2008). Esta fato foi interpretado como adaptação e recuperação das ratas, e a estratégia para contornar o aumento de peso das ratas foi a elevação da dose de TAA empiricamente em 10% (220mg/kg de TAA), utilizada por Guerra *et al.* (2009), e em diferentes concentrações superiores a 200 mg/kg testadas por Lima (2008) após a sétima semana. Baseando-se na fisiopatologia da cirrose hepática, podemos concluir que o aumento da dose de TAA pode ter induzido o aumento do número de macrófagos ED1 e ED2 no parênquima, pois foram observadas a presença da cirrose e o remodelamento do parênquima hepático.

Outro fator determinante da instalação da cirrose é o tempo de uso da TAA. Com um protocolo mais conservador e por tempo mais prolongado (150mg/kg de TAA, via IP por 15 semanas), Trotta *et al.* (2013) obtiveram a promoção e perpetuação da cirrose com remodelamento do parênquima e angiogênese em grau importante. Neste caso, a matriz tempo X dose foi eficaz no desenvolvimento da cirrose.

As relações dose X tempo X inflamação para este modelo ainda estão em aberto, portanto, em face dos nossos resultados e os de Guerra *et al.* (2009), Lima (2008) e Trotta *et al.* (2013) consideramos que o próximo passo nesta linha de pesquisa seria, a partir da quarta semana, utilizar doses maiores de TAA para acompanhar a evolução e o comportamento das células inflamatórias e seu papel no desenvolvimento final do modelo indução de cirrose em ratas com uso de TAA. Desta forma, o conhecimento sobre as células inflamatórias contribuiria com as pesquisas translacionais sobre fibrose e cirrose hepática.

Por fim, propomos o uso da dose inicial de 200mg/kg de tioacetamida nas primeiras quatro semanas, e aumento gradual da dose. Na quinta e

sexta semanas a dose seria de 220 mg/kg de tioacetamida, na sétima e oitava 240 mg/kg, nona e décima 260 mg/kg, décima primeira e décima segunda 280 mg/kg e, na décima terceira e décima quarta semanas atingiria a dose de tioacetamida com efeito máximo, de 300 mg/kg.

7. Conclusões

Diante dos resultados encontrados neste trabalho, podemos concluir que:

- A TAA é eficiente em causar lesão do parênquima hepático;
- A necrose e apoptose dos hepatócitos é suficientemente grave para atrair os monócitos – teciduais e exsudativos - para as áreas de lesão indicando ação tóxica da TAA;
- A presença de infiltrado inflamatório e de células ovas, sem alterações no *turnover* do tecido conjuntivo hepático indicam que as sete primeiras semanas são a fase de lesão tecidual e de hepatite frente à TAA;
- A fim de se manter a constante lesão e inflamação do fígado possivelmente será necessário aumentar a dose de TAA.

8. Referências

Referências¹

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Apoptose. In:_____. *Biologia molecular da célula*. 5ª. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 1115-1130. 2010.

Armbrust T, Ramadori G. Functional characterization of two different Kupffer cell population of normal rat liver. *J Hepatol*. 1996; 25: 518-28.

Asarian L, Langhans W. A new look on brain mechanisms of acute illness anorexia. *Physiol Behav*. 2010;100(5):462-71.

Banks WJ. *Histologia Veterinária Aplicada*. 2a ed. São Paulo: Manole; 1992.

Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJ. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology*. 1996;110(3):821-31.

Brenner DA. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2009;120:361-8.

Caballero ME, Berlanga J, Ramirez D, Lopez-Saura P, Gozalez R, Floyd DN, Marchbank T, Playford RJ. Epidermal growth factor reduces multiorgan failure induced by thioacetamide. *Gut*. 2001; 48:34-40.

Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology*. 2004;39(2):273-8.

Chen X, Xun K, Chen L, Wang Y. TNF- α , a potent lipid metabolism regulator. *Cell Biochem Funct*, 2009;27:407-16.

Chilakapati J, Shankar, K, Korrapati MC, Hill RA, Mehendale, H. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: role in initiation of liver injury. *Drug Metab Dispos*. 2005;33 (12):1877-85.

¹ De acordo com: *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografia*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suelly Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo:Serviço de Biblioteca e Documentação;2009.

Cogliati B, Pereira HM, Dagli MLZ, Parra OM, Da Silva JRMC, Hernandez-Blazquez FJ. Hepatotrophic factors reduce hepatic fibrosis in rats. *Arq Gastroenterol*. 2010;47 (1):79-85.

Corbin IR, Minuk, GY. Serial percutaneous liver biopsies in laboratory rats. *Dig Dis Sci*. 2003;48(10):1939-43.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Patologia celular I: lesão e morte da célula. In:_____. *Robbins – Patologia Estrutural e Funcional*. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.p.1-26.

Crawford JM, Liu C. Liver and biliary tract. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. *Robbins and Cotran Pathology Basis of Disease*. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2010. p. 833-890.

Darwiche H, Petersen BE. Biology of the adult hepatic progenitor cell: “ghosts in the machine”. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2010. 97: 229–49.

Desmet VJ. Liver lesions in hepatitis B viral infection. *Yale J Biol Med*. 1988.61(1):61-83.

Dolber PC, Spach MS. Picrosirius red staining of cardiac muscle following phosphomolybdic acid treatment. *Stain Tech*. 1987. 62(1): 23-6.

Fontana L, Moreira E, Torres MI, Fernández MI, Ríos A, Sánchez de Medina F, Gil A. Serum amino acid changes in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Toxicology*. 1996 Jan;106(1-3):197-206.

Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*. 2000;275(4):2247-50.

Friedman SL. Hepatic fibrosis – overview. *Toxicology*. 2008;254:120-9.

Furtado KS, Prado MG, Aguiar e Silva MA, Dias MC, Rivelli DP, Rodrigues MAM, Barbisan LF. Coffee and caffeine protect against liver injury induced by thioacetamide in male Wistar rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012. 111: 339-47.

Galle PR. Apoptosis in liver disease. *J Hepatol*. 1997;27(2):405-12.

Gandillet A, Alexandre E, Holl V, Royer C, Bischoff P, Cinqualbre J, Wolf P, Jaeck D, Rickert L. Hepatocyte ploidy in normal young rat. *Comp Biochem Physiol A*. 2003. 134:665-73.

George LL, Alves CER, Castro RRL. *Histologia Comparada*. 2ª Ed. São Paulo: Roca, 1998.

Guerra RR, Trotta MR, Parra OM, Avanzo JL, Bateman A, Aloia TPA, Dagli MLZ, Hernandez-Blazquez FJ. Modulation of extracellular matrix by nutritional hepatotrophic factors in thioacetamide-induced liver cirrhosis in the rat. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42(11):1027-34.

Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis as a mechanism for liver disease progression. *Semin Liver Dis.* 2010;30(4):402-10.

Hakateyama Y, Ono T, Sakuma H, Koyama Y, Inoue N, Takenoshita S, Omata S. Usefulness of the tactile sensor for estimating the degree of liver fibrosis and the DNA synthesis activity of remnant liver cells after partial hepatectomy. *Fukushima J Med Sci.* 2002;48(2):93-101.

Haleem DJ. Serotonin neurotransmission in anorexia nervosa. *Behav Pharmacol.* 2012;23(5-6):478-95.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407(6805):770-6.

Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:425-56.

Holt AP, Salmon M, Buckley CD, Adams DH. Immune interactions in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis.* 2008;12(4):861-82.

Holt AP, Haughton EL, Lalor PF, Filer A, Buckley CD, Adams DH. Liver myofibroblasts regulate infiltration and positioning of lymphocytes in human liver. *Gastroenterology.* 2009;136(2):705-14.

Hori Y, Sato S, Yamate J, Kurasaki M, Nishihira J, Hosokawa T, Fujita H, Saito T. Immunohistochemical study of macrophage migration inhibitory factor in rat liver fibrosis induced by thioacetamide. *Eur J Histochem.* 2003;47(4):317-24.

Ide M, Yamate J, Machida Y, Nakanishi M, Kuwamura M, Kotani T, Sawamoto O. Emergence of different macrophage populations in hepatic fibrosis following thioacetamide-induced acute hepatocyte injury in rats. *J Comp Path.* 2003;128(1):41-51.

Ide M, Kuwamura M, Kotani T, Sawamoto O, Yamate J. Effects of gadolinium chloride (GdCl₃) on the appearance of macrophage populations and fibrogenesis in thioacetamide-induced rat hepatic lesions. *J Comp Path.* 2005;133(2-3):92-102.

Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology.* 2005;128(1):128-46.

Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen. *Anal Biochem*. 1979;94(1):96-9.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 9ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg Jr EF. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Prospect*. 1998;106(Suppl 1):289-95.

Kiernan JA. Histological and histochemical methods – theory and practice. London: Arnold, 1999.

Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12(46):7413-20.

Laleman W, Van der Elst I, Zeegers M, Servaes R, Libbrecht L, Roskams T, Fevery J, Nevens F. A stable model of cirrhotic portal hypertension in rat: thioacetamide revisited. *Eur J Clin Invest*. 2006;36(4):242-9.

Lech M, Anders HJ. Macrophages and fibrosis: how resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(7):989-97.

Li W, Kong A. Molecular mechanisms of Nrf-2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog*. 2009;48(2):91-104.

Li X, Benjamin IS, Alexander B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *J Hepatol*. 2002;36(4):488-93.

Lim YS, Kim WR. The global impact of hepatic fibrosis and end-stage liver disease. *Clin Liver Dis*. 2008; 12:733-46.

Lima TC. Cirrose hepática induzida por tioacetamida: estudo do modelo por injeção intraperitoneal a longo prazo em ratas Wistar. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2008. 140f.

Low TY, Leow CK, Salto-Tellez M, Chung MCM. A proteomic analysis of thioacetamide-induced hepatotoxicity and cirrhosis in rat livers. *Proteomics*. 2004. 4:3960-74.

McCarthy DO. Cytokines and the anorexia of infection: potential mechanisms and treatments. *Biol Res Nurs*. 2000;1(4):218:287-98.

Majno G, Joris I. Cell injury and cell death. In:_____. *Cells, tissues and disease – principles of general pathology*. New York: Oxford University Press, 2nd ed. p.185-245. 2004.

Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiol Rev*. 2010;90: 1165-94.

Mangipudy RS, Rao PS, Andrews A, Bucci TJ, Witzmann FA, Mehendale HM. Dose-dependent modulation of cell death: apoptosis versus necrosis in thioacetamide hepatotoxicity. *Int J Toxicol*. 1998. 17(2): 193-211.

Maronpot RR, Yoshizawa K, Nyska A, Harada T, Flake G, Mueller M Singh B, Ward JM. Hepatic enzyme induction: Histopathology. *Toxicol Pathol*. 2010. 38(5):776-95.

Marra F, Valente AJ, Pinzani M, Abboud H. Cultured human fat-storing cells produce monocyte chemotactic protein-1. Regulation by proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*. 1993;92(4):1674-80.

Marra F, De Franco R, Grappone C, Milani S, Pastacaldi S, Pinzani M, Romanelli RG, Laffi G, Gentilini P. Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 during hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol*. 1998;152(2):423-30.

Marra F, Aleffi S, Galastri S, Provenzano A. Mononuclear cells in liver fibrosis. *Semin Immunopathol*. 2009;31(3):345-58.

Mori Y, Izawa T, Takenaga S, Kuwamura M, Yamate J. Participation of functionally different macrophage populations and monocyte chemoattractant protein-1 in early stages of thioacetamide-induced rat hepatic injury. *Toxicol Pathol*. 2009;37(4):463-73.

Muller P, Pomorski T, Porwoli S, Tauber R, Herrmann A. Transverse movement of spin-labeled phospholipids in the plasma membrane of a hepatocyte cell line (HepG2): implications for biliary lipid secretion. *Hepatology*. 1996;24(6):1497-503.

Nagata T, Kudo H, Nishino T, Doi Y, Itoh H, Fujimoto S. increased immunoreactivities against endothelin-converting enzyme-1 and monocyte chemotactic protein-1 in hepatic stellate cells of rat fibrous liver induced by thioacetamide. *Med Mol Morphol*. 2005;38(3):161-72.

Natarajan SK, Thomas S, Ramamoorthy P, Basivireddy J, Pulimood AB, Ramachandran A, Balasubramanian KA. Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006. 21(6):947-57.

Noda S, Masumi S, Moriyama M, Kannan Y, Ohta M, Sugano T, Yamate J. Population of hepatic macrophages and response of perfused liver to platelet-activating factor during production of thioacetamide-induced cirrhosis in rats. *Hepatology*. 1996; 24 (2):412-18.

Ohinata K, Yoshikawa M. Central prostaglandins in food intake regulation. *Nutrition*. 2008, 24:798-801.

Pinzani M, Rombouts K, Colagrande S. Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. *J Hepatol*. 2005;42 (Suppl1):S22-36.

Ramadori G, Moriconi F, Malik I, Dudas J. Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59(Suppl1):107-17.

Rana SVS. Metals and apoptosis: recent developments. *J Trace Elem Med Biol*. 2008. 22: 262-84.

Rajvanshi P, Liu D, Ott M, Gagandeep S, Schilsky ML, Gupta S. Fractional of rat hepatocyte subpopulations with varying metabolic potential, proliferative capacity, and retroviral gene transfer efficiency. *Exp Cell Res*. 1998. 224: 405-19.

Rodrigues AS. A influência dos pontos de acupuntura Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) no desenvolvimento de lesões hepáticas induzidas por tioacetamida, em ratos Wistar. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2009. 112f.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(7):519-29.

Sahin H, Wasmuth HE. Chemokines in tissue fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1832:1041-8.

Salama SM, Bilgen M, Al Rashdi AS, Abdulla MA. Efficacy of *Boesenbergia rotunda* treatment against thioacetamide-induced liver cirrhosis in a rat model. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012. (No prelo).

Santos M, Marcos R, Santos N, Malhão F, Monteiro RAF, Rocha E. Na unbiased stereological study on subpopulations of rat liver macrophages and on their numerical relation with the hepatocytes and stellate cells. *J Anat*. 2009; 214:744-51.

Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. 1970; 26: 57-63.

Schoemaker MK, Moshage H. Defying death: the hepatocyte's survival kit. *Clin Sci (Lond)*. 2004.107(1):13-25.

Sun F, Hayami S, Ogiri Y, Haruna S, Tanaka K, Yamada Y, Tokumaru S, Kojo S. Evaluation of oxidative stress on lipid hydroperoxide, vitamin C and vitamin E during apoptosis and necrosis caused by thioacetamide in rat liver. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1500(2):181-5.

Tanjore H, Lawson WE, Blackwell TS. Endoplasmic reticulum stress as pro-fibrotic stimulus. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1832:940-7.

Theise ND. Liver biopsy assessment in chronic viral hepatitis: a personal, practical approach. *Mod Pathol*. 2007, 20(Suppl1):S3-14.

Trotta MR, Cajaíba DM, Parra OM, Dagli MLZ, Hernandez-Blazquez FJ. Parenteral solution of nutritional hepatotrophic factors improves regeneration in thioacetamide-induced cirrhotic livers after partial hepatectomy. *Toxicol Pathol*. 2013. (No prelo).

Tsamandas AC, Antonacopoulou A, Kalogeropoulou C, Tsoda I, Zabakis P, Giannopoulou E, Liava A, Tzelepi V, Tepetes K, Petsas T, Kardamakis D, Kalofonos HP. Oval cell proliferation in cirrhosis in rats. An experimental study. *Hepatol Res*. 2007. 37:755-64.

Turner R, Lozoya O, Wang Y, Cardinale V, Gaudio E, Alpini G, Mendel G, Walthier E, Barbier C, Alvaro D, Reid LM. Human hepatic stem cell and maturation liver lineage biology. *Hepatology*. 2011; 53: 1035-45.

Wenger T, Moldrich G. The role of endocannabinoids in the hypothalamic regulation of visceral function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002;66(2-3):301-7.

Williams GM, Iatropoulos MJ. Alteration of liver cells function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity. *Toxicol Pathol*. 2002. 30(1):41-53.

Xie Y, Wang G, Wang H, Yao X, Shan S, Kang A, Zhou F, Tong X, Hao H. Cytochrome P450 dysregulations in thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats and the counteracting effects of hepatoprotective agents. *Drug Metab Dispos*. 2012; 40(4):796-802.

Yin L, Lynch D, Sell S. Participation of different cell types in the restitutive response of the rat liver to periportal injury induced by allyl alcohol. *J Hepatol*. 1999. 31: 497-507.

Yin H, Zhou Y, Zhu M, Hou S, Li Z, Zhong H, Lu J, Meng T, Wang J, Xia L, Xu Y, Wu Y. Role of mitochondria in programmed cell death mediated by arachidonic acid-derived eicosanoids. *Mitochondrion*. 2012. (No prelo).